

Université de Montréal

Identification en thérapie cellulaire des patrons d'expression transcriptomique de cellules
souches utilisées pour traiter la défaillance cardiaque afin d'en améliorer le potentiel
thérapeutique

Par

Jean-Alexandre Sauvé

Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences en sciences
biomédicales, option sciences cardiovasculaire

Décembre 2020

© Sauvé, 2020

Université de Montréal

Sciences biomédicales, Faculté de médecine

Mémoire intitulé

Identification en thérapie cellulaire des patrons d'expression transcriptomique de cellules souches utilisées pour traiter la défaillance cardiaque afin d'en améliorer le potentiel thérapeutique

Présenté par

Jean-Alexandre Sauvé

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jean-Sébastien Delisle

Président-rapporteur

Dr Jean-François Cailhier

Directeur de recherche

Dr Nicolas Noiseux

Codirecteur

Dr Emmanuel Charbonney

Membre du jury

Résumé

La cardiopathie ischémique incluant l'insuffisance cardiaque est la deuxième cause de mortalité annuelle au Canada. Bien que de nombreuses stratégies préventives et des thérapies pharmacologiques retardent la progression de la maladie, il n'existe aucune solution qui module directement ~~aux~~ les remaniements pathologiques et la perte de cardiomyocytes. Au cours des 25 dernières années, de multiples progrès dans les domaines de la médecine régénérative et de la thérapie cellulaire ont annoncé des résultats prometteurs, mais les résultats d'études cliniques contemporaines demeurent plutôt mitigés. COMPARE-AMI, une étude randomisée-contrôlée de phase II, a évalué l'effet d'injections intracoronariennes de cellules souches hématopoïétiques CD133+ chez des patients souffrant d'infarctus aigu. IMPACT-CABG, une ÉRC de phase II a également évalué l'effet d'injections intramyocardiques de cellules CD133+ chez les patients souffrant de cardiomyopathie ischémique chronique nécessitant une revascularisation chirurgicale. Nous avons émis l'hypothèse que les cellules CD133+ utilisées dans des études cliniques de cardiomyopathies ischémiques aiguës et chroniques des patients répondant à la thérapie cellulaire exhibent des signatures transcriptomiques communes responsables de leur effet thérapeutique. En classant les patients en tant que répondants et non-répondants selon leur fonction cardiaque, nous avons évalué, *a posteriori*, ces patrons d'expression. Les cellules CD133+ autologues de patients jugés répondants expriment des signatures qui sont hautement conservées entre elles (incluant l'angiogénèse, la régulation de la réponse au stress et la survie cellulaire) et uniques d'un modèle à l'autre et qui pourraient, en partie, exprimer les issues cliniques des patients. Afin de maximiser les effets de la thérapie cellulaire aux cellules souches, nous avons par la suite tenté de reproduire ces phénotypes par stimulation pharmacologique avec des inhibiteurs d'HSP90 pour leurs effets qui semblent reproduire ces signatures. Ainsi, nous avons démontré qu'une stimulation de cellules souches mésenchymateuses humaines (CSMh) au Célastrol (inhibiteur HSP90) pouvait répliquer certains de ces phénotypes. Notamment, des CSMh conditionnées activent des voies de signalisation de type 'RISK' et augmentent leur sécrétion de protéines en lien avec la réponse au stress ainsi que d'exosomes contenant des molécules impliquées dans la communication intercellulaire sans être liées à un changement de type cellulaire. De plus, les CSMh traitées semblent améliorer la guérison de plaie par activité paracrine et sont plus résistante à la sénescence oxydative. Ces résultats encourageants nous permettent d'envisager des stratégies plus poussées de pré-conditionnement cellulaire *ex vivo* de cellules CD133+ avant leur implantation. À terme, cela pourrait mener à une optimisation de la thérapie cellulaire afin d'en maximiser les bénéfices cliniques et d'~~en~~ exploiter leur plein potentiel.

Mots-clés: thérapie cellulaire, cellules souches dérivées de la moelle osseuse, cardiopathie ischémique, insuffisance cardiaque, transcriptomique, pharmaco-optimisation, recherche clinique

Abstract

Ischemic cardiomyopathy and heart failure are the second annual cause of mortality in Canada. Despite rigorous prevention strategies and drug regimens preventing progression, no therapeutic modality can currently reverse the pathologic modifications of the disease. In the last quarter century, numerous advances in the field of regenerative medicine and cell therapy have demonstrated promising effects. COMPARE-AMI, a phase II randomized controlled trial (RCT), evaluated the effect of intracoronary injection of CD133+ cells in acute myocardial infarction following percutaneous intervention. IMPACT-CABG, also a phase II RCT, evaluated the effect of intramyocardial injection of CD133+ hematopoietic stem cells in chronic ischemic cardiomyopathy at the time of surgical revascularization. That being said, we believe that the CD133+ cells used in therapy have shared transcriptomic signatures that are responsible for their clinical effects. By classifying patients into responders and non-responders according to an improvement in ejection fraction, we evaluated, *a posteriori*, those expression patterns. Autologous CD133+ cells of patients classified as responders expressed highly conserved transcriptomic signatures that could be responsible for the clinical outcomes of patients. Notably, these signatures were related to cardioprotective mechanisms including angiogenesis, stress response regulation and cell survival. In order to harness the full potential of stem cell therapy, we attempted to reproduce the identified phenotypes by pharmacological intervention with HSP90 inhibitors which are known to mimic some of these effects. Conditioned human mesenchymal stem cells (hMSC) activated 'RISK'-type signaling pathways and augmented exosome and protein secretion relating to the response to cellular stress; this activation was unrelated to a switch of cell type. Furthermore, treated hMSC seemed to favour improved wound healing by paracrine activity and were more resistant to oxidative senescence. These encouraging results allow us to develop novel, more advanced, strategies of *ex vivo* cell preconditioning before implantation, including of CD133+ cells. Ultimately, we hope that optimisation of cells through this mechanism and others will allow us to unleash the full potential of stem cell therapy.

Keywords: cell therapy, bone marrow-derived stem cells, ischemic heart disease, heart failure, transcriptomics, pharmaco-optimisation, clinical research

Table des matières

Résumé	p 3
Abstract	p 4
Table des matières	p 5
Liste des tableaux	p 7
Liste des figures	p 8
Liste des sigles et abréviations	p 9
Dédicace	p 11
Remerciements	p 12
<u>Chapitre 1 – Introduction</u>	p 13
1.1 Aperçu du système cardiovasculaire	p 13
1.1.1 Le sang, les vaisseaux sanguins et la circulation	p 13
1.1.2 Le cœur et les cardiomyocytes	p 15
1.2 L'insuffisance cardiaque ischémique	p 19
1.2.1 Définition de l'insuffisance cardiaque ischémique	p 19
1.2.2 L'athérosclérose et la maladie coronarienne athérosclérotique	p 21
1.2.3 L'infarctus du myocarde	p 23
1.3 Les options thérapeutiques pour l'infarctus du myocarde et de l'insuffisance cardiaque ischémique	p 25
1.3.1 La revascularisation précoce en STEMI	p 25
1.3.2 La revascularisation chirurgicale	p 26
1.3.3 Le traitement non pharmacologique et le traitement médical de la HFrEF	p 27
1.3.4 Les thérapies avancées, le support mécanique et la greffe	p 29
1.4 Mécanismes pathophysiologiques clés en cardiopathie ischémique	p 30
1.4.1 L'angiogenèse et l'artériogénèse	p 30

1.4.2	L'insulte ischémie-reperfusion	p 32
1.4.3	Les réponses cellulaires au stress	p 33
1.4.4	La guérison et le remodelage ventriculaire	p 35
1.5	Les cellules souches	p 38
1.5.1	Les cellules souches et le développement humain	p 38
1.5.2	Types de cellules souches et caractéristiques clés	p 39
1.6	La thérapie cellulaire	p 41
1.6.1	Mécanismes d'action potentiels des cellules souches dérivées de la moelle	p 43
1.6.2	Les cellules souches de la moelle en cardiopathie ischémique	p 43
1.6.2.1	Les cellules souches hématopoïétiques CD133+	p 45
1.6.2.1.1	L'étude COMPARE-AMI	p 46
1.6.2.1.2	L'étude IMPACT-CABG	p 47
1.6.3	Les limitations de la thérapie cellulaire en cardiopathie ischémique	p 49
1.6.4	L'optimisation des cellules souches	p 50
1.6.4.1	Les modulateurs d'HSP90	p 52
	<u>Préambule</u>	p 54
	<u>Chapitre 2 – Hypothèse et objectifs</u>	p 55
	<u>Chapitre 3 – Méthodes</u>	p 57
	<u>Chapitre 4 – Résultats</u>	p 65
	<u>Chapitre 5 – Discussion</u>	p 83
	<u>Chapitre 6 – Conclusion</u>	p 93
	Références	p 95

Liste des tableaux

Tableau 1.	Différences démographiques, cliniques et procédurales entre COMPARE-AMI et IMPACT-CABG	p 65
Tableau 2.	Proportion des patients recevant la thérapie cellulaire ayant des échantillons adéquats pour analyse	p 67
Tableau 3.	Contrôle de la qualité de l'ARN	p 68
Tableau 4.	Protéines sécrétées dans le milieu par des CSMh conditionnées	p 76

Liste des figures

Figure 1.	Différences d'expression transcriptomique entre les cellules des études COMPARE-AMI et IMPACT-CABG	p 69
Figure 2.	Patrons d'expression des cellules CD133+ de COMPARE-AMI	p 71
Figure 3.	Patrons d'expression des cellules CD133+ d'IMPACT-CABG	p 72
Figure 4.	Représentation réseau des gènes partagés entre les catégories de gènes des patients répondeurs	p 73
Figure 5.	Cinétique d'activation de CSMh stimulés au Célastrol	p 75
Figure 6.	Sécrétion d'exosomes par CSMh conditionnées	p 77
Figure 7.	L'expression de marqueurs de surface de CSMh demeure inchangée malgré un traitement au Célastrol	p 78
Figure 8.	Expression génique de CSMh traitées au Célastrol en condition de normoxie et d'hypoxie	p 79
Figure 9.	Fermeture de plaie au HUVECs en co-culture de CSMh conditionnées avec des inhibiteurs d'HSP90	p 81
Figure 10.	Congélation et décongélation de CSMh et de CD133+ traitées avec un analogue du Célastrol	p 82
Figure 11.	Le conditionnement des CSMh avec un analogue du Célastrol semble conférer une protection contre la sénescence oxydative	p 83

Liste des sigles et abréviations

AS – athérosclérose

ATP – adénosine triphosphate

CI – cardiopathie ischémique

CM – cardiomyocytes

CS – cellules souches

CSE – cellules souches embryonnaires

CSH – cellules souches hématopoiétiques

CSM(h) – cellules souches mésenchymateuses (humaines)

CSP(i) – cellules souches pluripotentes (induites)

DRO – dérivés réactifs de l’oxygène

FEVG – fraction d’éjection ventriculaire gauche

HFpEF – insuffisance cardiaque à fraction d’éjection préservée

HFrEF – insuffisance cardiaque à fraction d’éjection réduite

HSP – protéine de choc thermique

HUVEC – human umbilical vein endothelial cells

IC – insuffisance cardiaque

ICP – intervention coronarienne percutanée

IM – infarctus du myocarde

MACE – major adverse cardiovascular events

MCAS – maladie coronarienne athérosclérotique

MEC - matrice extra cellulaire

MMP – métalloprotéinase

NO – oxyde nitrique

NSTEMI – infarctus du myocarde sans sus-décalage du segment ST

NYHA – New York Heart Association

RISK – reperfusion injury salvage kinase

SCA – syndrome coronarien aigu

SEM – stent à élution médicamenteuse

SM – syndrome métabolique

SMN – stent métallique nu

STEMI – infarctus du myocarde avec sus-décalage du segment ST

TIMPs – métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs

TNF- α – facteur de nécrose tumorale

VEGF – facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

À Norman, Giselle, Jonathan

Remerciements

Par la présente, je souhaite exprimer toute ma reconnaissance à plusieurs personnes importantes sans lesquelles ce mémoire de maîtrise n'aurait pas été possible. Merci aux membres des équipes Cailhier et Noiseux qui m'ont épaulé tout au long de cette aventure.

Merci au Dr Cailhier pour votre mentorat et votre appui ces dernières années. En dépit de quelques défis, j'ai pu en tout temps compter sur vous et vos conseils. Vous avez été un individu clé dans mon cheminement et, pour cela, je ne peux suffisamment vous dire toute ma gratitude. Merci pour votre joie de vivre et votre sens de l'humour qui m'ont remonté le moral quand j'en avais besoin. Merci aussi pour votre passion pour la science et la recherche qui m'ont toujours poussé à aller plus loin.

Merci à Typhaine et Patrick pour votre aide dans mon cheminement, votre empathie et votre camaraderie. J'ai énormément aimé œuvrer à vos côtés et je vous souhaite beaucoup de succès dans vos réalisations futures, qu'elles soient d'ordre professionnel ou personnel.

Merci au Dr Noiseux pour votre encouragement et votre soutien implacable. J'admire grandement votre éthique de travail et votre capacité à marier vos divers intérêts que ce soit, entre autres, en chirurgie, en recherche ou en entrepreneuriat. J'ai beaucoup appris grâce à vous, tant sur le plan humain que sur le plan des sciences fondamentales et, pour cela, je vous en suis redevable. Je vous souhaite le meilleur et je ne doute pas de tous vos succès à venir.

Merci à Shant. Sans vous, ce travail n'aurait peut-être jamais vu le jour. Merci pour votre appui et vos conseils qui ont fait en sorte au projet d'évoluer et de prendre de l'ampleur. Votre expertise dans l'analyse des données et des résultats m'a été d'un grand secours.

Merci à Mélanie pour tes recommandations, ta disponibilité et ta rapidité d'exécution. Merci aussi à Henry pour tes apports et ta collaboration qui m'ont mené à devenir un chercheur plus aguerri.

Merci également à Johanne et Doris pour votre aide à la révision de ce texte.

Identification en thérapie cellulaire des patrons d'expression transcriptomique de cellules souches pour la défaillance cardiaque pour améliorer le pouvoir thérapeutique

Chapitre 1 – Introduction

1.1 Aperçu du système cardiovasculaire

Le système cardiovasculaire, composé du sang, du réseau vasculaire et du cœur, est le premier système d'organes à se développer dans l'embryogenèse [1]. Chez l'humain, il a évolué afin d'accomplir de nombreuses tâches complexes essentielles incluant, entre autres, la création d'une circulation sanguine afin d'approvisionner les tissus en nutriments selon la demande, de faire transiter les déchets pour qu'ils soient métabolisés et de participer aux échanges et au transport gazeux pour permettre aux éléments formés du sang d'accomplir leurs tâches d'entretien, de défense et de réponse aux insultes [2]. Pour ces raisons, le système cardiovasculaire est le pilier physiologique fondamental sur lequel repose le fonctionnement optimal de tout organe du corps humain.

1.1.1 Le sang, les vaisseaux sanguins et la circulation

Le sang est composé de plasma (55%) et d'éléments cellulaires incluant des globules rouges (érythrocytes, 44% - échanges gazeux), des globules blancs (1% - défense, immunité et entretien) et des plaquettes (hémostase). Majoritairement aqueux le plasma agit comme solvant pour assurer le transport de substances et de cellules. Les éléments cellulaires du sang se renouvellent constamment, leur durée de vie étant généralement limitée. Ce processus de remplacement se nomme l'hématopoïèse. Chez l'adulte, il a lieu majoritairement au niveau de la moelle osseuse de certains os, mais aussi, dans certaines circonstances, de façon extramédullaire au niveau du foie et de la rate [3, 4]. Ce sont les cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui

permettent à cette genèse de se produire. Elles possèdent une capacité d'autorenouvellement, mais peuvent aussi s'engager dans des voies de différenciation pour mener à des cellules souches progénitrices (lymphoïdes, myéloïdes) qui, à terme, donnent naissance aux éléments cellulaires du sang [5].

Le sang circule dans le corps grâce à une série de vaisseaux sanguins organisés en deux circuits distincts. Riche en oxygène et nutriments, le sang est pompé par le cœur gauche au réseau systémique et aux organes, distribués majoritairement en parallèle, par le système artériel (artères et artérioles) pour finalement être acheminé aux tissus et aux capillaires où les échanges gazeux et métaboliques ont lieu [6]. Ainsi désoxygéné et riche en produits dérivés, le sang transite ensuite par le système veineux composé de veinules et de veines. Le tout converge finalement pour rejoindre le cœur droit qui, à son tour, pompera le sang au circuit pulmonaire afin de le réoxygéner. Le sang oxygéné est donc transporté par le réseau artériel (outre les veines pulmonaires) et le sang désoxygéné par le réseau veineux (outre l'artère pulmonaire).

De taille et de composition diverses, les vaisseaux sanguins sont des structures dynamiques. Ensemble, ils forment un réseau fonctionnel complexe qui assure le développement et l'homéostasie de l'organisme [7, 8]. De façon générale, les vaisseaux sont composés d'une lumière et d'une paroi. La taille de la lumière d'un vaisseau dépend de sa proximité au cœur (soit en amont ou en aval) et de la proportion des composantes de sa paroi. Les artères deviennent progressivement plus petites au fur et à mesure qu'elles s'éloignent du cœur. L'aorte est le plus gros vaisseau artériel chargé de la distribution sanguine et de l'amortissement du pouls [9]. Progressivement, elle se divise en artères de plus en plus petites qui sont impliquées dans des fonctions de distribution et de résistance pour finalement devenir des artérioles qui participent largement à la résistance du circuit [8]. Ces dernières se terminent en capillaires, des vaisseaux d'à peine 0.006-0.010mm de diamètre, où les échanges gazeux et métaboliques ont lieu [6]. Les capillaires mènent ensuite à des veinules et veines qui jouent le rôle clé de capacitance du système pour finalement aboutir dans les veines caves, lesquelles rejoignent le cœur.

L'intima, la média et l'adventice constituent les trois couches distinctes de la paroi des vaisseaux sanguins. Leur composition est complexe et varie en fonction de la taille et du type de vaisseau. L'intima est composée d'une couche continue de cellules endothéliales qui forment

l'endothélium du système cardiovasculaire et dont le rôle est primordial pour, notamment, la filtration de fluide, le contrôle du tonus vasculaire, l'hémostase, le recrutement de leucocytes et le transit hormonal [10, 11]. Les propriétés du flux sanguin et des forces de cisaillement dans les vaisseaux ont un effet modulateur important sur les fonctions des cellules endothéliales [12]. Dans les vaisseaux artériels plus larges, l'intima est séparée de la média par une membrane élastique interne. La média des artères est en général la couche la plus épaisse dominée par des cellules musculaires lisses et des fibres élastiques (composantes qui varient en fonction de la taille de l'artère). Les plus grosses artères ont une média séparée de l'adventice par une membrane élastique externe. L'adventice se compose de fibroblastes, de nerfs périvasculaires et de microvaisseaux encaissés dans une matrice extracellulaire (MEC) riche en collagène. Elle joue un rôle complexe et dynamique déterminant dans la croissance, l'inflammation et la réparation de la paroi des artères [13]. Puisque le débit sanguin dans la lumière des vaisseaux est très rapide et que la paroi composée de cellules trop épaisses, des microvaisseaux, nommés vasa-vasorum, pénètrent l'adventice des artères ainsi que la média et l'adventice des veines afin de les entretenir. La prépondérance de pathologies artérielles comparativement aux maladies veineuses s'explique en partie par la tension murale plus prononcée dans les vaisseaux artériels sur les vasa-vasorum, créant des limites plus périphériques dans des vaisseaux artériels sous pression et diminuant ainsi les échanges possibles et nécessaires au maintien de cette paroi [14, 15].

En comparaison, les veines possèdent une média plus mince composée, elle aussi, de cellules musculaires lisses et de fibres de collagène [16]. L'adventice est plus épaisse et sa composition est semblable à celle des artères. Comme chez leurs équivalents artériels, des fibres des systèmes sympathétique et parasympathétique en innervent les parois afin d'en contrôler le tonus musculaire et de permettre une régulation basée sur les demandes de l'organisme.

1.1.2 Le cœur et les cardiomyocytes

Organe musculaire situé dans le thorax, dans un espace appelé médiastin, le cœur est séparé des autres structures adjacentes par une enveloppe fibroélastique, le péricarde. Même

si son rôle semble simple, il est cependant crucial. Qualitativement : il pompe le sang; quantitativement : il pompe le sang à un certain rythme et à un certain volume pour assurer un débit sanguin adéquat et ainsi maintenir l'homéostasie corporelle en réponse à des demandes physiologiques fluctuantes [17]. Le cœur comporte quatre chambres : une oreillette et un ventricule droit (VD) ainsi qu'une oreillette et un ventricule gauche (VG), chacun divisé par une valve atrioventriculaire respective, tricuspide et mitrale [2]. Grâce à un couplage électromécanique, les oreillettes reçoivent le sang provenant de la circulation en amont et se contractent afin de remplir leur ventricule respectif en aval [18]. Des cellules spécialisées se retrouvant à la hauteur du nœud sinusal (situé à la jonction de la veine cave supérieure et de l'oreillette droite) génèrent automatiquement un potentiel électrique à une fréquence donnée. Ce potentiel se propage à travers le myocarde par un système de conduction qui assure une dépolarisation séquentielle. [19]. Le couplage de cette dépolarisation à la contraction de cellules cardiaques musculaires spécialisées (cardiomyocytes - CMs) mène à un cycle complexe d'excitation-relaxation musculaire et, ultimement, à des contractions musculaires efficaces, séquentielles et coordonnées, qui permettent aux oreillettes et aux ventricules de se remplir et d'éjecter. Suivant l'oreillette, le ventricule se contracte à son tour et propulse le sang dans sa circulation propre, soit la circulation pulmonaire à droite ou la circulation systémique à gauche. Séparées par leurs valves respectives, la valve pulmonaire et la valve aortique, ont pour rôle de permettre un remplissage adéquat des différentes chambres cardiaques et d'assurer un flot unidirectionnel [20]. Le système droit permet à l'échange gazeux d'avoir lieu dans les capillaires pulmonaires, le système gauche fait circuler ce sang oxygéné dans le réseau vasculaire aux différents tissus et organes du corps humain.

La paroi du cœur est composée d'une fine couche de péricarde viscéral qui recouvre le cœur (aussi nommé épicarde), d'une couche musculaire principale du cœur (le myocarde) et d'une surface interne faisant interface avec le sang circulant (l'endocarde). Les CMs, la MEC et la microcirculation capillaire, qui dessert les unités contractiles, constituent les trois composantes essentielles du myocarde [21]. La contraction du myocarde est responsable de la génération de pression nécessaire à surmonter les résistances en aval afin d'établir un gradient de pression et

de faire circuler le sang. Puisque les résistances systémiques sont plus élevées que les résistances pulmonaires, le myocarde du ventricule gauche est plus épais et développé [22].

Les artères coronaires, nommées ainsi en raison de leur répartition en couronne sur le cœur, sont les artères principales qui fournissent le sang au myocarde. Elles proviennent de l'aorte proximale, généralement dans les sinus aortiques droit et gauche [23]. Les divisions principales de ces artères sont l'artère coronaire droite (CD; sinus droit) et le tronc commun (TC; sinus gauche) qui se divise en artère interventriculaire antérieure (IVA) et artère circonflexe (CX) [24]. Ces artères suivent un parcours épicaudique anatomique généralement habituel. Elles subviennent aux besoins métaboliques du territoire cardiaque qu'elles desservent. Les artères coronaires sont essentielles au bon fonctionnement du cœur, leur perturbation et/ou occlusion pouvant engendrer rapidement des conséquences fonctionnelles allant de la mort cellulaire, voire même au décès du patient, l'importance des répercussions étant déterminée par la nature du territoire atteint et la durée de la perturbation artérielle [25]. Le cœur comporte aussi un réseau de veines cardiaques qui drainent le cœur et se retrouvent habituellement parallèles aux artères coronaires.

Les cellules principales du myocarde faisant partie des premières à se différencier de façon terminale dans l'organogénèse du cœur sont les CMs. Même si on a déjà cru qu'un nombre déterminé de cardiomyocyte existait, des évidences plus récentes démontrent qu'un renouvellement annuel de ces cellules se produit à un taux d'environ 1%/année à l'âge de 25 ans et diminue progressivement pour s'établir à environ 0.45% à l'âge de 75 ans [26]. Histologiquement, les CMs sont composés d'un noyau central, d'éléments contractiles et striations régulières, de mitochondries abondantes, et se situent à proximité de réseaux de capillaires. Leur métabolisme est largement aérobique. Les CMs sont responsables du couplage de trois processus : un système d'excitation via le sarcolemme permettant d'initier le processus de contraction, un système intracellulaire de couplage d'excitation-contraction qui convertit le signal mécanique en signal chimique et, enfin, un système contractile basé sur des interactions entre l'actine et la myosine. D'un point de vue fonctionnel, ces cellules contractiles et excitables sont responsables de la contraction cardiaque grâce à l'exécution du processus d'excitation-contraction [27]. En effet, la dépolarisation de la membrane par le potentiel d'action électrique

assure l'ouverture de canaux calciques situés au niveau de la membrane cellulaire et des tubules transverses. Cette entrée de calcium, bien que limitée initialement, provoque l'ouverture de canaux calciques au niveau du réticulum sarcoplasmique, ce qui augmente drastiquement la concentration intracellulaire de calcium. Le calcium se lie à la troponine, entraînant un glissement entre les filaments d'actine et de myosine, un raccourcissement cellulaire et, dans son ensemble, une contraction musculaire [28]. Grâce à des structures nommées discs intercalés, les CMs peuvent agir comme syncytium.

Le cycle cardiaque est donc déterminé par la progression des étapes de contraction et de relaxation des oreillettes et des ventricules. Il est séparé en systole et en diastole; la systole étant la période d'éjection et la diastole celle de remplissage. Via des gradients de pression générés par le couplage électromécanique, les contractions musculaires et l'unidirectionnalité du flux sanguin assurée par les valves, les chambres cardiaques se remplissent et se vident graduellement permettant d'assurer les circulations pulmonaire et systémique. Le débit cardiaque par minute est déterminé par le volume d'éjection systolique par battement et la fréquence cardiaque (nombre de battements par minute). Le volume d'éjection systolique peut être affecté par la taille du cœur, sa contractilité ainsi que par des conditions qui limitent son remplissage (précharge) et la résistance offerte en aval (postcharge). La fréquence cardiaque dépend de certains facteurs comme l'âge du patient, sa réserve physiologique et l'innervation autonome

Extrêmement complexe, le système cardiovasculaire dont l'homéostasie est maintenue par une hiérarchie de procédés génétiques et épigénétiques influencée elle-même par des processus biologiques et mécaniques. Le maintien de ce système, par les fonctions cellulaires physiologiques des tissus et l'apport du système immunitaire, est essentiel à son bon fonctionnement. Cet aperçu effleure à peine l'étendue de ces mécanismes. Toutefois, des atteintes des vaisseaux peuvent perturber ces fonctions. Au Canada, la maladie cardiovasculaire est la deuxième cause de mortalité comptant pour environ 20% des décès annuels [29].

1.2 L'insuffisance cardiaque ischémique

1.2.1 Définition de l'insuffisance cardiaque ischémique

Environ 64,3 millions de personnes à travers le monde vivent avec l'insuffisance cardiaque (IC); la prévalence connue dans les pays développés est d'environ 1-2% [30]. Syndrome complexe, l'insuffisance cardiaque (IC) découle d'une anomalie cardiaque structurelle ou fonctionnelle qui mène à une livraison inefficace d'apports en oxygène par rapport aux demandes tissulaires et se manifeste cliniquement par le développement de signes et de symptômes [31]. L'insuffisance cardiaque peut être causée par plusieurs entités cliniques, mais le facteur le plus fréquent demeure la cardiomyopathie ischémique. La défaillance cardiaque est hétérogène, d'apparence aiguë ou chronique et diagnostiquée par des critères établis (eg : Framingham Heart Failure Criteria) [32]. Elle comporte un pronostic variable qui peut être évalué au besoin par des calculateurs de risques, mais qui demeure généralement sombre; la mortalité à 5 ans étant estimée à 43% [30, 33, 34].

L'IC se caractérise chez le patient atteint par la présence de signes et symptômes ainsi que par le degré d'impact de la maladie sur sa fonction cardiaque. Ceux qui en souffrent peuvent rapporter des signes cliniques comme, notamment, une turgescence jugulaire, une tachycardie, un souffle galop B3, une surcharge pulmonaire et/ou une hépatomégalie. Les symptômes les plus fréquemment rapportés sont : l'orthopnée, la dyspnée et la dyspnée paroxystique nocturne, la diminution de la tolérance à l'effort et/ou un œdème périphérique. En clinique, la symptomatologie des patients est souvent décrite par la classification fonctionnelle NYHA [35].

La défaillance cardiaque peut également être classée selon le ou les côtés du cœur qui sont atteints (droit vs gauche vs biventriculaire; bien que la défaillance gauche soit la plus commune) ainsi que par le mécanisme de la défaillance (systolique vs diastolique vs multifactoriel). L'échographie transthoracique permet le plus souvent d'établir les répercussions de la maladie sur le cœur, cette modalité étant très utile pour le suivi des patients [36]. La fraction d'éjection ventriculaire gauche est la donnée échographique la plus fréquemment utilisée pour évaluer la fonction cardiaque globale au moment de l'évaluation. Selon cette valeur,

des catégories de défaillances cardiaques ont été établies : la HFrEF (insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite, <40%), HFmrEF (mid-range, 40-49%) et HFpEF (préservée, ≥50%) [31, 37]. Pour les patients atteints de HFmrEF ou HFpEF, des critères additionnels s'avèrent nécessaires pour établir un diagnostic de défaillance : la présence d'une augmentation de facteur natriurétique auriculaire et un critère supplémentaire d'évidence d'hypertrophie ventriculaire gauche et/ou de dilatation auriculaire gauche et/ou de dysfonction diastolique.

La physiopathologie HFpEF étant moins bien élucidée, cette condition devient plus difficilement diagnostiquée et moins souvent associée à la cardiomyopathie ischémique; elle représente tout de même environ 50% des cas de défaillance cardiaque [38]. Autrefois, la présence de dysfonction diastolique était mise en cause pour son syndrome. Plus récemment, des évidences semblent suggérer un syndrome multiorganes complexe impliquant plusieurs anomalies coexistantes telles que : une diminution de la fonction ventriculaire gauche sur le long axe, une dysfonction systolique ventriculaire droite, une hypertension pulmonaire, une incompétence chronotropique/dysfonction autonome, une dysfonction vasculaire systémique, des effets restrictifs péricardiques ainsi qu'anomalies cardio-rénales, entre autres [39].

Des subphénotypes de patients atteints de défaillance démontrent que la MCAS est la cause principale d'HFrEF (47%), même si elle n'explique que 23% des cas d'HFpEF [40]. En plus que la MCAS, l'HFrEF peut être provoqué par une cardiomyopathie dilatée idiopathique, des valvulopathies, des myocardites, des arythmies, de l'hypertension artérielle, des maladies congénitales, ou par des substances telles que l'alcool et certaines drogues. La physiopathologie du HFrEF demeure complexe et découle des effets du remodelage ventriculaire gauche et, conformément à son nom, elle comporte toujours une composante de fonction systolique ventriculaire gauche abaissée. Lorsque les mécanismes compensatoires sont dépassés et la fibrose cardiaque détectée, une dysfonction graduelle ventriculaire typiquement gauche s'installe (la dysfonction droite étant habituellement secondaire à des causes autres). Plus elle progresse, plus elle se traduit par une diminution du débit cardiaque, une augmentation des pressions de remplissage et une diminution de la capacité à se relaxer lors du remplissage. Cette phase, appelée phase décompensée, se caractérise par une augmentation du stress mural, une

augmentation de la demande en O₂, une dyssynchronie et une diminution de l'efficacité de la pompe cardiaque. Ces processus sont compliqués par des facteurs hémodynamiques. La surcharge volémique et/ou de pression mène à une réorganisation des sarcomères causant respectivement une hypertrophie concentrique ou excentrique.

1.2.2 L'athérosclérose et la maladie coronarienne athérosclérotique

L'athérosclérose (AS), maladie inflammatoire chronique caractérisée par un dépôt de lipides dans l'intima des vaisseaux artériels, est la cause de la maladie coronarienne athérosclérotique (MCAS) responsable en grande partie de la cardiopathie ischémique (CI). Des concentrations élevées de triglycérides circulants et de cholestérol transporté par des lipoprotéines favorisent le développement de l'AS.

Un endothélium vasculaire sain joue un rôle important dans la modulation du tonus vasculaire via la synthèse et la sécrétion de facteurs vasodilatateurs, dont l'oxyde nitrique (NO) et la prostacycline (PGI₂), en exprimant de faibles niveaux de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) et d'acide urique [10, 11]. De plus, il démontre des propriétés anticoagulantes (faibles niveaux d'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1), de facteur von Willebrand (vWF) et de P-sélectine), anti-inflammatoires [faibles niveaux de molécule d'adhérence aux cellules vasculaires soluble (sVCA) et intracellulaire (sICAM), protéine C-réactive (CRP), facteur de nécrose tumorale (TNF- α), et d'interleukin-6 (IL-6)] et exhibe des caractéristiques proréparation (présence de cellules endothéliales progénitrices) [10]. À l'inverse, un endothélium dysfonctionnel présente une diminution de sa capacité à la vasodilatation, une augmentation du stress oxydatif, des dommages liés aux radicaux libres ainsi qu'un phénotype procoagulant et inflammatoire. En revanche, des facteurs liés au flux sanguin dans un vaisseau semblent avoir un impact sur l'endothélium. En effet, des forces de cisaillement du flux sanguin ont également des effets modulateurs importants sur la fonction endothéliale : un flux laminaire ayant des effets athéroprotecteurs comparativement à un flux turbulent qui stimule une signalisation pro-inflammatoire [12]. Des lésions athérosclérotiques précoces tendent à se développer dans des zones de perturbation du flux laminaire, notamment au niveau de division et de bifurcations [41].

La dysfonction endothéliale et la rétention subendothéliale intimale de lipoprotéines résultant des interactions ioniques entre les apolipoprotéines B100 (ApoB100) et les protéoglycans de la MCE représentent les événements initiaux de la formation d'une plaque athérosclérotique, l'inflammation ayant un rôle important à jouer dans l'initiation et la progression de cette plaque [42-44]. Ces lipoprotéines sont oxydées par des modifications enzymatiques de myeloperoxydases, de lipoxygénases et de DROs, formant un spectre de molécules ayant subi une variété de changements physicochimiques. Agissant comme motifs associés aux dommages cellulaires (DAMPs), ces molécules activent l'expression de protéines impliquées dans la chimiotaxie, l'adhésion cellulaire et la migration, dont MCP-1, IL-8, VCAM-1 par les cellules vasculaires endothéliales [45]. Ces signaux incitent le roulement et l'adhésion à l'endothélium des lymphocytes et monocytes circulants. Les monocytes, surtout ceux exprimant préférentiellement de hauts niveaux de Ly6C ou Gr-1, se différenciant en macrophages, expriment des récepteurs de type Toll et éboueurs, et ingèrent les dépôts de LDL oxydés afin de les éliminer [46]. Ce phénomène étant lié à l'activation et la prolifération de cellules vasculaires musculaires lisses, il contribue à la guérison de plaies.

Cela dit, une dysfonction du métabolisme lipidique des macrophages mène à une diminution de l'efflux de cholestérol, une augmentation de l'apoptose et une diminution de l'efferocytose (phagocytose des cellules apoptotiques). Ces cellules se transforment en cellules spumeuses et contribuent à un état inflammatoire chronique [47]. Une production additionnelle de médiateurs inflammatoires et proathérogéniques par les lymphocytes T contribue à la progression de la lésion [48]. Une prolifération intimale inappropriée déclenchée par cet état inflammatoire et une synthèse continue de composante de MCE par les cellules musculaires lisses génèrent une plaque fibromusculaire. Un remodelage structurel entraîne la formation d'un cap fibreux. Les cellules dendritiques permettent d'établir un lien entre la réponse immunitaire innée et la réponse adaptative par présentation antigénique de dérivés lipoprotéiques à des lymphocytes T et B. La réponse lymphocytaire d'un côté vise à favoriser l'inflammation via des effets cellulaires et humoraux (réponse T_H et B), tandis que des lymphocytes T_{reg} tendent à en minimiser les effets. Les macrophages activés sécrètent des cytokines proinflammatoires, des DROs et des enzymes protéolytiques. Une progression de la plaque peut mener à une réduction

progressive (sténose) de la lumière de l'artère, conduisant à un apport insuffisant en oxygène en aval et de l'ischémie dans ces tissus. Une expression soutenue de DROs ainsi qu'une sécrétion de métalloproteinases (MMPs) conduisent à la dégradation de fibres de collagène dans la MCE de la plaque pouvant mener à son instabilité et potentiellement à sa rupture [49]. Lorsqu'il y a rupture de la plaque, le matériel hautement thrombogénique déversé en intravasculaire active les mécanismes de coagulation et la formation d'un thrombus qui peut directement oblitérer la lumière ou se détacher et former un embolie, jusqu'à bloquer la circulation en aval.

1.2.3 L'infarctus du myocarde

La progression importante d'une plaque athérosclérotique compromettant la lumière d'une artère coronaire mène éventuellement à un apport en oxygène insuffisant à fournir à la demande des tissus en aval et, par conséquent, à des répercussions cellulaires. Cliniquement, ceci se traduit le plus souvent par de la douleur thoracique rétrosternale appelée *angor pectoris*, ou angine de poitrine, qui se présente initialement lors d'efforts physiques augmentant le travail cardiaque et, conséquemment, la demande en oxygène. De manière générale, un syndrome coronarien aigu (SCA) consiste en un spectre d'événements laissant présager une rupture de plaque imminente et/ou une rupture avec thrombose et occlusion coronarienne partielle ou complète [50]. L'angine instable (AI) est donc une douleur non liée à l'effort qui suggère qu'une plaque est en voie de rupture, mais où il n'existe pas encore d'évidence biochimique de souffrance myocardique.

Le terme infarctus du myocarde (IM) aigu est défini par une insulte myocardique (\uparrow troponines sériques $>$ 99^e percentile de la limite supérieure de référence) avec mort cellulaire dans un cadre clinique d'ischémie myocardique [51]. Lorsqu'il y a réelle souffrance musculaire, mise en évidence par la présence sérique de troponine ou de créatinine kinase MB (CK-MB), une classification basée sur l'absence ou la présence d'élévation du segment ST à l'électrocardiogramme (ECG) permet de différencier le type et la sévérité de l'infarctus. Un IM sans élévation du segment ST (NSTEMI) est indicateur d'un infarctus sous-endocardique. Un IM avec élévation du segment ST (STEMI) indique plutôt un infarctus transmural et nécessite une

thérapie de revascularisation urgente. Un IM complété (non revascularisé) peut se manifester subséquemment par l'apparition d'onde(s) Q à l'ECG et indique pareillement un infarctus transmural [52].

Un IM (NSTEMI/STEMI) est donc un événement aigu qui résulte en une perte irréversible de CMs inévitablement liée à une perte de fonction (avec ou sans conséquence clinique) due au potentiel limité de régénération des CMs. Un outil de stratification de risque (Killip-Kimball) des patients en IM aigu selon leur symptomatologie est utilisé en clinique de façon routinière [53]. Ces patients, ayant souffert d'un syndrome coronarien aigu, sont plus à risques de subir un événement récidivant probablement en lien avec la réponse systémique aiguë qui aggrave l'athérosclérose, tel que démontré dans un modèle murin [54]. En général, les patients souffrant d'un NSTEMI auront des répercussions cardiaques moins graves puisque les conséquences ischémiques limitées à la portion sous-endocardique du cœur sont moins importantes, tandis que ceux victimes d'un STEMI subiront des répercussions plus extensives suite à la transmuralité de la souffrance myocardique. Le myocarde de la zone périphérique d'un territoire ischémique peut être hibernant, tandis que celui adjacent à un infarctus récent est plutôt sidéré [55]. Le relâchement de DAMPs par les CMs nécrotiques constitue la source principale de stimulation de la réaction inflammatoire. Par ailleurs, les cardiomyocytes de la zone périphérique de l'infarctus peuvent contribuer au processus inflammatoire en sécrétant des cytokines, chimiokines ainsi qu'une augmentation des molécules d'adhésion cellulaire (incluant ICAM-1) [56, 57]. Au final, l'intensité des répercussions dépendra de l'importance du territoire atteint, de la durée de la période ischémique et du degré de succès d'une stratégie de revascularisation [25]. Les patients souffrant d'angor, d'angine instable et ayant souffert de NSTEMI sont stratifiés selon leurs facteurs de risques et leur présentation clinique. Selon cette stratification et d'après les résultats de tests complémentaires effectués, il pourrait être nécessaire d'évaluer le niveau de la maladie athérosclérotique par angiographie afin de définir la maladie, d'offrir une thérapie de revascularisation ou de planifier un plan de traitement. Les évaluations complémentaires permettent aussi d'évaluer les potentielles répercussions sur la fonction ventriculaire. Les patients souffrant de STEMI ont besoin d'une intervention de revascularisation précoce.

1.3 Les options thérapeutiques pour l'infarctus du myocarde et de l'insuffisance cardiaque ischémique

1.3.1 La revascularisation précoce en STEMI

Des études phares de *Ross et coll.* au début des années 70 ont démontré qu'une reperfusion précoce d'artères coronaires canines occluses diminuait l'étendue de l'IM [58, 59]. De nos jours, une thérapie de reperfusion à moins de 12 heures de la présentation des symptômes diminue la mortalité des patients victimes de STEMI [60]. De façon routinière, dans les centres offrant des services d'hémodynamie, cette reperfusion a lieu par intervention coronarienne percutanée (ICP) grâce à des stents métalliques (soit à élution médicamenteuse (SEM) ou métallique nu (SMN)). Une stratégie de fibrinolyse est acceptable lorsqu'une procédure interventionnelle n'est pas envisageable dans un délai raisonnable ou, également, si l'état du patient en fait un mauvais candidat pour cette stratégie.

Au Canada, des lignes directrices de la Société canadienne de cardiologie préconisent une thérapie de revascularisation percutanée dans une fenêtre ≤ 120 minutes à partir du premier contact avec un professionnel de la santé jusqu'à l'implantation d'un dispositif (idéalement ≤ 90 minutes); une thérapie de fibrinolyse devrait être préférée si ce délai ne peut être respecté [61]. Lorsqu'il n'y a pas de contre-indication, les SEM de nouvelles générations sont préférés aux SMN en raison d'une incidence moindre de thrombose d'endoprothèse et de resténose et d'une diminution de réintervention sur la lésion ciblée [62]. Anciennement, une thrombectomie mécanique routinière par aspiration était suggérée comme thérapie adjuvante puisqu'elle offrait, en théorie, une meilleure restauration du flux sanguin, une réduction du potentiel d'embolisation distal et une diminution de la non-repermeabilisation [62]. Suite à deux études ne démontrant aucune différence d'issue clinique, ces recommandations ont été abandonnées [63, 64].

De 30 à 50% des patients se présentant en STEMI souffrent d'une MCAS multivaisseaux. Des études ont comparé le traitement concomitant de lésion(s) accessoire(s) au moment d'une ICP pour un STEMI à un traitement plutôt ciblé de la lésion coupable et d'une thérapie pharmacologique optimale. Cette stratégie semblerait diminuer le nombre de revascularisations

futures sans être associé à un degré significatif de mortalité ou morbidité augmentée. C'est la raison pour laquelle il est suggéré de considérer comme essentielle une revascularisation complète chez les patients suffisamment stables [61]; cette stratégie est défavorable chez des patients en choc cardiogénique, puisqu'associée à un risque de mortalité et/ou d'insuffisance rénale sévère à 30 jours (45.9% vs 55.4%; RR 0.83, IC 95% 0.71-0.96; p=0.01) [65].

1.3.2 *La revascularisation chirurgicale*

Les premières interventions chirurgicales de revascularisation coronarienne (pontages coronariens) avec un greffon de veine saphène (pontage aorto-coronarien, PAC) ont vu le jour dans les années 60 (Goetz, Sabiston, Kolessov, Favaloro). C'est en 1968 que Green effectue un pontage de l'IVA avec une artère mammaire interne gauche (pontage mammo-coronarien, PMC) et, depuis, le domaine est en constante évolution [66].

De nos jours, la chirurgie cardiaque de revascularisation est effectuée sous anesthésie générale et généralement par une sternotomie médiane. On utilise systématiquement la mammaire interne gauche pour revasculariser le territoire gauche, de nombreux autres vaisseaux peuvent être employés pour effectuer des pontages additionnels : la veine saphène, l'artère radiale, la mammaire interne droite, l'artère gastro-épiploïque. Chaque conduit présente ses avantages et ses inconvénients, mais outre la mammaire interne gauche-IVA, bien que certaines évidences suggèrent de façon observationnelle un bénéfice à la revascularisation artérielle, aucune stratégie de choix de conduit n'a nettement démontré sa supériorité sur une autre [67]. Les pontages peuvent être effectués via une cardioplégie et une circulation extra-corporelle (CEC) ou à cœur battant. Étant donné la difficulté technique de l'opération à cœur battant, le risque qui semble majoré de revascularisation incomplète et l'absence d'un bénéfice à long terme, cette technique est moins utilisée [68, 69]. Une fois opérés, les patients transitent habituellement par les soins intensifs puisqu'ils sont à risque de complications importantes (saignement, infarctus, arythmie), et qu'ils ont généralement besoin de support aminergique pour corriger une vasoplégie en lien avec la CEC. Le fonctionnement de la CEC et ses nombreux effets sont décrits

en détail dans une revue de *Sarkar et al.* [70]. Une fois stabilisés, ils peuvent quitter l'hôpital avec un suivi rapproché afin d'assurer un traitement pharmacologique optimal.

En général, la revascularisation chirurgicale n'est pas indiquée en STEMI aiguë, à moins qu'il n'y ait aucune autre option de reperfusion. Chez les patients souffrant de CI chronique et d'une MCAS significative, une chirurgie de pontage est offerte à ceux rencontrant certains critères, des facteurs de risques chirurgicaux acceptables et une anatomie favorable à une telle intervention. Plusieurs études comparant ICP et pontages rapportent une survie à long terme accrue chez les patients pontés, particulièrement chez ceux souffrant de maladie des trois vaisseaux et/ou avec implication du tronc commun et/ou diabétiques et/ou insuffisants rénaux ([71-73]). Au Canada, une chirurgie de revascularisation est recommandée par rapport à une ICP chez les patients qui sont des candidats opératoires adéquats et qui ont une maladie multivaisseaux complexes, une combinaison de maladies multivaisseaux/diabète ou une maladie sévère impliquant le tronc commun [74]. Les patients avec une dysfonction ventriculaire gauche significative (<35%) semblent aussi bénéficier de pontages comparés à un traitement médical optimal, mais ce bénéfice en comparaison au PCI chez ces patients n'est pas établi [75].

1.3.3 Le traitement non pharmacologique et le traitement médical de la HFrEF

Le lourd fardeau de l'insuffisance cardiaque rend son traitement primordial et sa prévention essentielle. L'exercice physique d'intensité modérée hebdomadaire diminue les chances de développer de l'IC [76]. Des habitudes de vie saines telles une diète équilibrée, le maintien d'un indice de masse corporel normal ainsi que l'absence de facteurs de risque (reliés au tabagisme, à la consommation d'alcool et de drogues récréatives, etc.) réduisent grandement les risques de développer de l'IC. Par surcroît, le traitement optimal des comorbidités associées au développement de MCAS ou de l'IC telles l'hypercholestérolémie, l'hypertension artérielle, le diabète et/ou la maladie coronarienne athérosclérotique est aussi indiqué [31]. Les patients atteints de HFrEF constituent des populations plus homogènes qui reçoivent de nombreuses thérapies pharmacologiques/non pharmacologiques prouvées, démontrant un clair bénéfice sur la mortalité cardiovasculaire et l'hospitalisation pour cause de défaillance cardiaque [39]. Le

contraire s'avère plutôt concluant chez les patients atteints de HFpEF : une population beaucoup plus hétérogène où aucun traitement améliorant la mortalité cardiovasculaire n'a encore été prouvé [77].

Les principes de base du traitement de la HFrEF sont plutôt simples : traiter la symptomatologie et la congestion, les facteurs précipitants ainsi que le mécanisme perpétuant [77]. Quant aux symptômes de congestion des patients en défaillance, ils sont généralement traités par des diurétiques alors que les facteurs précipitants (le développement de MCAS et l'IM) le sont grâce à des stratégies de revascularisation, de prévention de facteurs de risques et de traitements de comorbidités. L'accentuation du traitement à long terme du HFrEF est donc mise sur l'atténuation des facteurs neuroendocriniens perpétuants. En général, tous les patients souffrant d'HFrEF devraient se voir administrer une triple thérapie : un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACEi), un bêta-bloqueur (BB) et un inhibiteur du récepteur minéralocorticoïde (MRA) [78]. Ce consensus découle de nombreuses études cliniques randomisées démontrant que ces thérapies sont individuellement associées à une réduction de la mortalité par des mécanismes qui leur sont propres. Les patients intolérants aux ACEi à cause de certains effets secondaires peuvent être traités avec des antagonistes des récepteurs de l'angiotensine (ARB) [79]. Ceux qui demeurent symptomatiques malgré une triple thérapie optimale devraient voir leur ACEi/ARB changé pour un antagoniste de la néprilysine et des récepteurs de l'angiotensine (ARNI) [80]. Dans certains cas, des modulations pharmacologiques du système de conduction peuvent même être requises (incluant la modulation du courant I_f) [81]. La symptomatologie et la fraction ventriculaire gauche des patients devraient par la suite être suivies [31]. Selon ces variables, des thérapies pharmacologiques supplémentaires peuvent être envisagées (hydralazine, nitrates, digoxine). La thérapie pharmacologique étant complexe et en continuelle progression, les sociétés nationales cardiovasculaires émettent chacune des lignes directrices extensives, qui citent les évidences les plus récentes [31], AHA, ESC). De plus, de nombreuses molécules sont actuellement en développement et de nouvelles cibles potentielles en constante recherche [78].

1.3.4 *Les thérapies avancées, le support mécanique et la greffe*

Les patients souffrant de HFrEF avec une FE $\leq 30\%$ (35% si symptomatiques) et une espérance de vie de plus de 1 an peuvent bénéficier d'un défibrillateur automatique implantable (ICD) [82]. De plus, une dyssynchronie électrique se manifestant par un QRS élargi (≥ 130 ms) est associée à des résultats cliniques défavorables; environ 33% des patients HFrEF en sont atteints. Les patients symptomatiques avec un FE $\leq 35\%$ et un QRS élargis peuvent, quant à eux, bénéficier d'une thérapie de resynchronisation [31].

Ceux qui souffrent d'insuffisance cardiaque réfractaire malgré une thérapie pharmacologique optimale, avec des symptômes marqués au repos et des hospitalisations récidivantes, sont admissibles à des thérapies avancées. En cas d'échec à la thérapie standard, ces thérapies incluent l'usage chronique d'inotrope, de support mécanique, de greffe et/ou de soins palliatifs. La greffe cardiaque demeure la dernière option thérapeutique pour les patients atteints de défaillance cardiaque terminale, elle est limitée par des critères astringents et par la quantité de donneurs disponibles. En 2019, seulement 42 cœurs ont été transplantés au Québec [83].

Les stratégies conventionnelles interventionnelles limitent la durée et l'étendue de l'ischémie myocardique et de ses répercussions. Le contrôle des facteurs de risques et les traitements pharmacologiques de la CI et de l'IC retardent la progression de la maladie. Ensemble, ces avancées techniques semblent diminuer l'incidence de HFrEF mais le vieillissement de la population fait en sorte que la prévalence de la maladie ne cesse d'augmenter. Dans tous les cas, il n'existe pas de thérapie réparatrice et régénératrice du myocarde endommagé permettant une récupération fonctionnelle. Afin de développer des thérapies novatrices qui pourraient justement adresser ces lacunes, il faut d'abord comprendre les mécanismes pathophysiologiques clés en cardiopathie ischémique.

1.4 Mécanismes pathophysiologiques clés en maladie cardiaque ischémique

Les mécanismes moléculaires et cellulaires déclenchés suite à un IM ou lors de CI sont multiples et complexes. Au niveau moléculaire, ils comportent des processus en lien avec l'augmentation de DROs et du découplage des espèces réactive de l'azote (ERA), l'ouverture des pores de perméabilité de mitochondries et la sécrétion de cytochrome c, et les remaniements définitifs de la structure myocardique [84]. Les mécanismes cellulaires clés sont eux en lien avec l'angiogenèse, la réponse cellulaire au stress, l'insulte ischémie-reperfusion ainsi que la guérison et le remodelage ventriculaire. Une compréhension approfondie de ces mécanismes pathologiques est nécessaire afin de développer des stratégies pour les contrer.

1.4.1 *L'angiogenèse et l'artériogénèse*

De manière générale, trois mécanismes de formation de nouveaux vaisseaux sanguins existent : la vasculogénèse (surtout lors du développement embryonnaire et la différenciation de cellules endothéliales progénitrices), l'angiogenèse et l'artériogénèse. Chez l'adulte, l'angiogenèse constitue un processus essentiel au développement de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants. L'activité métabolique des tissus et leur demande fonctionnelle en oxygène jouent un rôle clé favorisant la formation et le développement de ces réseaux vasculaires (spécifiquement les stimulus d'ischémie, d'hypoxie et d'inflammation) [85]. Des facteurs hémodynamiques sont aussi critiques pour la survie de ces réseaux et l'adaptation structurelle de leur paroi. L'angiogenèse par germination est initiée dans des tissus pauvrement perfusés via la détection de l'hypoxie et la sécrétion d'un facteur proangiogénique par les cellules parenchymateuses adjacentes : le VEGF-A [86]. Des régions de l'endothélium vasculaire sont désignées comme cellules de pointes et guident la formation de boutons capillaires vers le(s) stimulus angiogène(s) [87]. Des filopodes, extensions filamenteuses exprimant de façon significative des récepteurs VEGF-A (VEGFR2), sécrètent des enzymes protéolytiques qui dégradent la MEC tout en guidant le néo-capillaire selon le gradient de VEGF. Lorsque la

formation de capillaire est terminée, sa maturation nécessite le recrutement de péricytes, afin d'établir et de stabiliser la MEC. Des forces de cisaillement et d'élasticité résultant de la pression et du flux circulatoire deviennent aussi des signaux mécaniques importants à la maturation et au maintien vasculaire [88]. L'artériogénèse fait référence au remodelage de ces nouveaux conduits vasculaires en de plus gros vaisseaux musculaires collatéraux [89].

En maladie cardiaque ischémique, la formation de nouveaux vaisseaux peut être néfaste, comme elle peut avoir des effets bénéfiques [90]. Comme mentionné précédemment, les vasa-vasorum sont des microvaisseaux présents dans l'adventice de la paroi des vaisseaux. Multiples, les stimulus pour de l'angiogenèse en athérosclérose impliquent des voies de signalisation déclenchées par une hypoxie (expression du facteur de transcription induit par l'hypoxie), de l'inflammation et/ou la présence de DROs [91]. En réponse à cette signalétique moléculaire, les vasa-vasorum s'élargissent et développent des réseaux désorganisés qui infiltrent la plaque athérosclérotique, jusqu'à devenir une porte d'entrée pour les lipoprotéines circulantes et les cellules inflammatoires [92]. Via plusieurs mécanismes décrits précédemment, cette infiltration pourrait mener à la progression du noyau nécrotique de la plaque et causer des microhémorragies à ce niveau (secondaire à une structure fragile et une diminution de l'intégrité endothéliale) et ainsi contribuer à son instabilité et augmenter son risque de rupture [91].

À l'inverse, certains processus angiogéniques en CI apparaissent plutôt bénéfiques. Le développement d'artères collatérales est un mécanisme clé complexe qui permet de restaurer un certain flux sanguin dans le territoire ischémique du myocarde et protège le myocarde à risque [93]. La circulation collatérale est un réseau spécialisé de vaisseaux qui contourne le réseau principal [94]. La formation et le développement de ces collatérales, via l'expansion et le remodelage d'anastomoses entre artérioles, nécessitent un événement telles une ischémie myocardique et une occlusion. Suite au développement d'un gradient de pression plus important dans le réseau collatéral, une artériogénèse a lieu afin de diminuer la résistance au flux. Ces collatérales, lorsque présentes, sont corrélées à une diminution de la taille de l'infarctus, des répercussions fonctionnelles d'un IM et de la mortalité suite à un IM. Les mécanismes du développement de ces collatérales demeurent encore flous, mais ils impliquent probablement

une phase initiatrice en lien avec une ischémie et une phase plus tardive comportant des forces de cisaillement [95].

Bien que des études expérimentales démontrent que l'administration de facteurs de croissance (dont VEGF et/ou FGF) semble bénéfique à la fonction endothéliale et à l'angiogenèse dans des modèles ischémiques, de nombreux essais cliniques n'ont pas su reproduire ces effets et suggèrent des mécanismes sous-jacents plus complexes [85, 96].

1.4.2 L'insulte d'ischémie-reperfusion

Un IM nécessite un prompt rétablissement de la circulation coronarienne afin de réalimenter le cœur en oxygène et en glucose, pour ainsi éviter la mort tissulaire. En 1986, chez un modèle animal, il a été démontré par *Murry et coll.* que l'étendue d'un IM pouvait être diminuée si le cœur a été exposé au préalable à un conditionnement consistant en de brèves périodes d'ischémie sublétales (préconditionnement) [97]. En 2003, un phénomène semblable a été observé auprès d'un modèle animal d'infarctus reperfusé suivi de brèves périodes d'ischémie (postconditionnement) [98]. Suite à plusieurs études subséquentes, il a été constaté que, contre intuitivement, un rétablissement de la circulation n'est pas sans risque et qu'il peut occasionner des effets néfastes par un processus complexe appelé insulte d'ischémie-reperfusion.

Les mécanismes d'ischémie-reperfusion impliquent une induction du métabolisme anaérobie conduisant à une diminution de l'ATP, à une dysfonction des canaux ioniques, à des dommages mitochondriaux et à une imbalance électrolytique pouvant induire un stress oxydatif [99]. L'insulte d'ischémie-reperfusion se manifeste par quatre types de dysfonction cardiaque : 1) une sidération myocardique (potentiel de récupération), 2) un phénomène de non-repermeabilisation (impédance du flux sanguin microvasculaire post-revascularisation secondaire à une disruption endothéliale et déposition de plaquettes, tactoïdes de fibrine et de neutrophiles), 3) une ou des arythmies de reperfusion et 4) une insulte cellulaire létale [100, 101]. Il subsiste cependant un certain doute quant à savoir si cette mort cellulaire suivant une reperfusion est une conséquence de cette dernière ou, plutôt, un achèvement de la mort cellulaire initiée durant la période d'ischémie ou, encore, une combinaison des deux. Les deux

types de morts cellulaires se produisent en IM et en CI. Une hypothèse, émise par Gill *et coll.*, stipule qu'une période d'ischémie peut instaurer de l'apoptose, son prolongement mène à de la nécrose, mais un rétablissement du flux alimente les besoins cellulaires en ATP pour mener à terme la cascade apoptotique initiée par l'ischémie [102]. Les mécanismes potentiels d'une insulte de reperfusion incluent une augmentation du stress oxydatif via la genèse de DROs, un œdème/rupture du sarcolemme menant à un collapsus mitochondrial, une protéolyse et à une mort cellulaire et à des effets au niveau vasculaire incluant de microembolies, de la stase sanguine et de micro-rupture capillaire [25, 103, 104].

Sur des modèles animaux, on estime que jusqu'à 50% des séquelles finales d'un infarctus pourraient s'expliquer par des dommages liés à la reperfusion [100]. En clinique, une revascularisation précoce limite l'étendue de l'infarctus et offre un bénéfice beaucoup plus important que les potentiels effets néfastes de la reperfusion. Néanmoins, les traitements qui modulent les mécanismes de réparation cardiaque – inflammation et résolution – sont beaucoup moins connus.

1.4.3 Les réponses cellulaires au stress

Plusieurs mécanismes cellulaires existent afin de répondre à des épisodes de stress et la plupart sont conservés entre les types cellulaires. Cela dit, le type de stress, sa durée ou encore le type cellulaire déterminent en grande partie la réponse qui sera évoquée [105]. En effet, la réponse cellulaire au stress peut activer des voies de signalisation en lien avec la récupération et la survie comme elle peut également déclencher la mort cellulaire (apoptose, autophagie, nécrose). Ces réponses sont complexes et variées et incluent, entre autres, la réponse au choc thermique, la réponse de la protéine dépliée (UPR), la réponse au dommage de l'ADN et la réponse au stress oxydatif [105]. Toutes ces réponses au stress sont présentes à des degrés variables dans le spectre de la CI. De plus, ces mécanismes peuvent être présents à des degrés variables de façon basale en présence de conditions et des comorbidités souvent associées à la MCAS.

Le stress oxydatif provient de source enzymatique ou non enzymatique; les sources les plus fréquentes sont enzymatiques et incluent les systèmes xanthine oxydase, NADPH oxydase et synthase d'oxyde nitrique [99]. Un IM aiguë conduit à une synthèse et/ou une accumulation accrue de radicaux libres (incluant le superoxyde O_2^- et l'hydroxyle OH; le peroxyde d'hydrogène n'étant pas en soit un radical libre, il est souvent inclus dans la catégorie de DRO en raison de son importante réactivité) et de leurs produits oxydés [106]. De façon générale, ces radicaux modulent d'importantes voies de signalisation cellulaire en lien avec leur croissance, différenciation, sénescence et apoptose [107]. Cependant, dans certaines conditions dont en IM ou CI, cette synthèse accrue peut dépasser les seuils de tolérance cellulaire et leurs défenses antioxydatives et résulter en dommages oxydatifs. Cela peut mener à des effets directs de peroxydation de lipides, d'oxydation de protéines et endommager l'ADN; à terme, ces effets risquent de déstabiliser l'intégrité membranaire, de dénaturer et d'inactiver les protéines cellulaires, d'interférer avec le transport calcique par le réticulum sarcoplasmique, de déréguler le cycle cellulaire et de potentialiser les réponses inflammatoires [108].

Le stress oxydatif peut aussi activer la réponse au choc thermique. Les protéines de choc thermique (HSP) consistent en des régulateurs importants de l'apoptose de CM en ischémie. Elles agissent comme des chaperons moléculaires exprimés de façon constitutive ou inducible ayant des fonctions dans le processus de réparation intracellulaire associé au pliage, à la modification et au transport de protéines [109]. En effet, via une activation cellulaire, elles moduleraient la production de cytokines pro-inflammatoires et produiraient un effet protecteur en IM et en CI [110]. Aussi, dans la cascade apoptotique, l'HSP inducible HSP70 inhibe l'apoptose en aval de la sécrétion de cytochrome c, mais en amont de l'activation de caspase-3 [111]. Le complexe HSP90, lié au facteur de choc thermique HSF-1 dans des conditions physiologiques normales, a un rôle important dans l'activation, la stabilisation et le traitement de protéines impliquées dans la croissance, différenciation et la survie cellulaire [112]. Le complexe interagit avec des voies de signalisation 'RISK' (Reperfusion Injury Salvage Kinase) regroupant les kinases de type MAP et PI3K [113]. Le HSF-1 est aussi impliqué dans ces fonctions [114]. De plus, dans des modèles expérimentaux de préconditionnement ischémique, la surexpression d'HSP90 protège du stress induit par l'insulte ischémie-reperfusion [115].

L'hypoxie favorise aussi la stabilisation des facteurs induits par l'hypoxie (HIF-1a) et l'activation de cet important mécanisme de défense cellulaire promouvant des adaptations bénéfiques à la survie et à la fonction cellulaire dans un milieu hypoxique. HIF-1a se lie à des éléments spécifiques contenus dans les séquences promotrices de plusieurs gènes cibles, dont l'iNOS qui médie des effets cytoprotecteurs via le NO, mais aussi via la génération de facteurs de croissance angiogénique et de mécanisme de production anaérobique de liaisons phosphate à haute énergie [116]. L'induction de l'hème oxygénase-1 (HO-1), une enzyme induite par le stress menant à la dégradation de l'hème en monoxyde de carbone, fer et biliverdine, jouerait un rôle en cardioprotection, notamment via ses effets cytoprotecteurs, anti-apoptotiques/inflammatoires et proangiogéniques [117]. Une surexpression cardiaque réduit les dommages de l'ischémie myocardique en diminuant la mort de cardiomyocyte et en améliorant les fonctions myocardiques [118].

Ces effets sont des facteurs importants dans l'évolution naturelle d'un infarctus du myocarde résultant ultimement en une mort cellulaire nécrotique (rapide, non régulée, mais destructive) et/ou apoptotique (régulée, limitant les dommages, mais énergie dépendante) ; mais aussi, de façon moins importante via l'autophagie et la mitoptose [102].

1.4.4 La guérison et le remodelage ventriculaire

La mort de cardiomyocytes suite à un IM engendre plusieurs cascades complexes de processus d'adaptation et de guérison menant ultimement à des changements cardiaques structurels et à des répercussions fonctionnelles proportionnelles à la localisation, la grosseur, l'étendue de l'IM ainsi que le degré de reperfusion atteint. Le processus de remodelage, arbitrairement divisé en une phase aiguë (≤ 72 heures) et une phase chronique (>72 heures), peut cependant s'étaler sur des mois [119]. Définie par le degré d'expansion de l'infarctus, la phase primaire est causée par la dégradation de collagène par des protéases [120].

Initialement, la mort cellulaire provoque une infiltration neutrophilique qui mène à une dégradation de la matrice extracellulaire et, ultimement, à un amincissement de la paroi cardiaque et à une dilatation de la cavité ventriculaire [21]. De plus, la mort d'une portion de

paroi cardiaque contractile provoque une diminution du débit cardiaque et l'activation d'axes de signalisation neuro-hormonaux conduisant à une hypertrophie myocardique, une augmentation de la contractilité, à un effet chronotrope positif et une rétention sodée. L'hypertrophie cardiaque est engendrée par la synthèse locale et systémique des composantes du système rénine-angiotensine aldostérone, la sécrétion de catécholamines par la médullosurrénale et la sécrétion de facteurs paracrins et autocrins par les CMs via des vésicules extracellulaires (VE) [121]. Ces processus sont renforcés par l'augmentation du stress mural suite à la dilatation initiale et permettent de compenser de façon transitoire.

Chroniquement, ces adaptations ne peuvent plus compenser la perte de CMs. L'augmentation de la charge placée sur le ventricule induit des processus de signalisation intracellulaire. En réponse à ces voies d'activation et à la mort cellulaire, s'ensuit une série de processus provoquant séquentiellement l'altération de l'homéostasie de la MEC, la formation de fibrose, l'hypertrophie excentrique et la dilatation cardiaque. La sécrétion de TGF- β 1 et de peptides natriurétiques mènent à l'infiltration de macrophage et de fibroblastes qui expriment des métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs (TIMPs) et à la synthèse de collagène de type 1 et 3 et de formation de fibrose [21].

Le processus n'est complété que lorsque les forces de distension sont contrecarrées par la force de traction de la cicatrice [120]. Les changements structurels découlant du remodelage ventriculaire suite à un IM sont responsables des changements fonctionnels sur le ventricule. Le VG, étant majoritairement responsable de la circulation systémique, ses effets sur celle-ci engendrent généralement des répercussions fonctionnelles plus significatives.

Les vésicules extracellulaires (VEs), incluant les exosomes, consistent en des nanoparticules sécrétées, entre autres, par les CMs. Elles permettent aux cellules d'établir un lien avec leur milieu (incluant fibroblastes, cellules endothéliales, cellules musculaires lisses et MEC) par le transfert de protéines, de molécules de signalisation et d'acides nucléiques [103]. Les VEs des cellules cardiaques progénitrices et des cellules souches sembleraient avoir des effets cardioprotecteurs en réponse à l'ischémie myocardique. En effet, elles contiennent des facteurs proangiogéniques, mitogéniques, anti-apoptotiques et anti-fibrotiques, menant à des adaptations métaboliques et structurelles des CMs [121]. Dans des modèles *in vitro* de conditions

de remodelage ventriculaire pathologique, elles peuvent cependant avoir des effets pervers en contribuant à la formation de la cicatrice et au développement de l'hypertrophie [122].

Les mécanismes pathophysiologiques de la CI modifient ultimement la structure et la fonction du cœur. Au prorata des changements phénotypiques cellulaires, des remaniements myocardiques et de l'altération de la structure ventriculaire, la fonction globale cardiaque risque d'être atteinte. Chez le patient, ces modifications peuvent se traduire en signes et symptômes d'insuffisance cardiaque. Tel que mentionné précédemment, les cellules souches, de par leur interaction directe ou indirecte avec les phénomènes pathophysiologiques décrits ci-dessus, représentent un potentiel d'intervention prometteur.

Les cellules souches

1.5.1 Les cellules souches et le développement humain

On appelle cellules souches (CS) les cellules non différenciées de façon terminale qui sont présentes à tous les stades du développement humain. Elles possèdent trois caractéristiques clés, soit la capacité de se renouveler, de proliférer, et de se différencier en d'autres types cellulaires plus spécialisés [123, 124]. Les CS se renouvellent par division symétrique donnant naissance à de nouvelles cellules identiques et assurant ainsi une réserve. Plus ces cellules se spécialisent, plus il y a perte de leur potentiel de différenciation [125]. En général, une CS peut se diviser de façon symétrique en donnant naissance à deux CS filles identiques ou, de façon asymétrique, à une cellule fille identique et une cellule fille plus spécialisée [126].

Dans le développement humain, les cellules dites totipotentes proviennent des premières divisions de l'ovule fécondé (zygote (J0) au stade de morula (J4)) et peuvent se différencier en tous types cellulaires de l'organisme et de son annexe. Au jour 5-7, la morula atteint le stade de blastocyte, forme une cavité et, ensuite, une blastula. À ce stade, les cellules forment deux structures : la périphérique (le trophoctoderme ou futures structures extra-embryonnaires) et la masse interne. À terme, ces cellules formeront les trois couches germinatives primitives de l'embryon : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme ayant le potentiel de formation des tissus et organes du corps [127]. Les cellules de la masse interne sont appelées cellules souches embryonnaires (CSE) humaines.

Les CS jouent de nombreux rôles. Outre dans la moelle osseuse et le sang, des populations de CS existent dans le foie, le cerveau, les tissus adipeux et le tractus digestif. Elles permettent de préserver l'homéostasie de ces tissus via le renouvellement, la croissance et le maintien de leurs composantes cellulaires [128]. Composée majoritairement de CMs en différenciation terminale, il a été démontré récemment que le cœur possède également une sous-population de cellules souches cardiaques résidant dans le myocarde [129]. Cette découverte, combinée à de nombreux travaux sur les effets potentiels de cellules souches en thérapie offre de nouvelles pistes et mécanismes potentiels de traitement de la CI et de l'IC.

1.5.2 *Types de cellules souches et caractéristiques clés*

Les cellules souches sont différentes les unes des autres, et ont des caractéristiques clés particulières avec des avantages et inconvénients dans leur utilisation en thérapie cellulaire. Deux classifications de CS existent : la première, selon le potentiel de différenciation (l'étendue des options d'engagement d'une cellule souche) et la deuxième selon son origine [130].

La première classification établit cinq groupes de CS selon leur potentialité : les cellules totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes et unipotentes [131]. Les cellules totipotentes et pluripotentes sont nécessaires au développement embryologique et constituent toutes les lignées cellulaires du corps humain. Les cellules multipotentes se retrouvent dans plusieurs tissus et se différencient en plusieurs types de cellules provenant d'une seule lignée germinative et sont essentielles pour la guérison, la croissance et le remplacement des composantes tissulaires dans l'homéostasie [117]. Les cellules oligopotentes et unipotentes peuvent se renouveler et donner naissance à des lignées restreintes (oligo) ou uniques (uni) de cellules. Les CSHs sont un exemple de cellules oligopotentes.

La deuxième catégorisation classe les cellules souches selon leur origine : les CSEs, fœtales et adultes, ainsi que les cellules souches pluripotentes induites (CSPi) [131]. En médecine expérimentale, les CSEs peuvent être isolées maintenues en quiescence en culture, en prolifération infinie ou soumises à des conditions spécifiques pour donner naissance à tout type de cellules somatiques et sont donc largement étudiées [132]. Cela dit, elles ont des désavantages, dont le soulèvement de questions éthiques importantes, un potentiel de rejet vu leur allogénicité et une instabilité génétique menant à un potentiel tumorigène [133].

Dérivées des tissus humains adultes, les CS adultes (dites aussi somatiques) sont multi ou unipotentes [134]. Elles offrent l'avantage potentiel d'un traitement autologue et soulèvent moins de questions éthiques. Le plus souvent, elles proviennent de la moelle osseuse et incluent les CSHs et les cellules souches mésenchymateuses (CSMs). Les CSHs mènent à l'hématopoïèse. Les CSMs sont complexes [135]. Deux descriptions – opposées – de ce type cellulaire existent : le premier type consiste en une population de cellules souches menant au développement de tous les tissus squelettiques (adipeux, osseux, cartilagineux) ayant des rôles

essentiels à la physiologie squelettique et hématopoïétique; le second ne consiste pas en une population de CS en soit, mais plutôt à un type de culture cellulaire défini par des caractéristiques *in vitro* suivant un consensus international [135, 136]. Les CSMs semblent immunoprivilégiées et ont des traits immunosuppresseurs ce qui en permet une utilisation allogénique [137]. Il existe aussi des populations de cellules souches adultes tissulaires normalement quiescentes, mais qui peuvent être activées par une variété de stimulus. Cette activation dépendrait en large partie de leurs microenvironnements dynamiques appelés niches cellulaires [138].

De façon expérimentale, des CSP peuvent être induites (i) via la reprogrammation de cellules somatiques adultes, celles-ci partageant des caractéristiques morphologiques et phénotypiques similaires aux cellules souches embryonnaires, bien qu'il ne soit pas encore tout à fait établi si elles se comportent de façon identique en clinique à ces dernières [139].

Le terme CS implique donc un large éventail de cellules qui émergent à différents niveaux dans la hiérarchie cellulaire et qui possèdent des caractéristiques intéressantes. En effet, depuis leur découverte, des avancées ne cessent d'étayer leurs mécanismes d'actions potentiels, et ce, dans divers modèles de pathologie afin d'évaluer leur potentiel de régénération cellulaire et tissulaire.

1.4 La thérapie cellulaire

Les CS ont une capacité de prolifération prolongée, un potentiel de différenciation varié et des fonctions cellulaires assurant le maintien des fonctions physiologiques dans une multitude de conditions. Le début des succès contemporains en médecine régénératrice se retrouve dans les avancées scientifiques du milieu du 20^e siècle, marqué par l'identification et l'isolation de CSHs et à leur utilisation en greffe de moelle osseuse [140]. Depuis, la thérapie cellulaire impliquant divers types cellulaires hétérogènes impliquant divers types cellulaires et une variété d'indications thérapeutiques, est en plein essor et révolutionne le domaine de la recherche en médecine moderne, particulièrement en cardiologie. Les technologies présentement utilisées en thérapie cellulaire incluent l'utilisation directe de cellules somatiques, l'immortalisation cellulaire, la modification génique par vecteur viral *in vivo* et *ex vivo*, l'édition génomique, la plasticité cellulaire, tridimensionnelle et combinatoire [141]. L'utilisation directe de cellules souches somatiques est stratégie la mieux établie et la plus fréquemment utilisée.

1.6.1 Mécanismes d'action potentiels des cellules souches dérivées de la moelle

Historiquement, les effets bénéfiques de la thérapie aux CS étaient associés à une intégration directe des cellules souches implantées dans le myocarde et à un couplage électromécanique [142]. Outre les Esc et iPSCs qui peuvent se différencier en CMs *in vitro*, les CS autres (incluant celles dérivées de la moelle) le font rarement *in vivo* [143]. De plus, la durabilité finie de la greffe de CS limite leur implication dans la régénération myocardique et vasculaire. Dans un modèle murin d'ischémie périphérique, il n'y avait en effet pas d'incorporation de cellules souches dérivées de la moelle osseuse syngénique dans le mur des vaisseaux, mais cela semblait offrir un support aux artères collatérales croissantes [144]. Les CSH ne se transdifférencient donc pas en cardiomyocytes en IM [145].

Les bénéfices de la thérapie cellulaire seraient plutôt associés à des effets autocrins et paracrins [146]. Via cette signalisation, les cellules souches produiraient des effets

cytoprotecteurs, anti-inflammatoires et proangiogénèses multiples [147]. Les CSMs implantées augmentent leur sécrétion de facteurs de croissance tels le VEGF, FGF, TGF- β [146, 148, 149]. Une injection intramyocardique de CSM-moelle osseuse surexprimant Akt chez un modèle de rat révèle que ces cellules sécrètent de façon paracrine des agents cardioprotecteurs et/ou isotropiques menant au sauvetage de cardiomyocytes ischémiques et également à une amélioration de la fonction ventriculaire [148]. Les processus de réparation cardiaque physiologique normaux semblaient être améliorés par l'injection intramyocardique de CSMs surexprimant SDF-1 en infarctus aigu chez le rat [150]. De plus, l'administration de milieu conditionné semble conférer un avantage semblable suggérant en outre la présence de facteurs solubles [151]. En effet, l'injection de milieu conditionné CSM dans un modèle d'IM porcin démontre un développement plus important de capillaires dans la zone périphérique de l'infarctus chez les porcs ayant reçu du milieu conditionné par injection [152].

Ces facteurs favoriseraient aussi la régénération endogène via l'activation de cellules souches cardiaques résidente [146]. Le postulat actuel est que ces effets influenceraient, entre autres, des mécanismes de transdifférentiation de cellules souches cardiaques résidentes en cellules endothéliales, en cellules vasculaires musculaires lisses et en CMs promouvant des processus de vasculogénèse (néovascularisation) et de régénération cardiaque (cardiomyogénèse) [153]. Il est aussi possible que le remodelage cardiaque, la contractilité et le métabolisme soient affectés de cette façon. Les cellules souches sécrètent des composantes du MEC incluant du collagène, des MMPs et des TIMPs qui inhibent la fibrose [154].

Les microvésicules extracellulaires secrétées par les cellules souches pourraient également jouer un rôle clé dans leurs effets paracrins. En effet, ces microvésicules transportent des protéines, des lipides ainsi que des acides nucléiques qui participeraient de façon importante à la communication intercellulaire. Effectivement, un préconditionnement ischémique *in vitro* de MSC entraînait une sécrétion accrue d'exosomes contenant du miR-22 (miRNA) minimisant l'apoptose de cardiomyocytes en coculture [155]. Des exosomes intacts isolés de MSC et administrés dans un modèle murin d'IM reperfusé démontre une restauration bioénergétique, une diminution du stress oxydatif et une augmentation des voies de signalisation pro-survie [156].

1.6.2 Les cellules souches de la moelle en cardiopathie ischémique

Des études précliniques murines effectuées vers la fin du 20^e siècle ont démontré la viabilité de CMs greffés dans du myocarde syngénique et le développement d'un tissu cardiaque sain dans de la cicatrice myocardique [157, 158]. La possibilité d'utiliser le myocarde comme plateforme d'implantation cellulaire et le potentiel d'amélioration fonctionnelle ont mené aux premières études d'implantation myocardique de CS, lesquelles semblent démontrer certains effets bénéfiques sur la réparation de tissu infarci et sur la fonction cardiaque [142, 159]. Depuis, de nombreuses stratégies ont été étudiées afin d'élucider de possibles mécanismes bénéfiques et d'évaluer le potentiel thérapeutique des CS dans plusieurs modèles de cardiopathie.

Plusieurs types de CS, dont des myoblastes squelettiques, des cellules souches dérivées de la moelle osseuse (mononucléaires, hématopoïétiques, endothéliales progénitrices, mésenchymateuses), ainsi que des cellules souches cardiaques, CSEs, et CSPi, ont été étudiés dans ces modèles, chacun comportant leurs avantages et leurs inconvénients [160]. Des revues par Müller *et coll* [160] et de Yu *et coll* [161] résument bien la vaste étendue des stratégies et avancées de la thérapie cellulaire dans la maladie cardiaque.

Plusieurs populations de cellules souches dérivées de la moelle osseuse ont fait l'objet d'études dans des modèles de CI. Des populations de cellules mononucléaires dérivées de la moelle contenant majoritairement des cellules hématopoïétiques à des stades développementaux variés, mais comprenant aussi une plus petite quantité des CSHs, de cellules endothéliales progénitrices et de CSMs, n'ont pas démontré de résultats satisfaisants suite à leur utilisation dans de nombreuses études randomisées contrôlées en cardiopathie ischémique. Des méta-analyses de ces études semblent initialement suggérer une amélioration modérée, mais significative de la FEVG, de la taille de l'infarctus et une diminution des effets de remodelage pathologique chez les patients souffrant de CI ou d'IC et recevant une transplantation de cellules mononucléaires dérivées de la moelle osseuse (intracoronarienne et intramyocardique), comparativement à ceux n'ayant pas reçu cette thérapie, et ce, à court et à long terme [162-164]. Ces découvertes ne furent pas retrouvées dans une méta-analyse qui regroupe les études ayant

évalué la FEVG par résonance magnétique, suggérant ainsi que la mesure de la FEVG n'est peut-être pas la meilleure mesure de l'amélioration clinique [165].

D'autres études évaluant le potentiel de CSMs démontrent également des effets mitigés. Chez des modèles animaux, cette thérapie semble liée à une amélioration de la fonction en CI et IC et à une réduction de la taille de l'infarctus, mais le degré d'efficacité de cette thérapie serait plutôt relié à la méthode choisie d'implantation des cellules [166]. Cependant, des études cliniques randomisées contrôlées révèlent un éventail de réponses dans des modèles divers de cardiomyopathies allant d'une absence de différence [167-169] entre les groupes randomisés à la thérapie cellulaire jusqu'à une amélioration de modeste à modérée de la FEVG, du volume d'éjection, et de la masse myocardique [170, 171]. Plusieurs de ces études cliniques en phase 2 ont par contre démontré que la thérapie cellulaire était sécuritaire. D'autres études individuelles plus récentes ont aussi évalué l'utilisation de cellules mésenchymateuses chez des patients ayant besoin de support mécanique (LVAD), sans pour autant démontrer de bénéfice pour le sevrage de ces dispositifs [172].

Une méta-analyse ne différenciant pas entre les sous-groupes des cellules souches dérivées de la moelle osseuse en thérapie cellulaire en défaillance cardiaque chez les humains semble montrer un bénéfice au traitement en lien avec une réduction de la mortalité et de la réhospitalisation pour de la défaillance [173]. De plus, des améliorations de la FEVG, de la capacité à l'effort et de la qualité de vie en faveur de la thérapie cellulaire ont aussi été notées dans cette analyse, même si celle-ci soulevait des questions de risques de biais de sélection et de déclaration.

Bien que les mécanismes d'action de ces populations de cellules souches dérivées de la MO puissent différer, leurs effets fonctionnels bénéfiques démontrés dans plusieurs modèles expérimentaux semblent comparables.

1.6.2.1 Les cellules souches hématopoïétiques CD133+

Une des sous-populations de CSH a été étudiée de façon plus poussée dans des modèles de CI et de IC : les cellules CD133+. Ces cellules, également appelées cellules endothéliales progénitrices, expriment à leur surface des marqueurs incluant la glycoprotéine CD133 et CD34 (CD34 étant un marqueur de CSHs ayant des propriétés vasculogènes) [174-176]. Découverte en 1997 comme identifiant de cellules souches hématopoïétiques, le CD133 semble identifier une sous-population de CSHs ayant des effets vasculogènes et cardiomyogènes [177]. Cela dit, elle est aussi exprimée sur une variété de cellules épithéliales et non épithéliales ainsi que dans plusieurs types de cancer; associée notamment à l'expression de c-kit [178]. Bien que ses fonctions physiologiques ne soient pas complètement élucidées, elles semblent être liées à des rôles de protéine d'échafaudage et pourraient être impliquées dans la détermination du sort cellulaire et le maintien de propriétés s'apparentant aux cellules souches [179, 180]. La CD133 est un des antigènes de surface le plus communément utilisé pour détecter et isoler les cellules souches cancéreuses de tumeurs solides; il pourrait être responsable d'effets tumorigènes, métastatiques et de chimiorésistances [181, 182]. En cancérologie, les cellules CD133+ peuvent exprimer des facteurs inhibant leur apoptose et favorisant l'angiogenèse via la sécrétion de VEGFa et IL-8 [182]. Elles ont été étudiées extensivement dans des modèles de maladie cardiovasculaire et à des fins thérapeutiques chez des patients souffrant de CI et d'IC [183].

Les effets des cellules CD133+ ont aussi été comparés à d'autres types de cellulaires pour en vérifier l'efficacité. Dans une étude d'Agbulut *et coll.*, le potentiel fonctionnel a été comparé directement à des myoblastes squelettiques dans un modèle murin d'infarctus myocardique semichronique [184]. Un mois posttransplantation dans du tissu cicatriciel d'infarctus créé par une ligature d'artère coronaire chez des rats nus, la FEVG a augmenté de $7 \pm 3\%$ dans des cœurs greffés avec des cellules CD133+ ($p=0.0015$ vs contrôle; et en comparaison avec les cœurs greffés aux MS $15 \pm 5\%$; $p = 0.008$ vs contrôle).

En raison de leurs effets vasculogènes et de leur plasticité accrue, les cellules CD133+ ont été utilisées initialement en thérapie cellulaire, en 2001, chez six patients ayant souffert d'un IM et lors d'une revascularisation chirurgicale, et ce, avec des effets prometteurs [159]. Dans un

modèle d'IM aiguë, *Bartunek et coll.* ont évalué la faisabilité, la sécurité et la fonctionnalité de cellules CD133+ progénitrices par injection intracoronarienne chez des patients ayant connu un épisode récent [185]. Une administration intracoronarienne de ces cellules ($12.6 \pm 2.2 \times 10^6$) a été effectuée chez 19 patients, comparativement à un groupe contrôle de 16 patients. Après 4 mois, la FEVG était significativement plus élevée chez le premier groupe par rapport au deuxième. Toutefois, des événements de réocclusion et de resténose ont été plus fréquents chez le premier groupe, comparativement au groupe contrôle. Plusieurs études subséquentes ont démontré la faisabilité et la sécurité de ces interventions tout en suggérant de potentiels bénéfices de la thérapie [186-190]. Entre autres, suite à une étude pilote prometteuse, l'étude CARDIO133 a tenté d'évaluer l'effet sur la fonction ventriculaire gauche et de symptômes cliniques suite à l'injection intramyocardique de cellules CD133+ [191]. Bien que des améliorations de la fonction régionale aient été uniquement détectées chez les patients avec un infarctus postérieur, une certaine amélioration dans la taille de la cicatrice et de la perfusion régionale a été décelée. La première étude de phase 3, PERFECT, semble suggérer une diminution de la taille de la cicatrice myocardique sans toutefois démontrer d'amélioration de FEVG suite à l'implantation intramyocardique de CD133+ au moment d'une revascularisation chirurgicale [192].

1.6.2.1.1 *L'étude COMPARE-AMI*

L'étude COMPARE-AMI (Comparison of Intracoronary Injection of CD133+ Bone Marrow Stem Cells to placebo in patients after Acute Myocardial Infarction and Left Ventricular Dysfunction) est la première étude clinique prospective, unicentrique, randomisée-contrôlée à deux bras et double insu, de phase I-II qui s'étant déroulée entre 2007 et 2012 [193]. L'étude, ayant pour but d'évaluer l'application de CS CD133+ en CI, a investigué la faisabilité, la sécurité et l'efficacité d'une injection intracoronarienne de cellules autologues CD133+ en comparaison avec un placebo chez des patients ayant eu un infarctus aigu et qui, malgré une revascularisation percutanée adéquate, demeuraient avec une dysfonction myocardique persistante précoce telle qu'évaluée par une échographie transthoracique (FEVG $\geq 25\%$, mais $\leq 50\%$ à un contrôle échographique jusqu'à 48hrs post intervention de reperfusion percutanée) [194]. L'hypothèse

de cette étude était que l'administration de CS CD133+, à comparaison à un placebo, améliore la fonction globale et régionale du VG et que cette amélioration ne dépend pas d'une modification de la charge athérosclérotique dans l'artère nourrissant le territoire infarci. Les résultats secondaires évaluent le développement d'événements cardiovasculaires majeurs (ÉCM) : mortalité, IM, accident vasculaire cérébral, revascularisation du vaisseau cible ou arythmie maligne.

Au total, 38 patients ont été recrutés. Suivant un désistement, 17 patients ont été randomisés au bras CD133+ de l'étude [195]. Entre 3 et 7 jours suivant la reperfusion par ICP, tous les patients de l'étude ont eu une aspiration de moelle osseuse. À moins de 12 heures suivant le prélèvement, une suspension cellulaire de CD133+ (ou placebo) est administrée aux patients dans l'artère stentée (livraison par cathéter et occlusion par ballon sur une durée de trois minutes suivies de 3 minutes de reperfusion; 4 cycles au total). L'évaluation fonctionnelle est suivie par échographie, imagerie par résonance magnétique et TEP à 4 mois.

L'étude s'est avérée sécuritaire : aucune complication majeure n'étant identifiée au moment du prélèvement de la moelle osseuse ni pendant et suivant l'injection intracoronarienne. Jusqu'à un an, aucun ÉCM n'a été rapporté. De plus, selon des méthodes d'évaluation de charge athérosclérotique, la thérapie cellulaire ne semblait pas associée à une accélération de l'athérosclérose [196]. Une amélioration significative de la FEVG a de plus été notée à 4 mois ($51.1\% \pm 2.5$ vs $41.2\% \pm 1.1$ resp., $p < .001$) et semblait soutenue à 12 mois. À 10 ans, les patients randomisés à la thérapie cellulaire avaient une survie numériquement supérieure au groupe placebo, mais non significative (87.8% vs 66.3% ; $p = 0.37$) [197].

1.6.2.1.2 *L'étude IMPACT-CABG*

L'étude IMPACT-CABG est une étude prospective, multicentrique, randomisée-contrôlée à deux bras et double insu qui s'est déroulée entre 2010-2014. C'est la première étude Nord-Américaine de phase II étudiant la faisabilité, la sécurité et l'efficacité d'injection de cellules CD133+ dans des zones de démarcation d'infarctus de patients souffrant d'une cardiomyopathie ischémique chronique lors d'une revascularisation chirurgicale [189]. Les cellules progénitrices

hématopoïétiques CD133+, CD34+, CD45+ ont été sélectionnées pour leurs propriétés néoangiogéniques.

41 patients avec une cardiomyopathie ischémique et une FEVG entre 25-45% en attente de revascularisation chirurgicale ont été recrutés et 33 ont été randomisés à une intervention. Les résultats primaires étaient une absence de mort de cause cardiaque, d'infarctus du myocarde, d'une ré-intervention coronarienne (chirurgicale ou percutanée) ou d'arythmie cardiaque sévère (tachycardie ventriculaire soutenue, ou ACR) durant les 6 premiers mois du suivi. Un résultat exploratoire secondaire évaluait l'effet de l'injection intramyocardique de cellules souches CD133+, CD34+, CD45+ sur la fonction ventriculaire gauche globale et les volumes ventriculaires, tels évalués par résonance magnétique. Au final, 19 patients ont reçu en moyenne 6.5 ± 3.1 millions de cellules dans les territoires revascularisés; 19 patients ont plutôt reçu des injections placebo. La durée de circulation extracorporelle et de clampage aortique était semblable entre les groupes ainsi que le nombre de pontages réalisés. La FEVG était augmentée de façon significative dans les deux groupes (cellules et placebo) à un degré similaire.

Lors de cette étude, aucune évidence d'embolisation intra-coronarienne, d'hématome, de myocardite, d'infarctus du myocarde, de saignements, d'accident vasculaire cérébral ou de mortalité n'a été démontrée. Accessoirement, l'équipe a aussi évalué le cheminement clinique des patients en évaluant l'évolution de la fraction d'éjection en post-opératoire. Une amélioration globale fut notée, bien qu'il n'y ait pas eu de différence significative entre les deux groupes ($7.80 \pm 8.33\%$ vs $10.29 \pm 9.90\%$ resp, $p = 0.41$).

1.6.3 Les limitations et risques de la thérapie cellulaire en cardiopathie ischémique

Bien que la thérapie cellulaire ait démontré des résultats prometteurs de régénération cardiaque dans des modèles expérimentaux, ses effets en médecine clinique demeurent mitigés et inconstants. Certaines limitations pourraient expliquer la faible efficacité de la thérapie cellulaire.

La méthode de livraison des cellules souches présente un facteur limitant important de la thérapie cellulaire. De façon classique, les cellules souches étaient administrées par injection intramyocardique, intracoronarienne et intraveineuse. Cela dit, les injections intramyocardiques et intracoronariennes sont associées à des taux de rétention et de survie d'environ 1%, les injections intraveineuses à des taux encore plus faibles [198]. De plus, les injections intramyocardiques de certains types de cellules souches pouvaient être reliées au développement de foyer arythmique [199]. Pour pallier cette problématique, de nouveaux modes de livraison ont été développés notamment par feuille cellulaire et/ou par hydrogels, lesquels démontrent une meilleure rétention, un ciblage plus précis des zones à traiter par thérapie et moins de dommages mécaniques liés à une injection [200, 201].

Les CS résident dans un microenvironnement complexe qui a un impact majeur sur leur développement et leur phénotype. Cette niche, concept initialement suggéré par Rölich mais plus concrètement élaboré par Schofield en 1978, est responsable du maintien des CS dans un état indifférencié et assure un auto-renouvellement de la population [202]. Elle varie de tissu en tissu et son importance dans la modulation du comportement des cellules souches a été démontrée dans la moelle osseuse, la peau, l'intestin, le cerveau, les muscles squelettiques, entre autres. Dans la moelle osseuse, la composition hétérogène complexe de la niche favorise l'interaction cellulaire (entre CSHs, CEs, réticulocytes, mégakaryocytes, macrophages, cellules périvasculaires, nerfs sympathétiques, cellules ostéogéniques) et affecte la fonction et la différenciation des CSH [203]. Le microenvironnement tissulaire ischémique et inflammatoire d'un myocarde en infarctus ou en ischémie chronique est défavorable à la survie des cellules souches implantées [204].

Les cellules souches prélevées chez des patients souffrant de conditions chroniques et utilisées en thérapie autologue présentent aussi un défi supplémentaire. En effet, les premières

études précliniques de la thérapie aux cellules souches chez des jeunes sujets sains démontraient de façon quasi universelle un effet fonctionnel bénéfique sur la récupération cardiaque dans des modèles de CI. Cependant, une fois les études cliniques débutées sur des patients âgés et malades, il a rapidement été démontré que le nombre et que l'activité de leurs cellules souches prélevées étaient affaiblis [205]. Outre l'âge, le diabète, le syndrome métabolique et l'insuffisance cardiaque sont des facteurs qui ont un impact sur le phénotype cellulaire des cellules souches dérivées de la moelle osseuse. Parmi les fonctions altérées de ces CS, on retrouve une diminution de la mobilisation et du retour, de la formation de réseaux vasculaire, de l'intégration, de la neovascularisation des tissus ischémique et du potentiel à se différencier en cardiomyocytes [206].

Afin d'augmenter leur survie, des stratégies de manipulation *ex vivo* et de préconditionnement font donc l'objet d'études plus approfondies. En outre, il existe de nombreuses considérations scientifiques, cliniques, éthiques et sociales qui méritent être prises en considération au fur et à mesure des avancées en médecine régénérative [207].

1.6.4 *L'optimisation des cellules souches*

Afin d'augmenter la survie et la réponse clinique des cellules souches utilisées en thérapie cellulaire, des stratégies d'optimisation ont été développées [208]. Une de ces stratégies, le préconditionnement des cellules *ex vivo*, permet d'augmenter le potentiel de survie des CS dans le milieu hostile qu'est le myocarde ischémique en plus de les doter des fonctions qui pourraient même être bénéfiques pour la guérison [161]. Ce préconditionnement peut être physique, génétique et/ou pharmacologique [209]. Une stratégie physique/environnementale peut inclure une simulation de conditions en laboratoire s'apparentant à celles retrouvées dans des territoires cardiaques ischémiques dont de l'hypoxie, en présence de DROs et/ou à des températures variables (afin d'éliciter des patrons cellulaires de réponse au stress hypoxique et de choc thermique) [208, 210]. Les cellules traitées dans des conditions hypoxiques démontrent une meilleur rétention et survie suite à leur injection intracardiaque (CSM, murin), une différenciation et prolifération suivant cette implantation et une augmentation d'effets cardioprotecteurs envers les CMs (CSM, rat) [211-213]. Une augmentation d'HSP70, ayant potentiellement des

effets cardioprotecteurs, a été démontrée dans des CMs exposés à de hautes température [214]. Des stratégies d'optimisation génétiques ont aussi été développées; ciblant majoritairement la surexpression de transgènes liés à l'angiogénèse, le chimiotaxisme et la survie cellulaire, mais aussi l'adhésion et la renouvellement cellulaire [209, 215, 216]. Dans un modèle murin d'ischémie myocardique et d'injection intracardiaque de CSMs, une transfection avec des plasmids HO-1 améliorait la survie des cellules souches [217]. Une stratégie semblable d'injection intracoronarienne de CSMs surexprimant HO-1 dans un modèle porcin semblait démontrer un bénéfice fonctionnel dans un modèle d'ischémie-reperfusion [218]. Finalement, le traitement aux facteurs de croissance et aux cytokines est aussi communément utilisé afin d'améliorer la survie, la prolifération et la différenciation [208].

Le préconditionnement pharmacologique est une méthode efficace, rapide et peu dispendieuse qui permettrait, elle aussi, d'améliorer la survie/rétention cellulaire et de moduler le phénotype et les potentiels effets des CS. Des CSMs dérivées de la moelle osseuse traitées au Diazoxide (ouverture des canaux potassiques de mitochondries) dans des conditions hypoxiques avaient une meilleure survie et une expression augmentée d'Ang-1 et de VEGF suggérant un phénotype pro-angiogénique dans un modèle murin [219]. Un traitement aux statines (inhibiteurs de la HMG-CoA réductase utilisés pour le traitement de la dyslipidémie) semble favoriser une augmentation du nombre et de la fonction de CSMs et de cellules endothéliales progénitrices en thérapie cellulaire dans une revue systématique de la littérature [220]. L'oxytocine est un autre agent communément utilisé dans des stratégies d'optimisation, promouvant entre autres des effets de résistance au stress oxydatif grâce à des cellules vasculaires et une activation rapide de cascades de signalisation impliquant pAkt et pErk1/2, ces voies étant liées par des études fonctionnelles à la prolifération cellulaire, la migration et la protection face aux stress cellulaires [221, 222]. Ces molécules composent à elles seules une infime partie d'un vaste arsenal d'optimisation pharmacologique qui est lui en constante évolution. Nous allons nous concentrer sur la modulation des HSCP90.

1.6.4.1 Les modulateurs d'HSP90

Le Célastrol est une quinone triterpène pentacyclique isolée du *Tripterygium wilfordii*, une plante utilisée dans la médecine chinoise traditionnelle et dans la médecine moderne pour traiter une variété de conditions médicales. Notre groupe a été le premier à démontrer que le Célastrol avait également des effets cardioprotecteurs notamment par sa modulation du complexe HSP90 [223]. En effet, dans un modèle de rat d'ischémie myocardique par ligature permanente de coronaire, un traitement continu au Célastrol pendant 2 semaines améliorait la fonction cardiaque et diminuait les effets néfastes du remodelage ventriculaire gauche [223]. Depuis, d'autres études précliniques ont confirmé ses effets cardioprotecteurs [224-226].

Fondamentalement, le Célastrol peut induire une réponse au choc thermique en activant HSF-1 et en inhibant HSP90 [227, 228]. C'est par rupture de l'interaction entre HSP90-Cdc37 qu'une activité antitumorale dans un modèle de cancer pancréatique a été démontrée *in vitro* et *in vivo* [229]. Via cette interaction, le Célastrol induit l'activation de voies de signalisation de type 'RISK'. De plus, la liaison du Célastrol au complexe HSP90 mène à une dégradation de 70-80% d'HSP90 et une augmentation d'un facteur de 12 l'expression d'HSP70 [229, 230]. Le Célastrol induit une réponse cytoprotectrice puissante par surexpression d'HSP70 et de HO-1 *in vitro* [231]. De plus, une réponse simultanée antioxydante est stimulée et conservée dans des cellules humaines; cette réponse est contrôlée via les deux facteurs de transcription NF-E2-related factor 2 (Nrf2) et l'activating factor 4 (Atf4) et marquée par l'expression de heme-oxygenase-1 (HO-1) [232]. Le traitement au Célastrol de cellules souches permet donc de cibler et d'activer une réponse cellulaire s'apparentant à celle élicitée par un choc thermique et/ou un stress oxydatif.

Plus récemment, d'autres modulateurs du HSP90 ont été évalués et développés (analogues synthétiques); leur structure moléculaire a permis l'activation des éléments de réponse au choc thermique et au stress oxydatif [231]. Il a aussi été démontré que le Célastrol, et deux de ses analogues, améliorent la récupération fonctionnelle cardiaque et diminuent les dommages tissulaires dans un modèle d'ischémie-reperfusion *ex vivo* chez le rat. D'autres inhibiteurs du HSP90 ont aussi été étudiés, ils ont cependant démontré un degré de cardioprotection moindre et une réponse clinique beaucoup plus variable [233-235]. Ces

analogues ont aussi démontré une amélioration du processus de reconditionnement pulmonaire dans des modèles porcins de perfusion pulmonaire *ex vivo* de poumons prélevés suite à un décès cardiocirculatoire [236].

Synthèse

Une dysfonction endothéliale artérielle est le mécanisme sous-jacent de l'AS qui est la cause principale de la CI. La MCAS est une pathologie inflammatoire. Son évolution, habituellement chronique marquée par de multiples dysfonctions moléculaires et cellulaires. Cela dit, elle peut se manifester de façon aiguë par l'IM. Certains des mécanismes pathophysiologiques qui déterminent la nature des répercussions de la CI sont liés à l'angiogénèse, à l'insulte ischémie-reperfusion, à la réponse cellulaire au stress (particulièrement à la réponse cellulaire au choc thermique) ainsi qu'à la guérison et au remodelage ventriculaire. Bien que ces mécanismes fondamentaux sous-jacents se ressemblent, la CI et l'IM sont des pathologies différentes qui se distinguent, entre autres, par leur évolution, leur présentation et par la sévérité de leurs répercussions. Ultiment, ces maladies peuvent mener à l'IC ayant un énorme impact chez les patients qui en sont atteints et qui représentent un lourd fardeau sur le système de santé. Même si la prévention, les stratégies de revascularisation précoce et le traitement pharmacologique ont diminué l'incidence du syndrome de défaillance, il n'existe toujours pas de traitement permettant la régénération de myocarde infarci. Les nombreux types de cellules souches et leurs caractéristiques propres offrent de nouvelles options et stratégies thérapeutiques. Une population de cellules souches hématopoïétiques, les CD133+ ayant des phénotypes et des effets pro-angiogène et cardioprotecteurs, semble également offrir un bénéfice fonctionnel dans de nombreux modèles fondamentaux et cliniques. Les mécanismes des cellules souches sont multiples mais l'effet dominant semble être la modulation paracrine du milieu. Les études COMPARE-AMI et IMPACT-CABG sont les premières études nord-américaines chez l'humain de leur genre à évaluer la thérapie cellulaire CD133+ autologue dans l'IM et la cardiomyopathie chronique. Les cellules de ces études étant isolées de la même façon, cela nous permet de comparer directement leur phénotype chez des patients atteints de maladies très différentes. De plus, l'identification de patrons génomiques pourrait nous permettre de mieux comprendre pourquoi certains patients semblent mieux répondre à la thérapie. Puisque le traitement cellulaire peut être limité par la niche cellulaire impactée par des facteurs patients, nous tenterons d'optimiser pharmacologiquement des populations de cellules souches en laboratoire afin d'en améliorer la survie et de maximiser leur potentiel clinique.

Chapitre 2 – Hypothèse et objectifs

Hypothèse

Dans des études cliniques de cardiomyopathies ischémiques aiguës et chroniques, les cellules CD133+ de patients répondant à la thérapie cellulaire exhibent des signatures transcriptomiques communes responsables de leur effet thérapeutique.

Objectifs

Première partie – Patrons d’expression cellulaire

Déterminer les groupes de gènes enrichis dans des cellules CD133+ de patients ayant bénéficié de la thérapie cellulaire dans deux études cliniques distinctes : IMPACT-CABG (12 patients) et COMPARE-AMI (13 patients) :

- a. Les patients de ces deux études cliniques seront classés comme répondant vs non-répondant sur la base d’une amélioration globale de leur fonction ventriculaire gauche. L’expression de 20,800 gènes par ces cellules (mises en banques lors de ces études cliniques) sera analysée par Ampliseq pour établir des patrons communs.

Deuxième partie – Imitation phénotypique en vue d’optimisation de thérapie cellulaire

Essayer de reproduire le phénotype des répondants *in vitro* avec des molécules ayant des effets pro-angiogénèse, pro-développement sur des cellules souches mésenchymateuses humaines dans des conditions normales et hypoxiques (pour simuler le milieu de cardiomyopathie ischémique) :

- a. Voir l’activation de kinase de type ‘RISK’ de CSMh suite à la stimulation avec le Célastrol;
- b. Déterminer l’effet du conditionnement de CSMh avec des inhibiteurs du HSP90 sur la sécrétion protéique et d’exosomes;

- c. Démontrer que l'activation de CSMh suite au conditionnement n'altère pas leur expression de molécules de surface;
- d. Identifier les gènes exprimés par les CSMh en normoxie et en hypoxie par analyse TaqMan pour contraster avec ceux des CD133+ de patients répondants;
- e. Analyser l'effet sur la guérison de plaie de HUVECs par Scratch-Test lorsque ces derniers sont mis en coculture avec des CSMh conditionnées avec du Célastrol ou un analogue du Célastrol;
- f. Évaluer le potentiel des inhibiteurs du Célastrol sur la survie cellulaire post décongélation des CSMh et CD133+ ainsi que sur la sénescence oxydative des CSMh.

Première partie - Patrons d'expression cellulaire

Cellules CD133+ - COMPARE-AMI

Les patients randomisés au traitement CD133+ ont eu une aspiration de moelle osseuse dans les 3 à 7 jours suivant leur intervention percutanée lors d'un infarctus du myocarde aigu. Une moyenne de 100cc d'aspirat de moelle osseuse a été obtenue par patient. Les cellules CD133+, CD34+, CD45+ triple-positives ont par la suite été sélectionnées grâce à des billes paramagnétiques composées de particules de fer-dextran conjuguées à des anticorps monoclonaux anti-CD133 avec le Système CliniMACS CD133+ Reagent System (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Allemagne) en suivant le protocole du manufacturier, pour être ensuite séparées par une colonne magnétique de séparation à haut-gradient. Les préparations ont été évaluées pour leur pureté, leur viabilité, leur stérilité ainsi que pour leur absence d'endotoxine. L'infusât produit a ensuite été livré au patient directement, en dedans d'une période de 12 heures, en intra-coronarien dans la zone préalable d'implantation de tuteur via un cathéter d'angioplastie. Quant aux patients randomisés au bras contrôle, ils ont plutôt reçu une préparation de normal salin contenant 10% de plasma autologue. Quatre cycles d'occlusion par ballon d'une période de 3 minutes suivie d'intervalles de périodes de reperfusion de 3 minutes ont permis une injection maximale de 10 millions de cellules autologues CD133+ par patient. D'un point de vue clinique, les patients ont été classifiés comme répondant vs non-répondant sur la base d'une augmentation de $\geq 3\%$ de leur FEVG à 4 mois afin d'obtenir suffisamment de patients par groupe pour procéder à des analyses plus poussées.

Cellules CD133+ - IMPACT-CABG

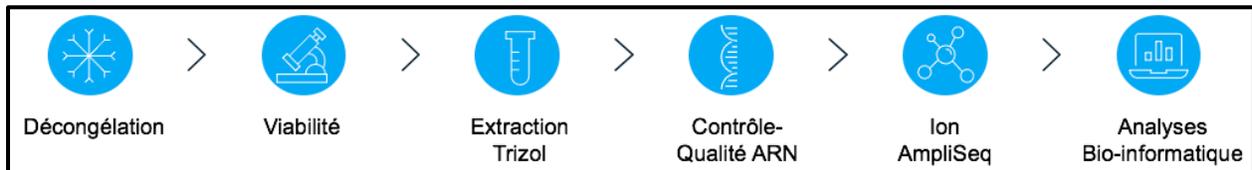
Les patients d'IMPACT-CABG ont eu une aspiration de moelle osseuse le matin de leur intervention. Les cellules ont été traitées, sélectionnées et leur qualité confirmée par la même méthode que celle décrite dans l'étude COMPARE-AMI. Une préparation cellulaire contenant au

minimum 0.5 million et au maximum 10 millions de cellules CD133⁺, CD34³⁴⁺, CD45⁺ triple-positives a été livrée en salle d'opération pour les patients randomisés à la thérapie cellulaire, alors que les patients contrôles ont reçu une injection de normal salin avec 10% de plasma autologue. Le jour même de la préparation cellulaire, les patients ont subi une revascularisation chirurgicale avec circulation extra-corporelle et arrêt cardioplégique. Après la complétion des anastomoses distales, mais avant le retrait du clamp aortique, des aliquots de 0.2 cc de la suspension cellulaire (ou de plasma autologue) ont été injectés dans la zone périphérique de(s) infarctus tel qu'évalué en préopératoire par imagerie par resonance magnétique. Sur la base d'une échographie transthoracique de contrôle à 4 mois, les patients ont été classifiés comme répondeurs vs non-répondeurs sur une amélioration de leur FEVG de $\geq 3\%$.

Analyse des profils d'expression géniques

Chez certains patients, l'excédent cellulaire prélevé n'a pu être congelé en raison d'une mauvaise qualité de l'ARN et/ou à une trop faible quantité cellulaire nécessaire à l'analyse. Finalement, les cellules de 13 patients par étude ont été conservées à -80° Celsius, puis décongelées dans du milieu de RPMI + FBS + NaHCO₃ + HEPES + DNase et leur viabilité déterminée par LIVE/DEAD Assay (ThermoFisher Scientific). Elles ont ensuite été mises en culture pendant 24 heures dans du milieu Stemspan (Stemcell Technology, 9650) spécialement conçu pour les cellules souches hématopoïétiques (sans sérum ni cytokines pour ne pas interférer avec les gènes lors du séquençage). Au total, par patient, 20g d'ARN des cellules CD133+ ont été extraits (Trizol, ThermoFisher Scientific). La qualité, l'intégrité précise et la quantité d'ARN ont été validées par Agilent RNA 6000 Pico Kit (Agilent) selon les recommandations du manufacturier, afin d'assurer la viabilité et la fiabilité des données générées. L'ARN a été inversement transcrit, puis amplifié/séquéncé grâce à la technologie de criblage à haut débit Ion AmpliSeq (ThermoFisher Scientific) et analysé grâce au logiciel Torrent Suite v5.6.0 et aux modules d'extensions ampliSeqRNA v5.6.0.3 (Thermo Fisher Scientific). Des amorces paires d'oligonucléotides appartenant à un panel ciblant l'expression génique ont été utilisées. Afin de les identifier, les séquences de nucléotides obtenues ont été comparées à celles des 20 800 gènes

humains appartenant à la banque de données RefSeq (NCBI). Des gènes nominalement significatifs et exprimés de façon différentielle ont été identifiés grâce à des analyses de GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) réalisées sur des voies de Gene Ontology (GO) et comparant les cellules de patients répondants à celles des non-répondants. Des cartes thermiques de termes GO significativement associés ont été produites.



Procédure d'identification de l'expression génétique des cellules CD133+ banquées.

Deuxième partie – Conditionnement *in vitro* pour optimiser les cellules souches

Culture cellulaire

Des HUVECs (ATCC) et des CSMh ont étéensemencées pendant 2 heures sur des plaques et/ou flasques (préalablement tapissé de gélatine A 1% stérile) dans du PBS. Un milieu de M200 (Life technologies) contenant du FBS 5% (Life technologies), 1% de supplément de croissance à faible sérum (Life technologies) et 1% de pénicilline/streptomycine (Life technologies) a été utilisé pour les HUVECs. Pour les CSMh, un milieu de aMEM (Life) et une concentration de 10% de FBS a plutôt été utilisée. Les cellules ont incubé à 37°C dans un incubateur humidifié à 5% de CO₂. Le milieu était remplacé aux 2 jours et le passage de cellules lorsque arrivé à 90% de confluence.

Analyse de signalisation

Des CSMh ont étéensemencées à 400 000 cellules/plaque dans des pétris de 6 cm (Sarstedt) et incubées à 37°C pendant 24 heures avant stimulation au Célastrol (Cayman Chemical; solutions stocks dans du DMSO à une concentration de 10⁻³ mM). Les deux conditions à l'étude : 1) cinétique : Célastrol 1uM pendant 5, 15, 30 et 60 minutes, 2) récupération : Célastrol 1uM pendant 1 heure, suivi d'une période de 3, 6, 12 ou 24 heures de récupération. Après le

traitement, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS 1X et les plaques ensuite incubées dans une solution de lyse (50mM Hepes, 1% NP-40, 4mM EDTA, 1mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 1mM phenylmethanesulfonyl fluoride et 1 mM pyrophosphate de Na) pendant 30 minutes sur glace. Les cellules lysées ont été centrifugées à 13000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Les protéines ont été dosées et dénaturées pour migration sur gel SDS-PAGE 10%. Les extraits protéiques dosés également sont mélangés à un tampon de chargement (Bioland Scientific 6X Laemmli SDS sample buffer) pour un ratio de 5 :1 avec 5 uL de b-mercapoéthanol. Les puits de gels de séparation 10% (30% mix acryl-bisacylamide, 1.5M Tris pH 8.8, 10% SDS, 10% persulfate d'ammonium et TEMED dans 10cc d'eau distillée) sont remplis et la migration a ensuite lieu sur une période de 120 minutes à 120V dans une solution tampon (SDS, Tris, glycine). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de PVDF pendant 2 heures, à 30V et 4°C. Les membranes sont bloquées avec du lait à 5% dans du PBS pour ensuite incubées avec l'anticorps primaire (voir ci-bas; dans une solution de lait 5%-PBS) pendant 12 heures à 4°C. Les membranes sont ensuite lavées avec du PBS-0.1% Tween20 avant d'incuber avec l'anticorps secondaire (voir ci-dessous) pendant 1 heure avec agitation. La révélation s'est faite avec le ECL (Perkin Elmer) et la quantification a ensuite lieu avec le logiciel NIH Image J version 1.52 (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

Les anticorps primaires suivants ont été utilisés : p-Akt (Cell signaling technology, lapin, 1:2000), AKT (CST, lapin, 1:4000), p-ERK 1/2 (CST, souris, 1:2000), ERK 1/2 (CS, souris, 1 :4000), HSP70 (Enzo life science, souris, 1 :1000) et GAPDH (ELF, souris, 1 :1000). Les anticorps secondaires suivants ont été utilisés : chèvre anti-souris HRP (Santa Cruz biotechnology, 1 :3000) et chèvre anti-lapin HRP (SCB, 1 :3000).

Isolation d'ARN, préparation d'ADNc

Des CSMh en culture ont été traitées au Célastrol à différentes concentrations de Célastrol pendant 1 heure (10^{-6} M et 10^{-7} M) et exposées à des conditions de normoxie et d'hypoxie de 24h à l'aide d'un incubateur hypoxique. Suivant 24 heures de récupération, l'ARN a été extrait et inversement transcrit grâce à des trousse de synthèse d'ADNc (SuperScript™ IV VIL0™ Master Mix, ThermoFisher Scientific) en suivant les recommandations du manufacturier.

Par la suite, 540uL d'échantillon d'ADNc et 540 uL de Master Mix (2X) ont été combinés dans des tubes de microcentrifuge, vortexés et centrifugés. De ce mélange, 10 uL ont été extraits et déposés par puits sur des plaques personnalisées 96-well TaqMan Fast, lesquelles ont été hermétiquement scellées avec du film adhésif MicroAmp™, vortexées et cetrifugées (1500 rpm, 30 sec). Un qPCR TaqMan a été exécuté selon les recommandations du manufacturier avec l'appareil StepOnePlus™ (ThermoFisher Scientific). La magnitude relative a été calculée selon la méthode $\Delta\Delta Cq$ en ajustant le niveau de base et de seuil et en éliminant les valeurs aberrantes du schéma d'amplification. Une normalisation à 1 a été faite sur la condition contrôle (véhicule en Normoxie). Les calculs ont été effectués selon la méthode Pfaffl.

Test de guérison de plaie avec des HUVECs en co-culture avec des CSMh stimulées

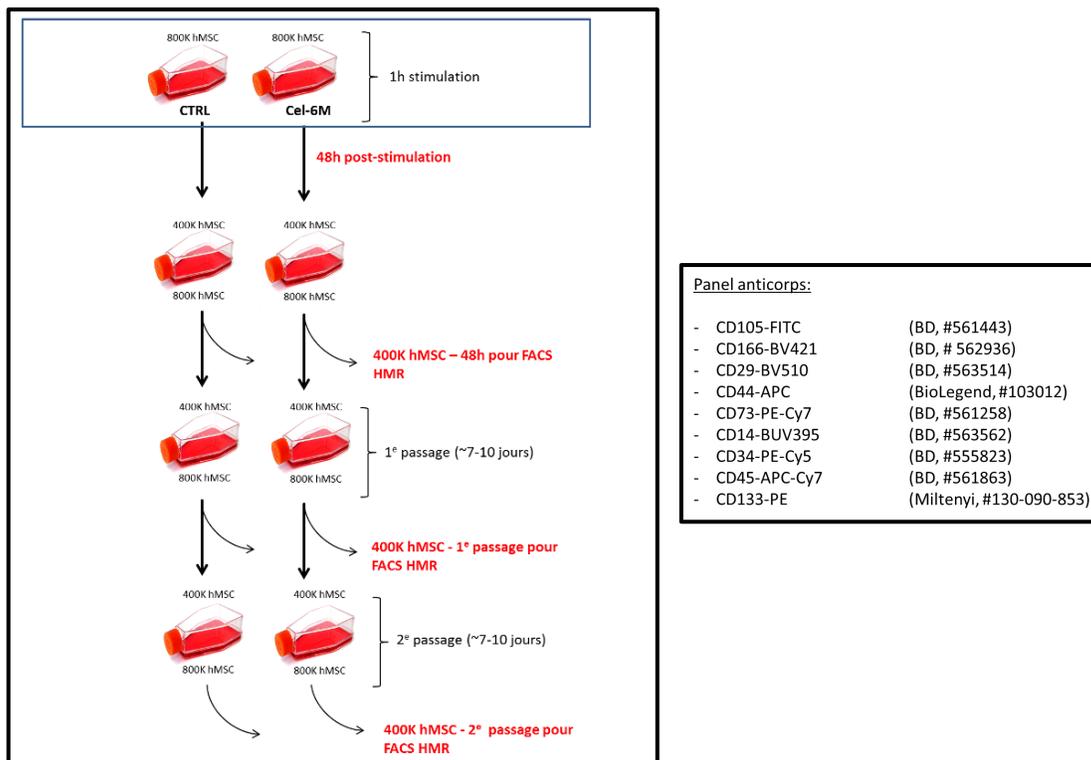
Des pétris 35 mm (Ibidi) ont été pré-tapissées avec de la gélatine A 1%/PBS stérile. Deux heures plus tard, des cellules HUVECs ont étéensemencées à raison de 15 000 cellules/puits dans du milieu M200 (Life tech) complémenté par du FBS 5% (Life tech), 1% LSGS (Life tech) et 1% pénicilline/streptomycine (Life tech) dans les puits d'un 3 Well Culture-Insert (Ibidi). Les CSMh ont étéensemencées autour de la chambre IBIDI. Le tout a ensuite incubé à 37°C durant 24h. Les cellules CSMh ont ensuite été stimulées pendant 1 heure dans de l'aMEM avec 1% FBS soit avec soit du Célastrol 10^{-6} M, 10^{-7} M, Véhicule, EGM, EBM, soit avec de différentes concentrations d'inhibiteurs d'HSP90 TargaRx et d'adjuvant 2HBA, puis lavées trois fois avec 50 uL/puit de milieu M200-1% FBS. L'insert a été enlevé et la coculture dans du M200 1% FBS a débuté. Les cellules ont ensuite été incubée à 37°C dans un appareil 'IncuCyte Zoom' (Essen) afin de prendre des photos avec une magnification de 10X en mode 'Scratch Wound' toutes les 2 heures pendant 24 heures. Par la suite, les images ont été analysées par le logiciel IncuCyte Zoom Scratch Wound et les données formatées sous la forme de graphiques.

Le 2HBA est un composant synthétique comparable à la curcumine et est un inducteur indirect d'enzymes qui catalysent les réactions de détoxification par les voies Keap1-Nrf2-ARE. L'activation du Nrf2 (qui fait part de l'élément de réponse antioxydante – ARE) a des effets

cytoprotectifs contre le stress oxydatif et électrophilique [237, 238]. Il est utilisé pour ces effets combinatoires avec ceux des inhibiteurs du HSP90.

Test du phénotype des CSMh conditionnées au Célastrol

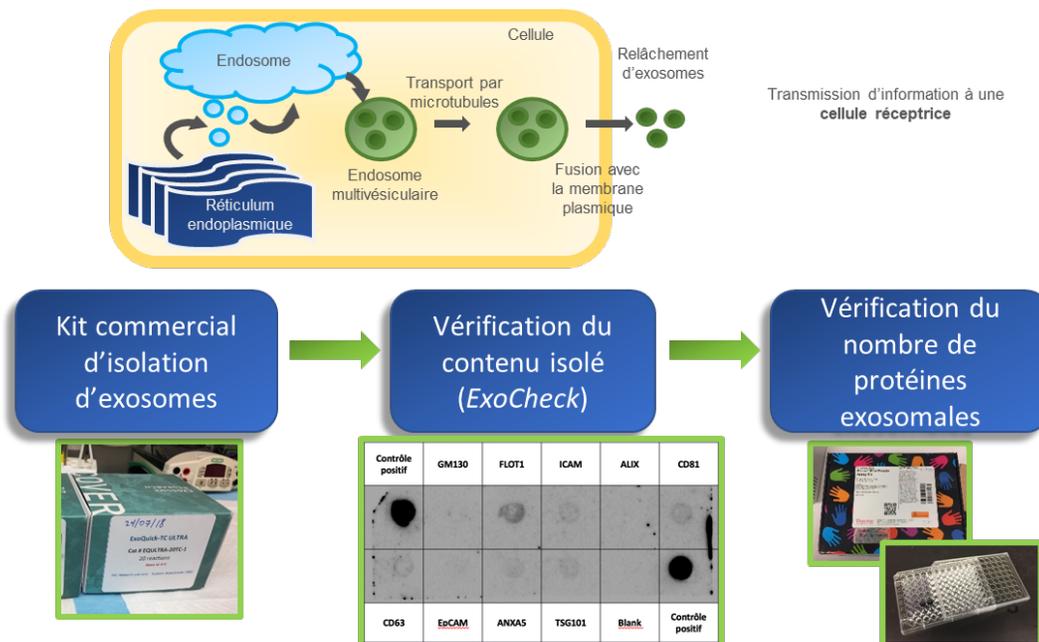
Des CSMh ont étéensemencées à raison de 800k cellules dans des flasques de type Falcon de 75 cm² dans du milieu aMEM avec 10% FBS. Elles ont ensuite été stimulées avec une solution contrôle ou avec du Célastrol à une concentration de 10⁻⁶ M. 1 heure post stimulation, un lavage a été effectué. 400k de ces cellules ont été cultivées pendant 48 heures. Suivant cette période d'incubation, ces mêmes cellules ont été analysées par cytométrie de flux (FACS) sur un cytomètre LSRII de BD et 400k cellules ont été remises en cultures. Le marquage a été fait selon le protocole du manufacturier (voir panel anticorps). Deux passages cellulaires (7-10 jours chacun) ont été effectués et les marqueurs cellulaires ont été analysés par FACS.



Procédure du test du phénotype des CSMh conditionnées au Célastrol et panel d'anticorps utilisés

Évaluation du sécrétome des CSMh conditionnées au Célastro

Des CSMh (1×10^6) ont soit été stimulées au Célastro à une concentration de 10^{-6} M ou gardées non-stimulées. Le milieu conditionné a été prélevé après 24 heures de washout et concentré. Les protéines isolées ont été séparées par électrophorèse et analysées par spectrométrie de masse. La magnitude de différence d'expression protéique entre les cellules stimulées et non-stimulées est représentée graphiquement.



Procédure de l'évaluation du sécrétome des CSMh conditionnées au Célastro

Évaluation de la sécrétion des exosomes chez les CSMh conditionnées à l'analogue du Célastro + adjuvant

Des CSMh, dans du milieu aMEM 1% FBS, ont été stimulées avec différentes concentrations et combinaisons d'analogue du Célastro et d'adjuvant (TargaRx-7, TargaRx0.5uM + 2HBA 2uM, TargaRx 0.1uM + 2HBA 1uM, TargaRx 0.05uM + 2HBA 5uM) pendant 1 heure et puis lavées deux fois. Elles sont ensuite incubées dans du milieu aMEM sans sérum pendant 48

heures. Le milieu conditionné a été récupéré, les cellules comptées (pour la normalisation) et puis trypsinisées. Le tout a été centrifugé à 1500 rpm durant 15 minutes pour éliminer les débris cellulaires. Avec très grande précaution (en évitant de prélever des débris cellulaires), le surnageant a été récupéré et la sécrétion d'exosomes vérifiées grâce à une trousse d'isolation commerciale (ExoQuick, SBI systems). Le contenu isolé a aussi été vérifié par *ExoCheck*. Le surnageant a donc été transféré dans un tube d'ultrafiltration 3kDa et centrifugé pendant 20 minutes à 3000g et, ensuite, dans un deuxième tube. 1/5 du milieu obtenu a été ajouté à *ExoQuick* et bien mélangé. Le tout a été incubé sur la glace au moins 12 heures à 4°C avant de déterminer la sécrétion d'exosomes.

Protection de la viabilité chez les CSMh et les CD133+

Des cellules soit CSMh (500k) ou CD133+ (100k), ont été congelées dans du milieu de culture complet (CSMh : aMEM avec 10% FBS, CD133+ : FBS) avec une concentration de 2% de DMSO. Après 7 jours de congélation à -150°C, les cellules ont été décongelées de façon standard et une mesure de la viabilité a été effectuée avec bleu de Trypan au moment de la décongélation, à 60 minutes et à 2 heures.

Évaluation de la sénescence oxydative de CSMh conditionnées au Célastrol

Dans des plaques de 96 puits, 5000 CSMh ont étéensemencées. Le jour suivant la mise en plaque et pendant un total de 7 jours, les cellules ont été soumises à diverses conditions. Elles sont soit demeurées non-stimulées ou ont reçu un traitement d'un véhicule ou d'un analogue du Célastrol (U937) à une concentration de 10^{-6} , 10^{-7} ou 10^{-8} dans du milieu aMEM 1% FBS. Suivant cette stimulation, les cellules ont été lavées deux fois puis soumises à un stress oxydatif (H_2O_2 ; concentration 0, 0.025 mM, 0.05 mM et 0.1 mM) dans du aMEM sans FBS pendant une heure. Après 7 jours, une mesure de l'activité b-galactosidase a été effectuée avec la trousse 'Cellular Senescence Activity Assay' (Enzo, ENZ-KIT129).

Première partie - Patrons d'expression cellulaire des cellules souches des répondants et non répondants

Caractéristiques des patients

Les études COMPARE-AMI et IMPACT-CABG sont des études de phase II ayant pour objectif primaire d'évaluer la faisabilité et la sécurité de la thérapie cellulaire aux cellules CD133+, mais aussi, d'en étayer les effets. Les cellules souches CD133+ des patients ayant participé à ces deux études ont été prélevées et sélectionnées de façon identique. Cela dit, les patients diffèrent cliniquement par leur présentation (infarctus du myocarde aigu vs cardiomyopathie ischémique chronique) et la méthode d'administration de la thérapie (injection intracoronarienne vs intramyocardique). Les caractéristiques démographiques et cliniques entre les populations ont été comparées afin d'évaluer les similitudes et les différences entre les populations de ces deux études (**Tableau 1**).

Caractéristiques démographiques	COMPARE-AMI		IMPACT-CABG	
	CD133+	Placebo	CD133+	Placebo
Patients	17	20	19	14
Âge (moy±DS)	51±7.0	50.5±9.5	66.4±6.5	63.1±7.2
Sexe (H)	14 (82.4%)	19 (95%)	17 (89.5%)	13 (92.9%)
IMC (kg/m ² , moy±DS)	28.2±2.1	28.7±3.1	28.8±6.2	29.1±4.0
Hypertension	7 (41.2%)	5 (25%)	16 (84.2%)	10 (71.4%)
Dyslipidémie	3 (17.6%)	7 (35%)	18 (94.7%)	13 (92.9%)
Diabète (Type II)	0 (0%)	3 (15%)	10 (52.6%)	3 (21.4%)
Caractéristiques cliniques	CD133+	Placebo	CD133+	Placebo
FEVG (ECHO, moy±DS)	40%±4%	40%±1.7%	40%±7%	40%±7%
NYHA classe III-IV			12 (63.2%)	11 (78.6)
IM récent (<6m)			7 (36.8%)	8 (57.1%)
IM ancien (>6m)			11 (57.9%)	9 (64.3%)

Fenêtre symptômes-ballon (min)	247 (146, 380)	224 (129, 677)		
Infarctus à onde Q	8 (50%)	12 (63.2%)		
Killip I (pré-procédure)	15 (93.58%)	16 (80%)		
Caractéristiques procédurales				
	CD133+	Placebo		
Greffons (n, moy±DS)			3.4±1.0	3.0±0.7
Revascularisation incomplète			4 (9.8%)	2 (10.5%)
Nombre de sites d'injection			13.8±2.2	12.8±0.9
Territoire - IVA	12 (88.2%)	12 (60%)		

Tableau 1 : Différences démographiques, cliniques et procédurales entre les populations des études COMPARE-AMI et IMPACT-CABG. L'âge, le sexe et l'IMC des patients se ressemblent entre les populations. Les patients de COMPARE-AMI présentent notamment moins d'antécédents d'hypertension, de dyslipidémie et de diabète. La fraction d'éjection ventriculaire gauche entre les groupes est semblable. Des caractéristiques cliniques et procédurales additionnelles sont présentées afin de mieux définir les populations.

Les groupes de patients se ressemblent généralement en ce qui trait à l'âge, la proportion d'hommes et l'indice de masse corporelle, les patients d'IMPACT-CABG présentant cependant, de façon beaucoup plus importante, des facteurs de risques de maladie cardiovasculaire chronique tels l'hypertension, la dyslipidémie et le diabète de type II. La fraction d'éjection ventriculaire gauche des patients au moment de l'étude (FEVG ≈ 40%) était semblable parmi tous les groupes étudiés. Puisque la présentation clinique des groupes et l'approche procédurale préconisée diffèrent d'une étude à l'autre, ces autres paramètres n'ont pas pu être comparés directement.

Évaluation de la réponse clinique à la thérapie cellulaire

Afin de déterminer les phénotypes cellulaires favorables responsables d'une réponse clinique, les patients ayant été randomisés aux bras CD133+ et dont les cellules avaient été congelées ont été identifiés. Certains échantillons contenaient une quantité insuffisante de cellules résiduelles pour en permettre l'analyse (**Tableau 2**).

	COMPARE-AMI	IMPACT-CABG
CD133+ (n)	17/37	19/33
Échantillon adéquat	13/17 (76.5%)	13/19 (68.4%)

Tableau 2 : Identification du nombre de patients recevant des cellules souches par étude et proportion de cellules souches ayant été congelées par étude (%).

Les patients dont les cellules ont été congelées ont par la suite été phénotypés selon leur réponse à la thérapie cellulaire. Sur la base d'une augmentation échographique transthoracique significative de leur FEVG, ils ont été classés comme répondants et non-répondants. Pour les patients de COMPARE-AMI, une augmentation de $\geq 3\%$ de la FEVG à 4 mois a été qualifiée de significative. Pour l'étude IMPACT-CABG, une valeur de $\geq 3\%$ d'augmentation de la FEVG à 6 mois a aussi été retenue. Ce seuil a été retenu selon des études animales et cliniques dans des modèles de cardiopathies qui démontraient un effet fonctionnel de la thérapie sur la fraction d'éjection d'environ 3% [183, 192]. Une étape additionnelle de contrôle de la viabilité des cellules CD133+ décongelées et d'obtention d'ARN de qualité adéquate a été réalisée afin de poursuivre avec des analyses transcriptomiques subséquentes. Ces étapes ont éliminé un patient répondant dans l'étude IMPACT-CABG (**Tableau 3**).

	COMPARE-AMI				IMPACT-CABG		
	Répondant	Non-Répondant	Tot		Répondant	Non-répondant	Tot
Cellules congelées	5	8	13		4	9	13
ARN Check	5	8	13		3	9	12

Tableau 3 : Nombre de patients classés répondants et non-répondants ayant eu leurs cellules congelées. Nombre de patients ayant de l'ARN de qualité adéquate afin de procéder au criblage à haut débit.

Les cellules CD133+ des patients de COMPARE-AMI et d'IMPACT-CABG possèdent des patrons d'expression différents

Les cellules CD133+ des études COMPARE-AMI et IMPACT-CABG ont été prélevées et isolées de la même façon, elles partagent donc des signatures transcriptomiques très semblables. Cela dit, les analyses transcriptomiques démontrent des signatures d'expression différentes et grâce à ces différences, il est possible d'en déduire le comportement qui lui aussi semble différer (**Figure 1**). Des contrastes marqués existent en ce qui concerne l'expression des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la localisation de centrosomes, les processus liés à la synthèse et au traitement de l'ADN et de l'ARN ainsi que dans le catabolisme de l'ADN. À un degré moindre, des différences apparaissent également entre les fonctions reliées à l'activité et du maintien des télomères et mitochondries. L'expression diamétralement opposée de ces gènes par les cellules des deux études suggère que des différences phénotypiques existent également. Nous avons ensuite comparé les profils d'expression moléculaire des patients répondants et non répondants dans les études.

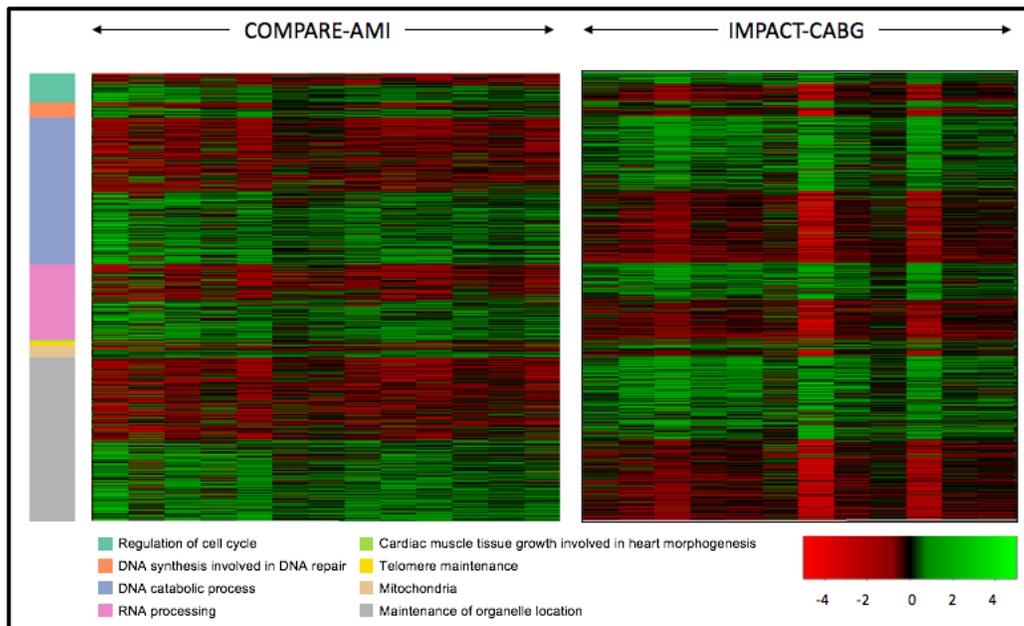


Figure 1 : Les différences d'expression entre les cellules CD133+ des études COMPARE-AMI et IMPACT-CABG. Les cellules CD133+ d'une même étude démontrent des patrons d'expressions et d'activation bien conservés entres-elles (peu importe si elles proviennent de patients répondants ou non-répondants), mais qui sont à l'opposé des patrons démontrés par les CD133+ de l'autre étude. Parmi des catégories géniques bien définies (légende et axe des Ys), les patrons exprimés diffèrent aussi d'un groupe à l'autre.

Analyse des patrons d'expression des cellules CD133+ des patients répondants de COMPARE-AMI

Les patrons d'expression des cellules des patients répondants et non-répondants à l'intérieur d'une même étude ont été analysés. Les catégories géniques identifiées les plus significatives sont illustrées à l'aide de cartes thermiques (**Figure 2A**). Les catégories de gènes des cellules CD133+ de l'étude COMPARE-AMI qui diffèrent le plus significativement entre répondants et non-répondants sont présentées. Elles incluent des groupes de gènes associés au métabolisme cellulaire, à la progression du cycle cellulaire, à la régulation d'expression génique, aux processus métaboliques et aux voies de sécrétion de vésicules extracellulaires.

Évaluation des réseaux d'interconnexion entre les catégories de gènes qui diffèrent entre les groupes de COMPARE-AMI

Afin de préciser si des gènes communs existent entre les groupements de gènes identifiés et de déterminer leur degré d'implication, des analyses bio-informatiques de GSEA plus poussées ont permis d'interrelier les gènes appartenant aux catégories identifiées et d'établir de nouveaux liens (**Figure 2B**). Parmi les groupes identifiés avec les différences les plus significatives, on retrouve le métabolisme cellulaire, l'adhésion, la régulation d'expression génique, la progression de cycle cellulaire, et la réponse au stress/protection cellulaire (en ordre décroissant d'importance). Les gènes spécifiques qui semblent les plus impliqués ont également été identifiés.

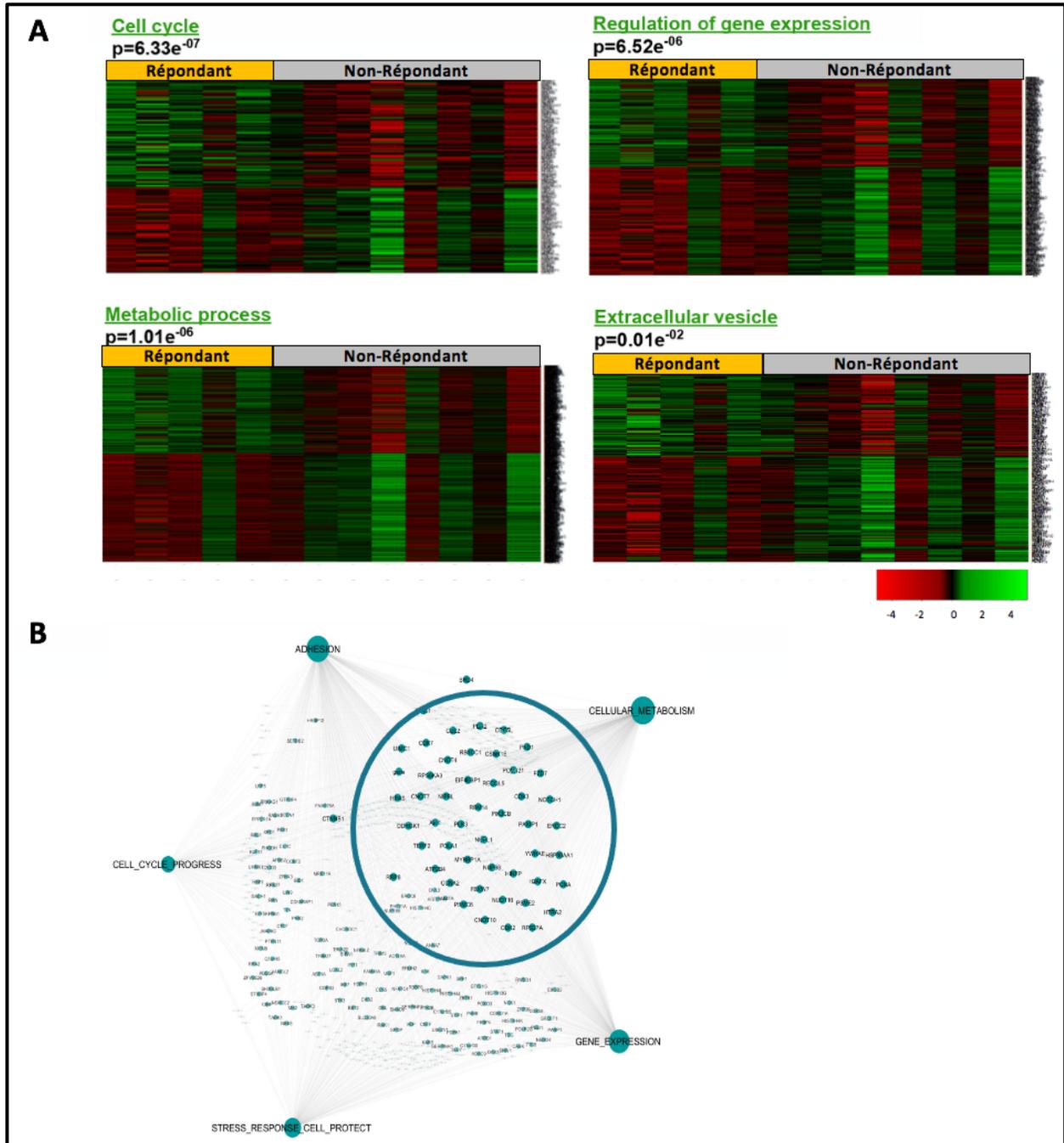


Figure 2 : A) Les cellules des patients répondants de l'étude COMPARE-AMI expriment des gènes liés au cycle cellulaire, à la régulation d'expression génique, aux processus métaboliques et à la sécrétion des vésicules extracellulaires en comparaison avec les cellules des non-répondants. B) Représentation réseau des gènes partagés entre les catégories des patients répondants. Plus la taille de police d'un gène est grande, plus le gène est hautement relié entre les catégories. Les réseaux les plus importants semblent impliquer des phénotypes de métabolisme cellulaire, d'adhésion et d'expression génique.

Étude des patrons d'expression des cellules CD133+ des patients répondeurs
d'IMPACT-CABG

Les cellules CD133+ des patients d'IMPACT-CABG ont aussi démontré des patrons d'expression significativement différents entre les cellules des patients classés comme répondeurs et non-répondeurs (**Figure 3**). Les catégories identifiées incluent des groupes de gènes impliqués dans l'angiogenèse, les cascades de signalisation MAP kinases, la régulation de la réponse au stress, la régulation des processus d'apoptose, la production de cytokines, la chimiotaxie, la régulation positive de la migration cellulaire et l'adhésion cellulaire.

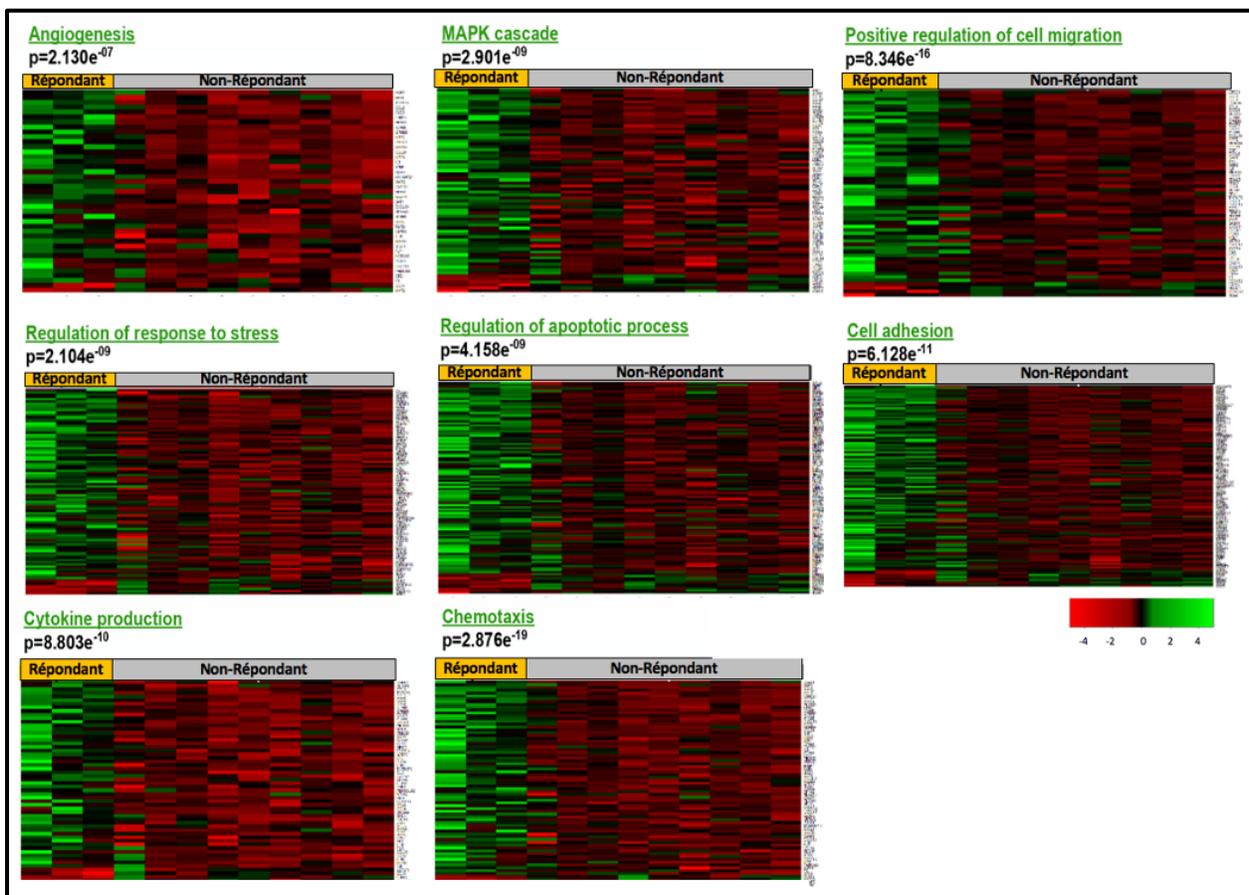


Figure 3 : Les cellules des patients répondeurs (augmentation de la FEVG \geq 3%) de l'étude IMPACT-CABG expriment de façon significative des gènes liés à l'angiogenèse, les cascades de signalisation MAP kinases, la régulation de la réponse au stress, la régulation des processus d'apoptose, la production de cytokines, la chimiotaxie, la régulation positive de la migration cellulaire et à l'adhésion cellulaire (vert = augmentation, rouge = diminution expression relative)

Identification des réseaux et des gènes modulés dans les cellules des patients répondeurs d'IMPACT-CABG

Comme pour l'étude des cellules de COMPARE-AMI, nous avons étudié le degré d'implication et les réseaux de liaisons entre les catégories géniques. Une liste des gènes les plus significativement interreliés a pu être établie.

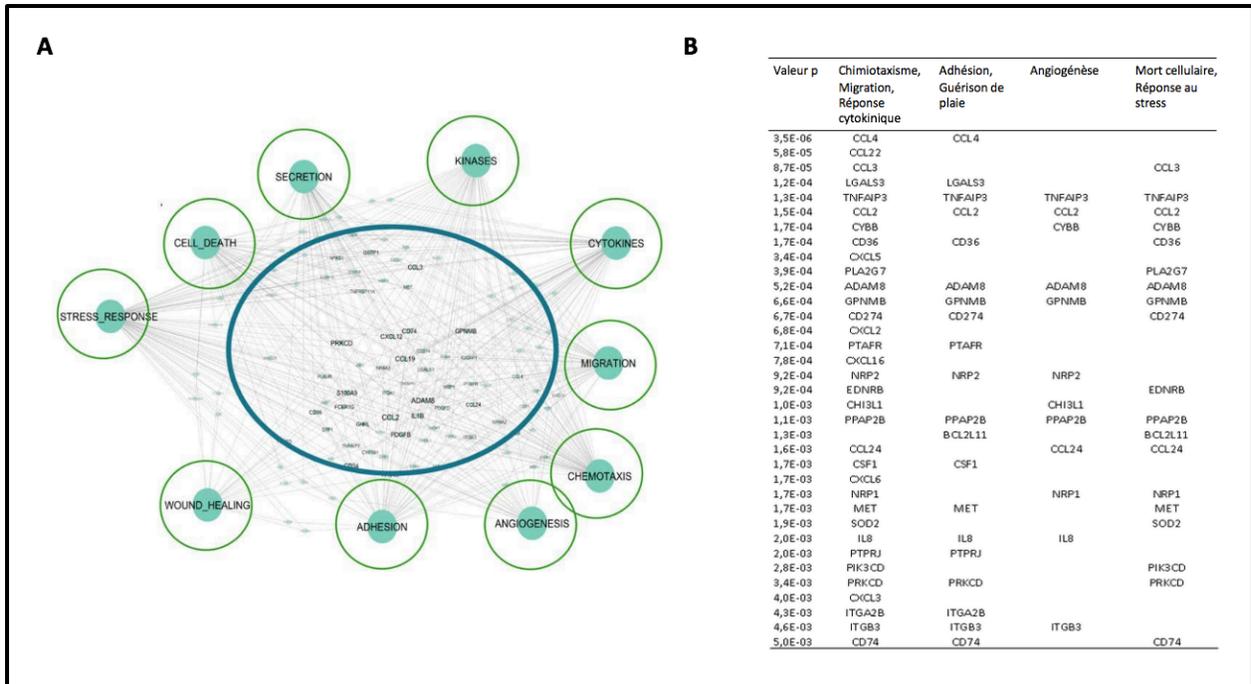


Figure 4 : A) Représentation réseau des gènes partagés entre les catégories de gènes des patients répondeurs. Plus la taille de police d'un gène est grande, plus le gène est hautement relié entre les catégories. Les réseaux les plus importants semblent impliquer des phénotypes de réponse au stress, de migration, de chimiotaxisme, d'activation de voie de signalisation, de production cytokinique, d'angiogenèse et de guérison de plaie. B) Liste des gènes les plus significativement exprimés et les plus interreliés.

Stratégie adaptée dans la recherche de l'optimisation des cellules souches

Les cellules CD133+ des patients des études de COMPARE-AMI et d'IMPACT-CABG ont des différences phénotypiques différentes probablement en lien avec le protoplasme des patients qui lui aussi diffère. Attribuant l'évolution clinique favorable des patients répondants à la thérapie cellulaire, les analyses effectuées dans cette première partie ont permis d'identifier les patrons d'expression et les gènes spécifiques qui étaient les plus ou les moins exprimés par les cellules des répondants en comparaison avec celles des non-répondants. Dans l'optique de futures études cliniques de phases plus avancées pour but primaire l'évaluation de l'effet de la thérapie cellulaire, l'imitation et la réplication de ces phénotypes cellulaires pourraient permettre de cibler et de favoriser la réponse clinique souhaitée. Des études *in vitro* ont été réalisées avec des CSMh avec comme objectif de générer un phénotype qui pourrait ressembler aux cellules des patients répondants par optimisation pharmacologique. Le Célastrol a été utilisé pour ses effets décrits précédemment ainsi que pour son effet spécifique de sensibilisation cellulaire. Le but est d'optimiser les cellules souches par une intervention pharmacologique précédant leur utilisation chez les patients.

Deuxième partie – Optimisation pharmacologique des cellules souches avec des inhibiteurs d’HSP90

Étude de l’activation cellulaire CSMh suite à la stimulation au Célastrol

Les cellules des répondants expriment des gènes reliés à l’activation de kinases et de réponse au stress, d’angiogénèse et de guérison de plaie. Afin de déterminer si un traitement au Célastrol active des voies de signalisation qui s’apparentent aux gènes exprimés des cellules de patients répondants, les CSMh ont été stimulées au Célastrol et la cinétique de production de kinases associés de type ‘RISK’ (MAP kinases et PI3K) a été évaluée (**Figure 5A**). Le Célastrol stimule la phosphorylation de MAP kinases. La forme active et phosphorylée d’AKT à partir de 5 minutes, mais maximale entre 30-60 minutes, de même que p-ERK qui s’active entre 15-30 minutes. Nous avons ensuite déterminé, suite à une stimulation avec Célastrol de 1 heure et une période de récupération de 1h-24h, l’expression de HSP70 et HO-1. Tous deux sont exprimés maximale entre 6-24h post stimulation au Célastrol (**5B**).

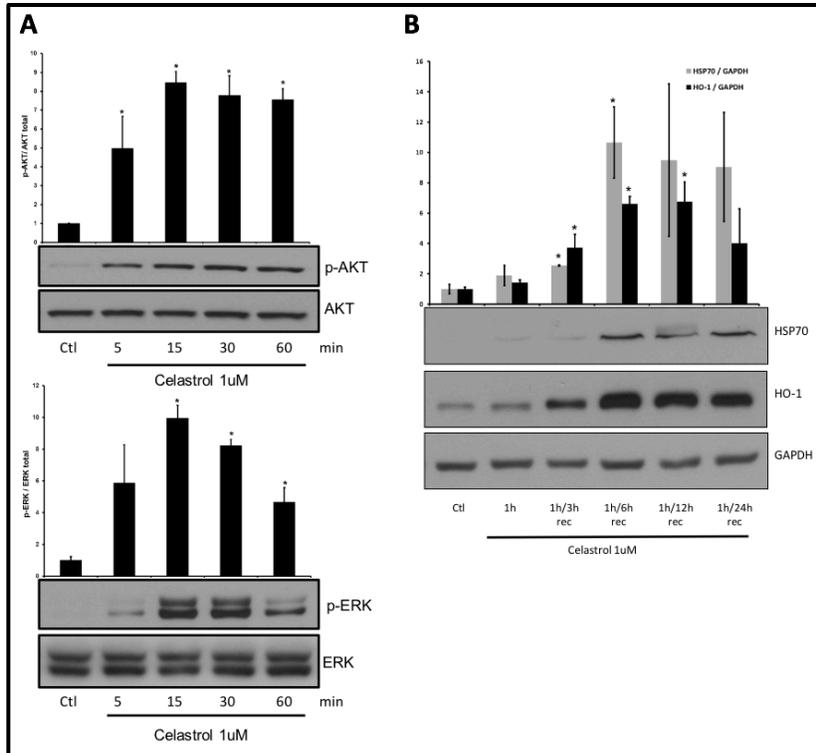


Figure 5 : A. Cinétique d’expression et d’activité de MAP kinases dont AKT et ERK. p-AKT est maximale exprimé 15 min post stimulation au Célastrol et p-ERK entre 15-30 minutes. B. HSP70 et HO-1 sont maximale exprimés suivant une période de récupération de 6-12h post stimulation.

La sécrétion par des CSMh stimulées au Célastrol et à des analogues

Afin de déterminer si l'activation des CSMh stimulées au Célastrol (10^{-6} M) est liée à une sécrétion de médiateurs protéiques extracellulaires, le milieu conditionné a été concentré et analysé par spectrométrie de masse. Le traitement pharmacologique des cellules souches mène à une expression majorée de plusieurs molécules impliquées dans des processus de croissance, de réponse au choc thermique, à des effets antioxydants et à des molécules d'adhésion. La sécrétion de plus de cent protéines est augmentée après une heure de traitement au Célastrol par rapport aux cellules non traitées; les dix protéines les plus fortement différentiellement exprimées sont présentées dans le **Tableau 4**.

Protéine sécrétée	Magnitude d'augmentation
Cytokines et facteurs de croissance	
Facteur de stimulation de colonies de macrophages 1 – (<i>M-CSF</i>)	24.3
Facteur de croissance des hépatocytes – (<i>HGF</i>)	2.1
Protéines de choc thermique	
Protéine de choc thermique HSP 90-alpha – (<i>HSP90A</i>)	6.5
Protéine de shock thermique beta-1 – (<i>HSPB1</i>)	2.0
Hème-oxygénase 1 – (<i>HO-1</i>)	2.2
Protéine de choc thermique HSP 90-beta – (<i>HSP90B</i>)	2.2
Antioxydants	
Glutathion S-transférase – (<i>GST</i>)	2.8
Thiorédoxine – (<i>Trx</i>)	2.2
Catalase	1.7
Molécules d'adhésion	
Isoforme beta-1B de l'intégrine beta-1 – (<i>ITGB1</i>)	4.9

Tableau 4 : Protéines sécrétées suivant une stimulation des CSMh avec du Célastrol (10^{-6} M) telles qu'identifiées par spectrométrie de masse. L'augmentation est exprimée par des degrés de magnitude en comparaison avec des cellules non stimulées. Les dix protéines les plus sécrétées sont présentées dans ce tableau et sont liées à des fonctions de croissance, de réponse au choc thermique, à l'antioxydation et à l'adhésion cellulaire.

Un conditionnement des CSMh avec un analogue du Célastrol (Targa Biotech) augmente aussi la sécrétion d'exosomes (sous-catégorie des VEs; **Figure 6**). Cette sécrétion est majorée en comparaison au véhicule suite à un traitement pharmacologique seul et/ou en lien avec l'utilisation de l'adjuvant 2HBA. Un adjuvant a été utilisé pour vérifier s'il pouvait potentialiser cette réponse mais, sous réserve de répétition(s) insuffisante(s), ne semble pas avoir conféré des avantages additionnels.

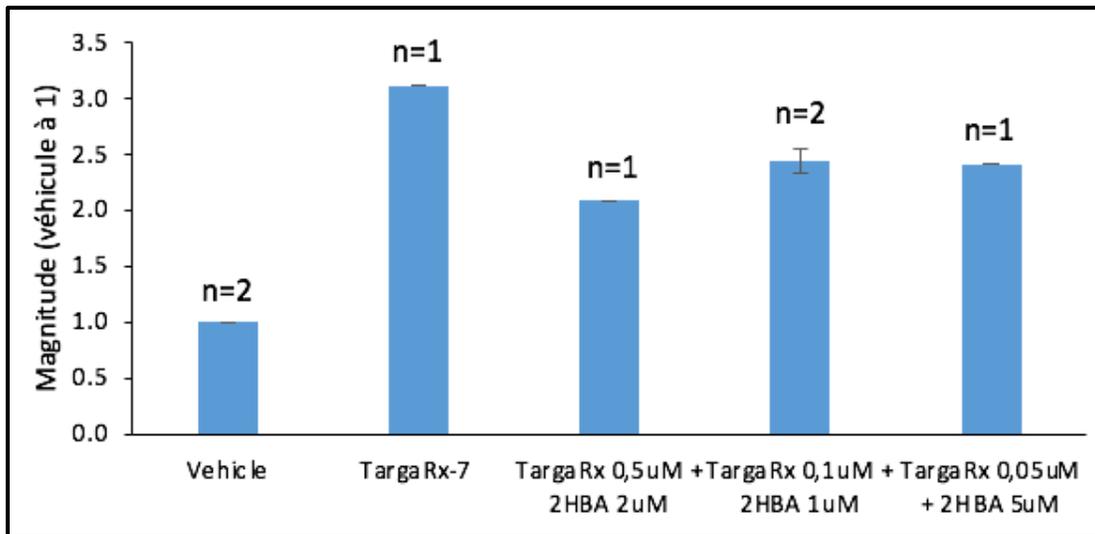


Figure 6 : La sécrétion d'exosomes est augmentée chez les CSMh ayant été conditionnées à l'analogue du Célastrol +/- avec adjuvant.

L'activation des CSMh par le Célastrol ne modifie pas l'expression de marqueurs de surface

Afin de nous que l'activation des CSMh et son expression protéique et sa sécrétion d'exosomes n'étaient pas liées à un changement de phénotype cellulaire, nous avons marqué les CSMh avec des marqueurs communément utilisés (CD105, CD73, CD166, CD44 et CD29) et nous avons déterminé si une stimulation au Célastrol menait à une expression différentielle de marqueurs communément utilisés pour identifier les types cellulaires par cytométrie de flux. Les CSMh conditionnées au Célastrol maintiennent le phénotype typique de CSMh et ce, même après de multiples passages (**Figure 7**).

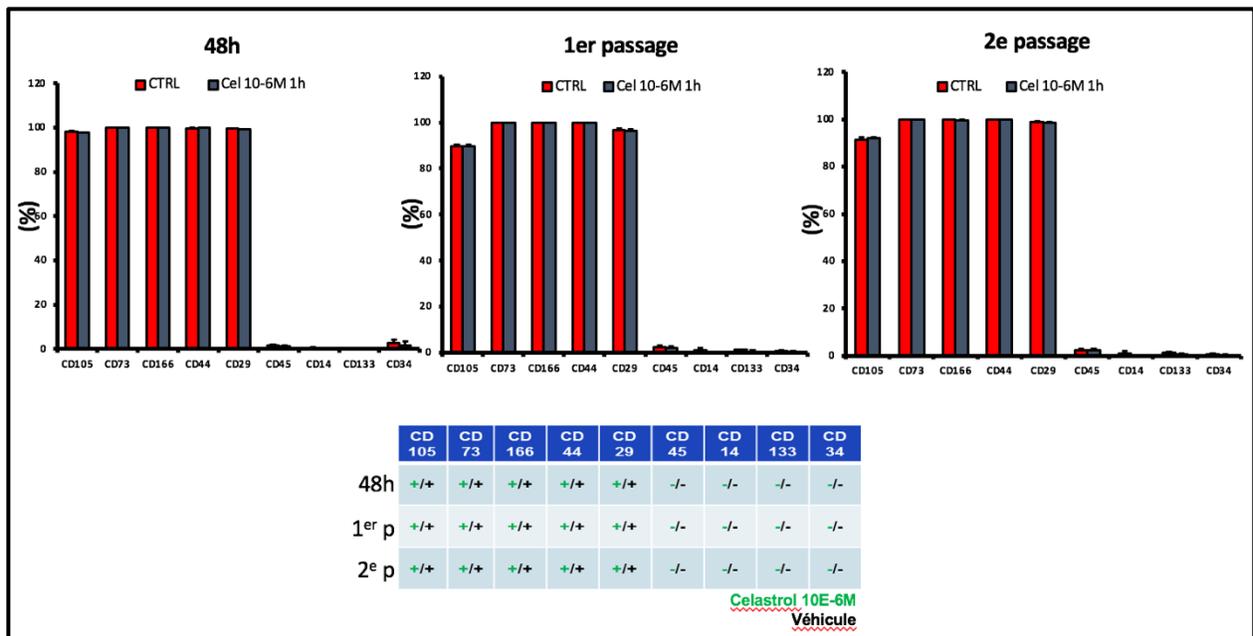


Figure 7 : L'expression de marqueurs de surface de CSMh demeure inchangée malgré un traitement au Célastrol.

Le Célastrol potentialise l'expression de gènes associés à l'angiogenèse et à la fonction endothéliale par des CSMh en condition d'hypoxie

Nous avons ensuite testé les CSMh dans des conditions pouvant s'apparenter à celui des cellules CD133+ chez le patient. Pour commencer, une courbe de dose réponse de Célastrol a été effectuée afin de déterminer la concentration avec la meilleure réponse cellulaire en normoxie. Les CSMh traitées au Célastrol à une concentration de 10^{-6} M démontraient une expression génique plus prononcée; surtout en lien avec la viabilité (Bax, Bcl-2) et la réponse au choc thermique (HMOX1, HSP60, HSP70 et HSP90a) (**Figure 8A**). Des CSMh ont ensuite été traitées à la dose optimale de Célastrol de 10^{-6} M dans des conditions de normoxie et d'hypoxie (24h) (**8B**). Le traitement au Célastrol sur ces CSMh ne semble pas mener, à lui seul, un changement dans l'expression génique plus marqué lorsque comparé aux cellules non stimulées (normalisation à 1). Par ailleurs, le Célastrol semble potentialiser, en condition d'hypoxie, l'expression de gènes en ce qui a trait à des fonctions d'angiogenèse et de fonction endothéliale.

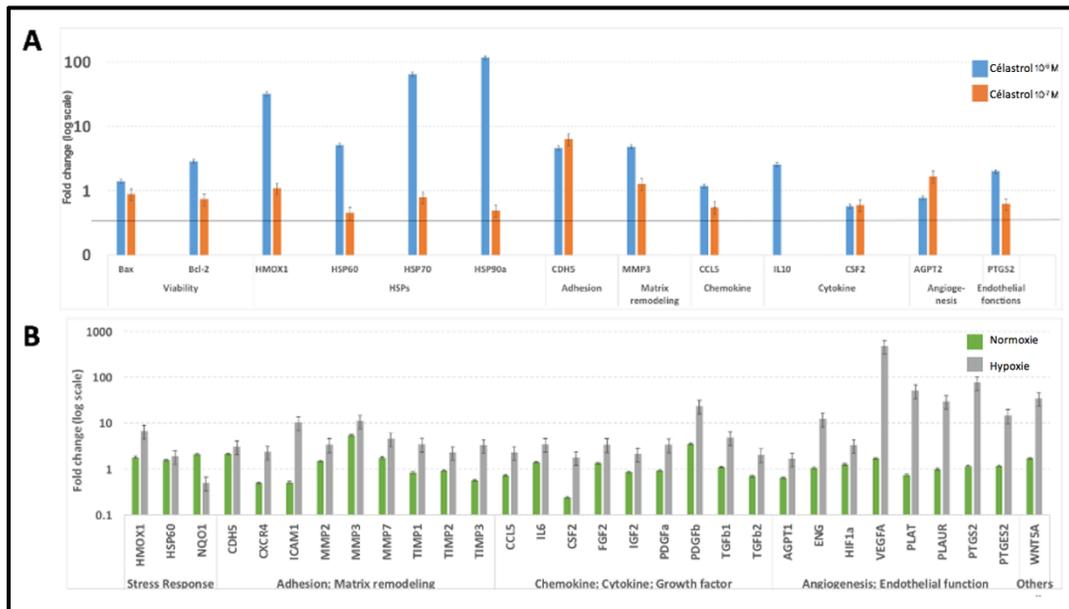


Figure 8 : **A.** Expression génique telle que déterminée par TaqMan de CSMh traitées au Célastrol 10^{-6} M et 10^{-7} M pendant 1h et suivant 24 heures de récupération. Les cellules traitées au Célastrol à une concentration de 10^{-6} M démontrent, de façon globale, une plus forte expression génique. **B.** Expression génique telle que déterminée par TaqMan de CSMh traitées au Célastrol 10^{-6} M dans des conditions de normoxie et d'hypoxie. Le traitement au Célastrol semble potentialiser la réponse des cellules CSMh dans des conditions d'hypoxie en ce qui trait à l'expression de gènes associés à la réponse de stress, l'adhésion et l'angiogenèse.

Les CSMh conditionnées au Célastrol ou à un analogue du Célastrol semblent avoir un effet bénéfique sur la guérison de plaie de HUVECs en co-culture

Une des principales hypothèses du mécanisme de la thérapie cellulaire est que les cellules souches agissent non pas par un effet cellulaire direct, mais plutôt par leurs sécrétions paracrines qui induisent des réponses fonctionnelles des cellules du microenvironnement [203]. Comme nous l'avons démontré, les CSMh stimulées au Célastrol ont une sécrétion augmentée de protéines et d'exosomes dans des conditions *in vitro*.

Afin de vérifier si une interaction entre des CSMh prétraitées au Célastrol (ou à un analogue du Célastrol) à différentes concentrations pouvait avoir un impact fonctionnel dans un modèle expérimental d'interaction paracrine et de guérison de plaie, elles ont été mises en coculture IBIDI avec des cellules endothéliales HUVECs. La guérison de plaie de HUVECs semble initialement accélérée en présence de CSMh prétraitées au Célastrol. Cet effet apparaît plus prononcé à une concentration de 10^{-6} M lorsque comparé aux groupes de Véhicule et Célastrol 10^{-7} M (**Figure 9A**). À 24 heures, le pourcentage de fermeture de lésion est en effet 25% plus élevé que chez ces groupes contrôles (n=8), mais diffère très modestement des cellules prétraitées à l'EBM. La guérison de plaie de HUVECs en présence de CSMh prétraitées à des analogues du Célastrol et en présence d'adjuvant semble donc nettement plus rapide et significative (**9B**). L'analogue du Célastrol, en combinaison avec un adjuvant, semble donc promouvoir la guérison de plaie par un mécanisme paracrin.

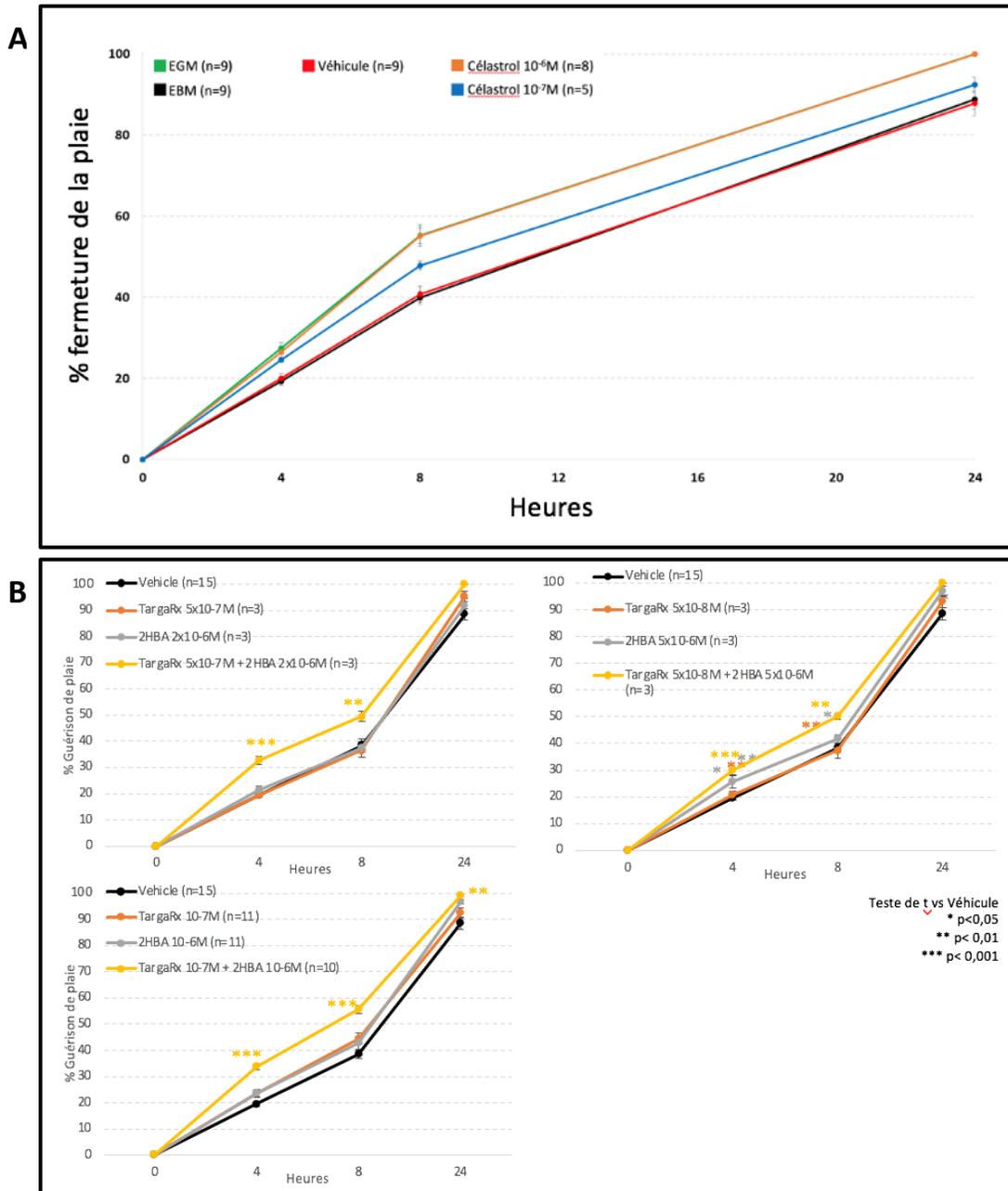


Figure 9 : A. Pourcentage de fermeture de plaie de HUVECs et en coculture IBIDI avec des cellules CSMh conditionnées pendant 1 heure avec du Célastrol 10^{-6,-7} M ainsi que des solutions contrôles. À 24 heures, la fermeture de plaie de HUVECs en co-culture avec des CSMh pré-traitées au Célastrol 10⁻⁶ est complète mais ne semble pas différer de façon significative des groupes contrôles. **B.** La guérison de plaie de HUVECs en coculture avec des cellules CSMh conditionnées avec un analogue du Célastrol est plus rapide et plus significative. Cependant, cette amélioration fonctionnelle nécessite la présence conjointe d'un adjuvant.

Protection de la viabilité chez les CSMh et CD133+ conditionnées 1h et congelées

dans un milieu pauvre en DMSO

Les CSMh traitées à une combinaison d'analogue du Célastrol (TargaRx-7) et d'adjuvant 2HBA-6 et congelées dans des conditions sous-optimales (DMSO2%) étaient, de façon significative, plus viables, tel qu'évalué par bleu de Trypan, au moment de leur décongélation (**Figure 10A**, n=3). Ce bénéfice semblait aussi s'être maintenu dans le temps, mais de façon moins significative. Cela suggère que les cellules semblent pouvoir mieux se protéger vis-à-vis des stress, telles la congélation et la décongélation. De plus, le traitement au TargaRx-7 + adjuvant pourrait être utilisé afin de maximiser la viabilité des cellules souches dans de futures études expérimentales et/ou cliniques. Chez les CD133+, un traitement au TargaRx-6 avec ou sans adjuvant semblait aussi conférer un avantage de survie aux cellules suivant la décongélation (**10B**, n=1).

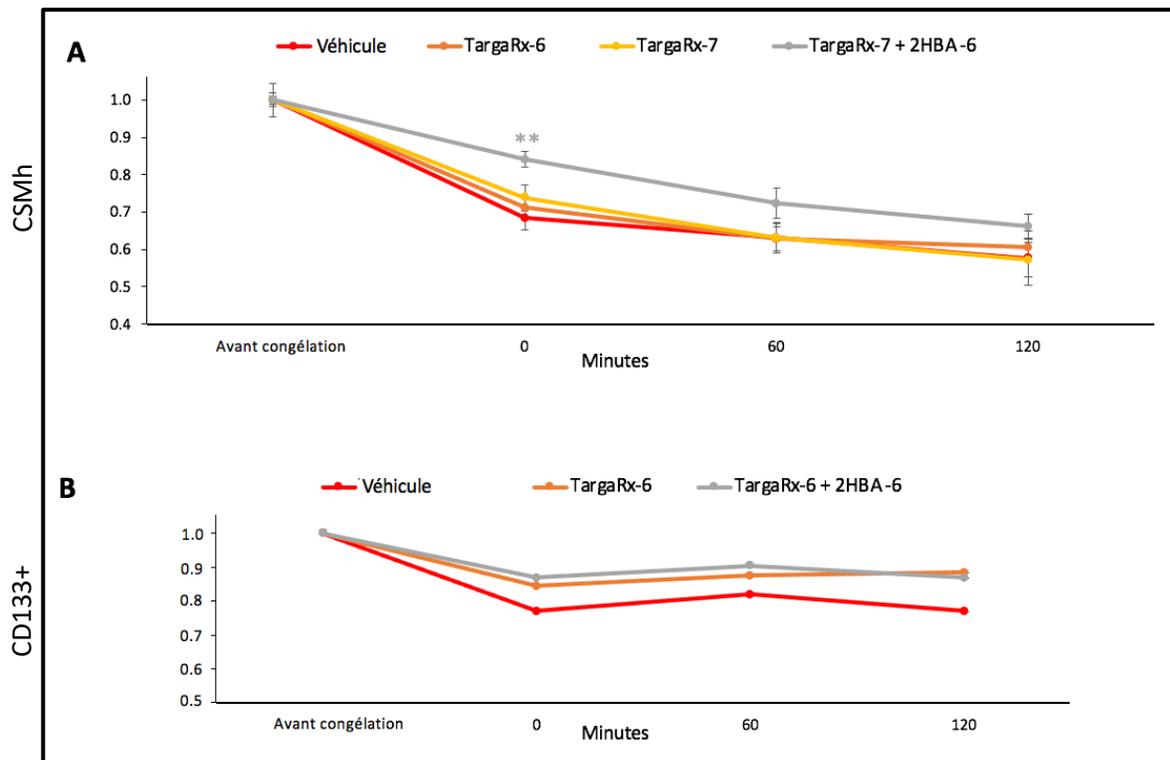


Figure 10 : A. Des CSMh conditionnées avec des analogues du Célastrol +/- adjuvant ont été congelées dans des conditions sous-optimales (DMSO 2%). Les cellules traitées au TargaRx-7 avec adjuvant ont une survie accrue au moment de la décongélation en comparaison (n=3). Cette tendance semble être maintenue dans le temps. **B.** L'expérience a été répétée avec des CD133+ (n=1); il semblerait que la même tendance soit retrouvée (non-significatif).

Protection contre la sénescence oxydative chez les CSMh conditionnées à l'analogue du Célastrol

Les CSMh conditionnées à un analogue du Célastrol semblent être protégées de la sénescence oxydative à des basses et moyennes doses d'H₂O₂ (**Figure 11**, n=3). En effet, le b-gal (marqueur de cellules sénescentes) normalisé au PrestoBlue (viabilité), démontre qu'un traitement à un analogue du Célastrol semble diminuer la proportion de cellules sénescente en comparaison avec les cellules non-traitées et le véhicule. Bien qu'un traitement au 937-6 dans des conditions d'H₂O₂ de 0.025 mM semble avoir l'effet contraire, la valeur aussi augmentée du véhicule dans ces conditions semble donc indiquer une valeur aberrante.

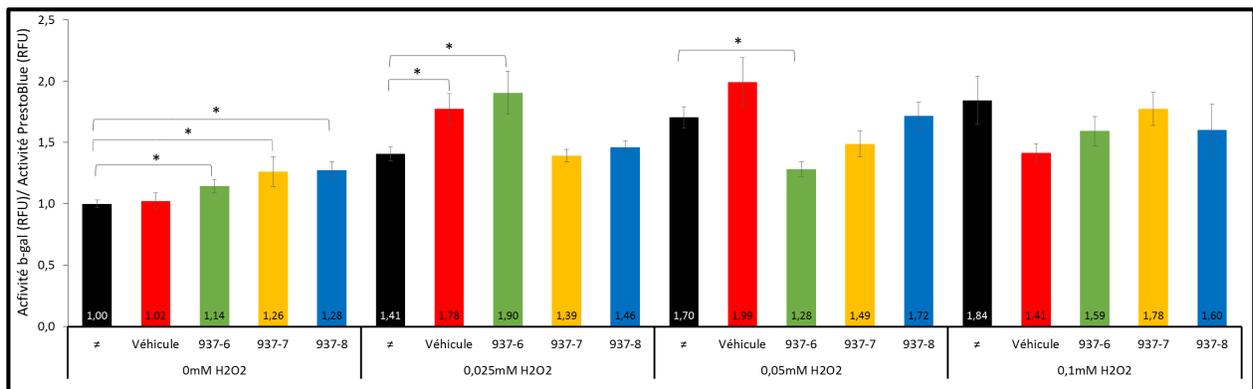


Figure 11 : Le conditionnement des CSMh à un analogue du Célastrol semble conférer une protection contre la sénescence oxydative (n = 3). Cette protection semble plus marquée au traitement 937-6 (* p = < 0.05).

Chapitre 5 – Discussion

Récapitulatif

Les cellules souches CD133+ des patients de COMPARE-AMI prises dans leur ensemble et comparées à celles des patients d'IMPACT-CABG présentent des différences marquées d'expression. De plus, les cellules souches CD133+ des patients répondeurs ont des signatures transcriptomiques qui diffèrent de façon significative de celle des patients non-répondeurs. En effet, les cellules de patients répondeurs de COMPARE-AMI expriment de façon significative des gènes liés à la progression du cycle cellulaire, à la régulation d'expression génique, aux processus métaboliques et à la sécrétion des vésicules extracellulaires en comparaison avec les cellules des non-répondeurs. Les cellules de patients répondeurs d'IMPACT-CABG, elles, expriment de façon significative des gènes liés au processus d'angiogenèse, aux cascades de signalisation MAP kinases, à la régulation de la réponse au stress, à la régulation des processus d'apoptose, à la production de cytokines, à la chimiotaxie, à la régulation positive de la migration cellulaire et à l'adhésion cellulaire.

Une stimulation de CSMh au Célastrol engendre une activation des voies des kinases de type 'RISK' ainsi que l'expression de HO-1 et d'HSP-70. Ces cellules conditionnées et activées sécrètent davantage de protéines et d'exosomes dans leur milieu. Le traitement au Célastrol ne modifie pas l'expression cellulaire de marqueurs de surface; le type cellulaire semble donc être conservé. De plus, le traitement au Célastrol semble potentialiser la réponse des cellules CSMh dans des conditions d'hypoxie en augmentant l'expression de gènes associés à la réponse de stress, à l'adhésion et à l'angiogenèse. Les CSMh conditionnées au Célastrol en co-culture ne semblent pas avoir un effet fonctionnel bénéfique sur la guérison de plaie *in vitro* de HUVECs mais de différentes concentrations d'un analogue du Célastrol, le TargaRx, lui, semble conférer cet avantage seul et en la présence d'adjuvant. Les CSMh et CD133+ conditionnées avant une congélation ont une meilleure survie au moment de la décongélation. Un inhibiteur du HSP90 semble protéger contre la sénescence oxydative des cellules souches.

Influences des facteurs démographiques

À première vue, il n'est pas surprenant que les cellules souches CD133+ des patients aient des profils d'expression géniques différents d'une étude à l'autre. La **table 1** démontre des différences démographiques importantes entre les groupes. Les patients d'IMPACT-CABG sont davantage atteints d'hypertension artérielle, de dyslipidémie et de diabète (composantes du syndrome métabolique - SM). Ces pathologies sont associées à de nombreux changements micro et macro-vasculaires liés à des mécanismes moléculaires impliquant une dysfonction endothéliale, du stress oxydatif, de l'inflammation et de la fibrose vasculaire [239, 240].

Ces mécanismes peuvent mener à une altération du microenvironnement de la moelle osseuse, entraîner des modifications à la niche des BMDSCs et avoir d'importants impacts fonctionnels sur ces dernières [241]. Le profil d'expression de cellules endothéliales de la MO montre une modulation différentielle de gènes en lien avec l'assemblage et l'organisation cellulaire, l'inflammation et la mort cellulaire [242]. Il a été démontré que les cellules endothéliales progénitrices de patients diabétiques avaient des fonctions de néovascularisation déficientes incluant la prolifération, l'adhésion et la formation de tubule [243]. De plus, le sérum des patients diabétiques semble diminuer les effets pro-angiogéniques de CSMs tout en augmentant la mort cellulaire apoptotique [244]. Des phénotypes cellulaires dysfonctionnels importants impliquant une altération de la sécrétion pro-inflammatoire, une augmentation des marqueurs de stress oxydatifs et une perturbation du potentiel à se proliférer et à se différencier ont été démontrés chez les patients souffrant de diabète et de syndrome métabolique [245]. Il n'est donc pas surprenant que les cellules prélevées chez ces patients aient des phénotypes en lien avec le microenvironnement de leur MO; ce qui explique aussi pourquoi les cellules des patients de COMPARE-AMI (moins de SM) ont un profil différent de celles d'IMPACT-CABG (plus de SM). Le phénotype de ces cellules, qui sont ensuite utilisées en thérapie via injection intracoronarienne ou intramyocardique, reflète donc l'influence du microenvironnement de la MO. À noter aussi que l'âge des patients affecte l'immunosénescence et constituerait un facteur important dans la détermination du phénotype cellulaire autologue en thérapie cellulaire [246].

En soi, la thérapie cellulaire pourrait aussi être moins efficace chez ces patients pour plusieurs raisons. Un mécanisme évoqué pourrait être en lien avec la diminution des nerfs terminaux chez les diabétiques menant à une altération de la mobilisation des CSHs qui sont habituellement sécrétés de façon circadienne par des fluctuations noradrénergiques dans la MO, lesquelles pourraient être impliquées dans les processus de régénération et d'anti-inflammation [247-249]. En effet, une méta-analyse évaluant les impacts démographiques de patients ayant reçu du G-CSF dans des essais cliniques en maladie cardiovasculaire pour augmenter le rendement cellulaire a démontré que la prévalence de diabète est un déterminant négatif majeur sur la mobilisation de cellules CD34+ [250]. En lien avec d'autres études qui font preuve de moins bons résultats cliniques chez des patients souffrants d'IM et de diabète en comparaison avec des patients sans facteur de comorbidité, ce qui impliquerait des mécanismes de diminution de mobilisation de cellules endothéliales progénitrices de la MO et une altération phénotypique de ces cellules [251]. En effet, les diabétiques ont un potentiel affaibli de développer des vaisseaux collatéraux [252]. De plus, bien que tous les patients de l'étude souffrent de MCAS, le degré de sévérité de la maladie varie d'un modèle à l'autre, mais aussi de patient en patient, ce qui pourrait expliquer en partie pourquoi certains patients ont semblé mieux répondre à la thérapie que d'autres.

La combinaison de ces facteurs démographiques suggère la raison pour laquelle il n'est pas étonnant que les cellules CD133+ de la MO de COMPARE-AMI et d'IMPACT-CABG sont différentes, mais elle illustre aussi comment certains mécanismes démontrés dans la littérature expliqueraient de quelle façon cette différence démographique pourrait affecter la fonction de ces cellules, lorsqu'utilisées en thérapie cellulaire.

Les différences entre les répondants et non-répondants

Malgré un mécanisme semblable, l'évolution et la manifestation de la maladie diffèrent : l'infarctus transmural aigu (COMPARE-AMI) est différent de la cardiopathie ischémique chronique (IMPACT-CABG). Les phénotypes cellulaires des patients diffèrent dans ces deux études. Ceci pourrait s'expliquer en partie par le degré d'inflammation basal, mais aussi par

l'inflammation systémique déclenchée par une rupture de plaque aiguë, activant la réponse immunitaire, mobilisant les cellules effectrices, influençant le recrutement et le phénotype cellulaire de la moelle [253]. Bien qu'une réponse inflammatoire à bas bruit existe aussi en MCAS, l'intensité de cette dernière est beaucoup moins marquée tout en étant en partie enrayée par les effets de cellules dendritiques et de lymphocytes T régulateurs [254]. L'effet inflammatoire induit d'un IM persiste suivant l'événement aigu et la nature de ce dernier, ce qui pourrait donc aussi influencer la réponse engendrée par une thérapie cellulaire [255]. De plus, 50% des patients de COMPARE-AMI présentaient des infarctus à onde Q. La nécrose myocardique associée à un infarctus transmural et son milieu inflammatoire (pH acide, hypoxique, absence de facteurs trophiques) pourrait enclencher des mécanismes de mort cellulaire dans les cellules souches transplantées, et ce, même si cliniquement ces patients ne démontraient pas de signes évidents de défaillance aiguë (Killip 1) [256]. Pour ces raisons et à cause de contrastes démographiques établis entre les patients, les cellules des patients des études ont été analysées séparément.

Les patients ont été classés en groupes de répondants et non-répondants sur la base d'une amélioration de leur FEVG de $\geq 3\%$. La valeur de la FEVG en infarctus aigu et cardiomyopathie ischémique est différente : l'infarctus aigu ayant généralement un meilleur pronostic de récupération fonctionnelle lorsqu'une reperfusion précoce est atteinte, due à une plus grande proportion de myocarde sidéré vs de myocarde en hibernation en comparaison avec la CI chronique. Cette notion pourrait potentiellement limiter la comparaison entre les études, mais ne devrait pas compromettre les comparaisons entre les groupes [55].

Il est à noter que la réponse clinique favorable des groupes de patients répondants n'est certes pas uniquement due à la thérapie cellulaire, elle dépend de plusieurs facteurs dont l'impact individuel et combinatoire est difficile à jauger. Ces facteurs incluent : la rapidité et le succès de la stratégie de reperfusion, l'anatomie de la lésion coupable (COMPARE-AMI) et le(s) territoire(s) atteints par le(s) événement(s) ischémique(s) aigu(s) et chronique(s), le degré de revascularisation (IMPACT-CABG - 10% incomplète), mais aussi la technique chirurgicale/les effets inflammatoires de la chirurgie ainsi que ceux en lien avec la circulation extracorporelle/la stratégie de cardioprotection, l'évolution intrahospitalière post-intervention des patients des deux groupes incluant le séjour aux soins intensifs/l'usage de médication vasoactive, l'évolution

à plus long terme jusqu'au suivi, à la guérison de plaie, à la résolution de l'inflammation et à la compliance des patients à une thérapie pharmacologique optimale. Ayant été davantage étudiés dans la littérature, certains de ces effets, impliquent la chronologie d'injection des CD133+ (plage de ≤ 72 heures pour COMPARE-AMI), le mécanisme d'injection (intra-coronarien COMPARE, intra-myocardique IMPACT) et la quantité de cellules injectées constituent également des facteurs importants menant à des taux variables de rétention et ayant un potentiel de répercussions sur les effets de la thérapie cellulaire.

Le secret se trouve dans les patrons d'expression

Mis à part le degré de réponse clinique, l'association et l'expression génique par les cellules souches des patients répondants comparativement aux non-répondants sont trop importantes pour n'être expliquées que par chance. Dans l'étude COMPARE-AMI, les cellules CD133+ des patients répondants exhibent des phénotypes en lien avec la progression du cycle cellulaire, la régulation d'expression génique, les processus métaboliques et la sécrétion des vésicules extracellulaires, en comparaison avec les cellules des non-répondants. Alors que dans l'étude IMPACT-CABG, les cellules CD133+ des patients répondants exhibent des phénotypes en lien avec l'angiogenèse aux cascades des MAP kinases, la régulation de la réponse au stress, la régulation des processus d'apoptose, la production de cytokines, la chimiotaxie, la régulation positive de la migration cellulaire et l'adhésion cellulaire.

Étonnamment, les effets cellulaires marqués des cellules de patients répondants semblent venir contrecarrer les mécanismes pathologiques fondamentaux. Comme démontré, en infarctus aigu, une rupture de plaque entraîne une thrombo-occlusion coronarienne, l'ischémie résultante menant à la nécrose tissulaire en aval. Une fois le flux sanguin restauré (via ICP ou autre) les processus de mort et d'apoptose cellulaires doivent être abrogés et les effets néfastes de la reperfusion limités. En approfondissant les catégories de Gene Ontology identifiées dans les cellules de répondants, il est possible d'étayer encore plus leur potentiel mécanisme fonctionnel [257, 258]. Ces cellules expriment donc des gènes spécifiquement associés à la progression des phases biochimiques/morphologiques de la réplication et de la

ségrégation de matériel génétique en vue de la division cellulaire. De plus, elles démontrent un phénotype de modulation active des processus impliqués dans l'expression génique, incluant la transcription, la translation et la maturation de séquences codantes ainsi qu'une implication dans des processus métaboliques macromoléculaires, dont la réparation et la réplication de l'ADN et la synthèse et dégradation de protéines. Cela suggère que ces cellules seraient métaboliquement actives et auraient des phénotypes laissant présager un rôle dans la progression du cycle cellulaire, dans la synthèse et la maturation de protéines (possiblement impliquées dans des fonctions auto/paracrines) ainsi que dans la réparation et la réplication de l'ADN, lesquels sont des mécanismes potentiellement clés dans la réponse au processus de stress cellulaire, à l'inflammation et à la mort cellulaire engendrés par un infarctus du myocarde aigu, ce qui pourrait aussi affecter les effets d'ischémie-reperfusion entraînés par un rétablissement du flux par ICP.

Le phénotype des cellules CD133+ des patients répondants d'IMPACT-CABG est d'autant plus surprenant qu'il semble exhiber un phénotype qui mime les effets initiaux d'une réponse cellulaire immunitaire (chimiotaxisme, régulation de la migration, adhésion cellulaire, activation de voies de signalisation). Ce recrutement cellulaire pourrait être lié à un recrutement de cellules tels les cellules endothéliales progénitrices et/ou d'autres leucocytes impliqués dans la réponse inflammatoire. Il est important de rappeler que bien que les patients d'IMPACT-CABG soient atteints de cardiopathie ischémique chronique, la chirurgie de revascularisation engendre un stress inflammatoire majeur. Le potentiel recrutement cellulaire par les cellules souches de répondants pourrait donc aussi présenter des effets bénéfiques en rapport avec la guérison post-chirurgie. De plus, ces mécanismes, lorsque dysfonctionnels, ont été perçus comme éléments déclencheurs de l'AS et du développement de la MCAS. Le phénotype des cellules souches pourrait donc potentiellement favoriser une réponse plus physiologique et moins dysfonctionnelle ce qui pourrait expliquer les possibles bénéfices fonctionnels.

Les cellules CD133+ des patients répondants d'IMPACT-CABG semblent aussi favoriser l'angiogenèse et, plus spécifiquement, la prolifération de vaisseaux sanguins existants et l'émergence de nouveaux vaisseaux via cette prolifération. Il est cependant concevable que l'amélioration fonctionnelle de la FEVG existe via cette angiogenèse et le développement d'un

réseau vasculaire plus robuste. D'autres mécanismes potentiels identifiés incluant la régulation des processus d'apoptose, pourraient s'appliquer à la survie de cardiomyocytes en hibernation dans les zones périphériques aux régions en ischémie relative. Finalement, les cellules démontrent aussi un phénotype de modulation de la fréquence, de la rapidité et de l'étendue d'une réponse cellulaire au stress ainsi qu'à des mécanismes liés à la production cytokinique. Tous deux pourraient s'avérer essentiels pour contrecarrer certains des effets pathophysiologiques délétères de la CI.

Les nouveaux apports de cette étude

Plusieurs études cliniques de thérapie cellulaire CD133+ dans des modèles de CI ont été réalisées se sont démontrées sécuritaires, les bénéfices fonctionnels de la thérapie demeurant toutefois mitigés. Ce projet exploratoire semble être le premier à évaluer le transcriptome de ces cellules tenter d'identifier des traits qui pourraient expliquer des effets cliniques démontrant une série de phénotypes cellulaires des cellules souches. Bien que spéculatifs, ces phénotypes pourraient en partie expliquer l'efficacité de la thérapie. *Steinhoff et coll.* en tête de l'étude phase 3 PERFECT (modèle s'apparentant à IMPACT-CABG) ont initialement démontré, via des analyses post hoc, l'importance régulatrice centrale des cellules endothéliales progénitrices CD133+, CD34+ favorisant l'angiogénèse, ils sont également arrivés à la conclusion qu'il semblait possible de cibler des patients pouvant mieux répondre à la thérapie via l'apprentissage automatique et l'utilisation de marqueurs sériques (incluant : proBNP, VEGF, erythropoïétine, vitronectine, les proportions de cellules endothéliales/thrombocytes circulants, entre autres) [192]. De plus, une évaluation récente du transcriptome du sang total des patients d'un sous-groupe de leur étude semble identifier des signatures spécifiques pouvant permettre l'identification de patients ayant un meilleur potentiel de réponse [259]. Une autre étude comparant le transcriptome de cellules CD133+ dans le sang périphérique de patients sains (4) et souffrants de MCAS (angine stable - 10) de base et suivant 3 mois d'exercices a aussi établi une série de gènes différenciellement exprimés entre ces groupes bien que l'implication de cette expression ne soit pas déterminée [260].

L'optimisation pharmacologique de CSMh

Dans l'éventuel but de mener à terme des études cliniques et de maximiser les effets cellulaires de la thérapie aux cellules CD133+, nous avons débuté des études de pharmacooptimisation. Puisque les CD133+ sont présentes en très petites quantités dans la MO et que leur isolement est laborieux, coûteux, invasif et comporte des questions éthiques, des CSMh ont plutôt été utilisées. Ces cellules, bien connues, accessibles commercialement, sont faciles d'utilisation en expérimentation *in vitro*. Cette lignée cellulaire a été choisie pour ses similarités avec les cellules CD133+, tel que discuté antérieurement.

Une stimulation de CSMh au Célastrol semble en effet activer des voies de signalisation de type 'RISK' : ERK (MAPK) et AKT (PI3K). Ces voies de signalisation sont largement établies dans des réponses cellulaires à la prolifération, à la migration, à la croissance cellulaire ainsi qu'au métabolisme dans des processus normaux, mais aussi pathologiques [261, 262]. De plus, une telle stimulation mène aussi à la synthèse d'HSP70 et d'HO-1 – des protéines importantes impliquées dans des fonctions de cardioprotection.

La sécrétion paracrine (reflétant le mécanisme d'action paracrin des CS) a également été évaluée dans des CSMh. En effet, le conditionnement au Célastrol augmente la sécrétion de protéines en lien avec les cytokines et les facteurs de croissance, celles associées à la réponse au choc thermique et ainsi qu'à des mécanismes d'antioxydation. De plus, une sécrétion accrue des exosomes chez des CSMh a aussi été démontrée (analogue +/- adjuvant). De plus, cette activation et sécrétion n'est pas due à un changement de type cellulaire comme démontré par l'absence de changement de marqueurs de surface suite au conditionnement et après deux passages cellulaires.

Par ailleurs, les CSMh ainsi stimulées au Célastrol démontrent par ailleurs une expression *in vitro* accrue de gènes associés à la réponse de stress, à l'adhésion et à l'angiogenèse. Cette réponse semble potentialisée par des conditions simulées d'hypoxie pouvant s'apparenter à ce qui pourrait être retrouvé dans un myocarde ischémique. Cela dit, la 'normoxie' en laboratoire à 21% est un milieu déjà hyperoxyc en comparaison avec la tension en oxygène *in vivo* (surtout dans la microcirculation), mais cela n'empêche pas qu'un traitement au Célastrol semble

potentialiser la réponse; certaines futures expériences pourraient donc être faites en milieu hypoxique pour essayer de mieux refléter l'environnement tissulaire bien qu'une reproduction exacte demeure impossible. Vu ces résultats encourageants et la vaste littérature décrivant les effets paracrins des cellules souches, nous avons tenté de démontrer un bénéfice fonctionnel d'un traitement au Célastrol sur des CSMh mis en co-culture avec des HUVECs lésés. Un pré-conditionnement à un analogue du Célastrol semble en effet conférer un avantage à la guérison de plaie dans ce modèle (+/- avec adjuvant). Cela dit, les HUVECs ne reflètent pas nécessairement les cellules endothéliales d'artères, artérioles ou capillaires présentes au niveau cardiaque et ne sont pas soumises aux forces hémodynamiques et de cisaillement en culture de laboratoire. De plus, les conditions *in vitro* font en sorte que les autres composantes du myocarde (MEC, CMs, péricytes, fibroblastes, cellules musculaires lisses) n'étant pas représentées, les nombreuses interactions complexes qui existent entre les cellules endothéliales et leur environnement *in vivo* ne peuvent être reproduites. De même, Les HUVECs en laboratoire sont souvent à leur état prolifératif plutôt qu'à leur état essentiellement quiescent dans un cœur normal (un état d'autant plus incertain

Enfin, nous avons déterminé si un traitement à un analogue du Célastrol +/- adjuvant pouvait assurer une meilleure survie cellulaire après décongélation. Ce résultat, retrouvé chez les CSMh de façon significative (et via une tendance dans des CD133+) pourrait nous permettre d'améliorer la survie cellulaire en thérapie cellulaire lorsqu'une congélation est nécessaire. De plus, cela suggère que les cellules traitées semblent mieux préparées à affronter un stress cellulaire. Nous avons aussi démontré que les CSMh conditionnées à l'analogue du Célastrol semblaient être protégées de la sénescence oxydative. Encore une fois, ces résultats pourraient être bénéfiques lorsque couplés aux autres avantages du conditionnement pharmacologique.

Tout compte fait, ces résultats encourageants viennent corroborer des découvertes ultérieures semblables retrouvées dans la littérature qui indiquent que la pharmaco-optimisation des cellules souches est une avenue viable et prometteuse.

Le futur de la thérapie cellulaire

Nos découvertes, ainsi que les avancées récentes dans la littérature, suggèrent donc que le futur de la thérapie cellulaire somatique autologue nécessite : 1) un meilleur ciblage des patients qui auraient un potentiel de réponse accrue, 2) une optimisation de l'environnement de la MO et de la niche des CS qu'elle contient afin de maintenir et promouvoir de phénotypes cellulaires favorables, 3) des stratégies d'expansion du contenu cellulaire lors de la greffe pour obtenir des quantités cellulaires optimales, 4) une optimisation du phénotype *ex vivo* des cellules afin d'élucider des phénotypes qui pourraient favoriser certains mécanismes bénéfiques, 5) des techniques d'implantation assurant une meilleure rétention cellulaire, 6) une combinaison de lignées cellulaires ayant des effets bénéfiques et complémentaires. Ce qui permettrait possiblement de surmonter certains des obstacles qui limitent actuellement les effets bénéfiques et fonctionnels de la thérapie cellulaire.

Chapitre 6 – Conclusion

En conclusion, la cardiomyopathie ischémique, deuxième source de mortalité annuelle au Canada, est composée d'un large éventail de maladies complexes associées à une dysfonction endothéliale du système cardiovasculaire et au développement de maladie coronarienne athérosclérotique. Les répercussions de l'ischémie myocardique sont généralement d'évolution chronique mais, certaines fois, des manifestations aiguës de la maladie peuvent se déclarer. Malgré les stratégies interventionnelles de reperfusion précoce et de traitements pharmacologiques optimaux, des remaniements pathophysiologiques peuvent mener au développement de l'insuffisance cardiaque avec des répercussions fonctionnelles. Malgré les avenues prometteuses de la thérapie cellulaire en cardiopathie ischémique, les résultats cliniques demeurent mitigés. Cette étude exploratoire est la première du genre à évaluer le transcriptome de cellules souches CD133+ utilisées en thérapie cellulaire dans un modèle d'infarctus du myocarde aigu et de cardiomyopathie ischémique chronique, afin de déterminer si des différences phénotypiques existent entre les cellules de patients classés répondeurs et non-répondeurs sur la base d'une amélioration fonctionnelle. En effet, les cellules de répondeurs semblent exprimer des patrons conservés entre elles et uniques d'un modèle à l'autre. Les cellules de répondeurs de COMPARE-AMI expriment des gènes liés à la progression du cycle cellulaire, à la régulation d'expression génique, aux processus métaboliques et à la sécrétion via des vésicules extracellulaires. Quant aux non-répondeurs d'IMPACT-CABG, elles expriment des gènes liés, entre autres, à l'angiogenèse, à la régulation de la réponse au stress, à la régulation des processus d'apoptose, à la production de cytokines, à la régulation positive de la migration cellulaire et à l'adhésion cellulaire. Ces découvertes laissent présager qu'il existe un phénotype cellulaire idéal, adapté au contexte et à la manifestation clinique du patient. Ayant pu répliquer plusieurs de ces phénotypes *in vitro* sur des CSMh à l'aide d'inhibiteur du HSP90 et en étayant davantage les mécanismes bio-cellulaires qui pourraient être responsables de ces phénotypes, nous envisageons désormais des stratégies plus poussées de pharmaco-optimisation et de préconditionnement cellulaire *ex vivo* avant implantation, ce qui permettrait de maximiser les bénéfices de la thérapie cellulaire en maladie cardiovasculaire. Combinées à des avancées dans le domaine comme, par exemple, une sélection de patients 'répondeur' par apprentissage

automatique, de meilleures stratégies d'expansion cellulaires et de nouvelles techniques d'implantation optimales, cela pourrait assurer l'efficacité de la thérapie régénératrice.

Références

1. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. Nature, 1997. **386**(6626): p. 671-674.
2. Bettex, D.A., R. Prêtre, and P.-G. Chassot, *Is our heart a well-designed pump? The heart along animal evolution*. European Heart Journal, 2014. **35**(34): p. 2322-2332.
3. García-García, A., C.L.F. de Castillejo, and S. Méndez-Ferrer, *BMSCs and hematopoiesis*. Immunology Letters, 2015. **168**(2): p. 129-135.
4. Yang, X., et al., *The mechanisms of pathological extramedullary hematopoiesis in diseases*. Cell Mol Life Sci, 2020. **77**(14): p. 2723-2738.
5. Seita, J. and I.L. Weissman, *Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2010. **2**(6): p. 640-53.
6. Egginton, S. and E. Gaffney, *Experimental Physiology –Review Article: Tissue capillary supply – it's quality not quantity that counts!* Experimental Physiology, 2010. **95**(10): p. 971-979.
7. Mazurek, R., et al., *Vascular Cells in Blood Vessel Wall Development and Disease*. Advances in pharmacology (San Diego, Calif.), 2017. **78**: p. 323-350.
8. Wagner, D.D. and P.S. Frenette, *The vessel wall and its interactions*. Blood, 2008. **111**(11): p. 5271-5281.
9. Kassab, G.S., *Biomechanics of the cardiovascular system: the aorta as an illustratory example*. Journal of the Royal Society, Interface, 2006. **3**(11): p. 719-740.
10. Rajendran, P., et al., *The vascular endothelium and human diseases*. International journal of biological sciences, 2013. **9**(10): p. 1057-1069.
11. Godo, S. and H. Shimokawa, *Endothelial Functions*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2017. **37**(9): p. e108-e114.
12. Abe, J.-i. and B.C. Berk, *Novel Mechanisms of Endothelial Mechanotransduction*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2014. **34**(11): p. 2378-2386.
13. Majesky, M.W., et al., *The adventitia: a progenitor cell niche for the vessel wall*. Cells, tissues, organs, 2012. **195**(1-2): p. 73-81.
14. Boyle, E.C., D.G. Sedding, and A. Haverich, *Targeting vasa vasorum dysfunction to prevent atherosclerosis*. Vascular Pharmacology, 2017. **96-98**: p. 5-10.
15. Sedding, D.G., et al., *Vasa Vasorum Angiogenesis: Key Player in the Initiation and Progression of Atherosclerosis and Potential Target for the Treatment of Cardiovascular Disease*. Frontiers in immunology, 2018. **9**: p. 706-706.
16. Vekilov, D.P. and K.J. Grande-Allen, *Mechanical Properties of Diseased Veins*. Methodist DeBakey cardiovascular journal, 2018. **14**(3): p. 182-187.
17. Binney, N., *The function of the heart is not obvious*. Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences, 2018. **68-69**: p. 56-69.
18. Pfeiffer, E.R., et al., *Biomechanics of cardiac electromechanical coupling and mechanoelectric feedback*. Journal of biomechanical engineering, 2014. **136**(2): p. 021007-021007.
19. Lau, D.H., K.C. Roberts-Thomson, and P. Sanders, *Sinus node revisited*. Current Opinion in Cardiology, 2011. **26**(1): p. 55-59.

20. Spicer, D.E., et al., *The anatomy and development of the cardiac valves*. *Cardiol Young*, 2014. **24**(6): p. 1008-22.
21. Sutton, M.G.S.J. and N. Sharpe, *Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction*. *Circulation*, 2000. **101**(25): p. 2981-2988.
22. Smith, R.M., et al., *Nondestructive optical determination of fiber organization in intact myocardial wall*. *Microscopy research and technique*, 2008. **71**(7): p. 510-516.
23. Pervolaraki, E., et al., *Ventricular myocardium development and the role of connexins in the human fetal heart*. *Scientific Reports*, 2017. **7**(1): p. 12272.
24. Tomanek, R. and P. Angelini, *Embryology of coronary arteries and anatomy/pathophysiology of coronary anomalies. A comprehensive update*. *International Journal of Cardiology*, 2019. **281**: p. 28-34.
25. Heusch, G. and B.J. Gersh, *The pathophysiology of acute myocardial infarction and strategies of protection beyond reperfusion: a continual challenge*. *European Heart Journal*, 2016. **38**(11): p. 774-784.
26. Bergmann, O., et al., *Evidence for cardiomyocyte renewal in humans*. *Science*, 2009. **324**(5923): p. 98-102.
27. Keepers, B., J. Liu, and L. Qian, *What's in a cardiomyocyte – And how do we make one through reprogramming?* *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2020. **1867**(3): p. 118464.
28. Eisner, D.A., et al., *Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart*. *Circulation research*, 2017. **121**(2): p. 181-195.
29. Canada, G.o. *Heart disease in Canada: Highlights from the Canadian Chronic Disease Surveillance System*. 2017 [cited 2020 2/11]; Available from: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/publications/diseases-conditions/heart-disease-canada-fact-sheet.html>.
30. Groenewegen, A., et al., *Epidemiology of heart failure*. *European Journal of Heart Failure*, 2020. **22**(8): p. 1342-1356.
31. Ezekowitz, J.A., et al., *2017 Comprehensive Update of the Canadian Cardiovascular Society Guidelines for the Management of Heart Failure*. *Canadian Journal of Cardiology*, 2017. **33**(11): p. 1342-1433.
32. McKee, P.A., et al., *The natural history of congestive heart failure: the Framingham study*. *New England Journal of Medicine*, 1971. **285**(26): p. 1441-1446.
33. Lee, D.S., et al., *Predicting mortality among patients hospitalized for heart failure: derivation and validation of a clinical model*. *Jama*, 2003. **290**(19): p. 2581-7.
34. Levy, W.C., et al., *The Seattle Heart Failure Model*. *Circulation*, 2006. **113**(11): p. 1424-1433.
35. Association, C.C.o.t.N.Y.H., *Nomenclature and criteria for diagnosis of diseases of the heart and great vessels*. Vol. 253. 1994: Boston: Little, Brown & Co.
36. Nhan, P., et al., *[Cardiovascular imaging in heart failure]*. *Presse Med*, 2019. **48**(12): p. 1406-1415.
37. Ponikowski, P., et al., *2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special*

- contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC.* European Heart Journal, 2016. **37**(27): p. 2129-2200.
38. Oktay, A.A., J.D. Rich, and S.J. Shah, *The emerging epidemic of heart failure with preserved ejection fraction.* Curr Heart Fail Rep, 2013. **10**(4): p. 401-10.
 39. Del Buono, M.G., et al., *Heart failure with preserved ejection fraction diagnosis and treatment: An updated review of the evidence.* Progress in Cardiovascular Diseases, 2020. **63**(5): p. 570-584.
 40. Andersson, C., et al., *Risk factor-based subphenotyping of heart failure in the community.* PLOS ONE, 2019. **14**(10): p. e0222886.
 41. Gimbrone, M.A., Jr. and G. García-Cardeña, *Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis.* Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology, 2013. **22**(1): p. 9-15.
 42. Gimbrone, M.A., Jr. and G. García-Cardeña, *Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis.* Circulation research, 2016. **118**(4): p. 620-636.
 43. Tabas, I., K.J. Williams, and J. Borén, *Subendothelial Lipoprotein Retention as the Initiating Process in Atherosclerosis.* Circulation, 2007. **116**(16): p. 1832-1844.
 44. Hansson, G.K. and A. Hermansson, *The immune system in atherosclerosis.* Nature Immunology, 2011. **12**(3): p. 204-212.
 45. Chistiakov, D.A., et al., *Potential of anti-inflammatory agents for treatment of atherosclerosis.* Experimental and Molecular Pathology, 2018. **104**(2): p. 114-124.
 46. Swirski, F.K., M. Nahrendorf, and P. Libby, *Mechanisms of Myeloid Cell Modulation of Atherosclerosis.* Microbiology Spectrum, 2016. **4**(4).
 47. Pirillo, A., G.D. Norata, and A.L. Catapano, *LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis.* Mediators of inflammation, 2013. **2013**: p. 152786-152786.
 48. Tedgui, A. and Z. Mallat, *Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways.* Physiological Reviews, 2006. **86**(2): p. 515-581.
 49. Zhu, Y., et al., *Research Progress on the Relationship between Atherosclerosis and Inflammation.* Biomolecules, 2018. **8**(3): p. 80.
 50. Lemos, J.A.d., L.K. Newby, and N.L. Mills, *A Proposal for Modest Revision of the Definition of Type 1 and Type 2 Myocardial Infarction.* Circulation, 2019. **140**(22): p. 1773-1775.
 51. Ibanez, B., et al., *2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC).* European Heart Journal, 2017. **39**(2): p. 119-177.
 52. Spodick, D.H., *Q-wave infarction versus S-T infarction: Nonspecificity of electrocardiographic criteria for differentiating transmural and nontransmural lesions.* The American Journal of Cardiology, 1983. **51**(5): p. 913-915.
 53. Killip, T., 3rd and J.T. Kimball, *Treatment of myocardial infarction in a coronary care unit. A two year experience with 250 patients.* Am J Cardiol, 1967. **20**(4): p. 457-64.
 54. Dutta, P., et al., *Myocardial infarction accelerates atherosclerosis.* Nature, 2012. **487**(7407): p. 325-329.
 55. Kloner, R.A., *Stunned and Hibernating Myocardium: Where Are We Nearly 4 Decades Later?* Journal of the American Heart Association, 2020. **9**(3): p. e015502.

56. Kukielka, G.L., et al., *Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in ischemic and reperfused canine myocardium*. J Clin Invest, 1993. **92**(3): p. 1504-16.
57. Gwechenberger, M., et al., *Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions*. Circulation, 1999. **99**(4): p. 546-51.
58. Maroko, P.R., et al., *Coronary artery reperfusion. I. Early effects on local myocardial function and the extent of myocardial necrosis*. J Clin Invest, 1972. **51**(10): p. 2710-6.
59. Ginks, W.R., et al., *Coronary artery reperfusion. II. Reduction of myocardial infarct size at 1 week after the coronary occlusion*. J Clin Invest, 1972. **51**(10): p. 2717-23.
60. Boden, W.E., K. Eagle, and C.B. Granger, *Reperfusion Strategies in Acute ST-Segment Elevation Myocardial Infarction: A Comprehensive Review of Contemporary Management Options*. Journal of the American College of Cardiology, 2007. **50**(10): p. 917-929.
61. Wong, G.C., et al., *2019 Canadian Cardiovascular Society/Canadian Association of Interventional Cardiology Guidelines on the Acute Management of ST-Elevation Myocardial Infarction: Focused Update on Regionalization and Reperfusion*. Canadian Journal of Cardiology, 2019. **35**(2): p. 107-132.
62. Moscarella, E., S. Brugaletta, and M. Sabaté, *Latest STEMI treatment: a focus on current and upcoming devices*. Expert Review of Medical Devices, 2018. **15**(11): p. 807-817.
63. Fröbert, O., et al., *Thrombus Aspiration during ST-Segment Elevation Myocardial Infarction*. New England Journal of Medicine, 2013. **369**(17): p. 1587-1597.
64. Jolly, S.S., et al., *Randomized Trial of Primary PCI with or without Routine Manual Thrombectomy*. New England Journal of Medicine, 2015. **372**(15): p. 1389-1398.
65. Thiele, H. and S. Desch, *CULPRIT-SHOCK (Culprit Lesion Only PCI Versus Multivessel Percutaneous Coronary Intervention in Cardiogenic Shock)*. Circulation, 2018. **137**(13): p. 1314-1316.
66. Melly, L., et al., *Fifty years of coronary artery bypass grafting*. Journal of thoracic disease, 2018. **10**(3): p. 1960-1967.
67. Gaudino, M., et al., *Arterial Grafts for Coronary Bypass*. Circulation, 2019. **140**(15): p. 1273-1284.
68. Shaefi, S., et al., *Off-Pump Versus On-Pump Coronary Artery Bypass Grafting—A Systematic Review and Analysis of Clinical Outcomes*. Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia, 2019. **33**(1): p. 232-244.
69. Lamy, A., et al., *Five-Year Outcomes after Off-Pump or On-Pump Coronary-Artery Bypass Grafting*. New England Journal of Medicine, 2016. **375**(24): p. 2359-2368.
70. Sarkar, M. and V. Prabhu, *Basics of cardiopulmonary bypass*. Indian journal of anaesthesia, 2017. **61**(9): p. 760-767.
71. Serruys, P.W., et al., *Percutaneous Coronary Intervention versus Coronary-Artery Bypass Grafting for Severe Coronary Artery Disease*. New England Journal of Medicine, 2009. **360**(10): p. 961-972.
72. Farkouh, M.E., et al., *Strategies for Multivessel Revascularization in Patients with Diabetes*. New England Journal of Medicine, 2012. **367**(25): p. 2375-2384.
73. Weintraub, W.S., et al., *Comparative Effectiveness of Revascularization Strategies*. New England Journal of Medicine, 2012. **366**(16): p. 1467-1476.
74. Teo, K.K., et al., *Canadian Cardiovascular Society/Canadian Association of Interventional Cardiology/Canadian Society of Cardiac Surgery Position*

- Statement on Revascularization*; *Multivessel Coronary Artery Disease*. Canadian Journal of Cardiology, 2014. **30**(12): p. 1482-1491.
75. Velazquez, E.J., et al., *Coronary-Artery Bypass Surgery in Patients with Left Ventricular Dysfunction*. New England Journal of Medicine, 2011. **364**(17): p. 1607-1616.
 76. Pandey, A., et al., *Dose-Response Relationship Between Physical Activity and Risk of Heart Failure: A Meta-Analysis*. Circulation, 2015. **132**(19): p. 1786-94.
 77. Lam, C.S.P., et al., *Heart failure with preserved ejection fraction: from mechanisms to therapies*. European Heart Journal, 2018. **39**(30): p. 2780-2792.
 78. Lothar, A. and L. Hein, *Pharmacology of heart failure: From basic science to novel therapies*. Pharmacology & Therapeutics, 2016. **166**: p. 136-149.
 79. Granger, C.B., et al., *Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function intolerant to angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Alternative trial*. The Lancet, 2003. **362**(9386): p. 772-776.
 80. McMurray, J.J.V., et al., *Angiotensin–Neprilysin Inhibition versus Enalapril in Heart Failure*. New England Journal of Medicine, 2014. **371**(11): p. 993-1004.
 81. Swedberg, K., et al., *Ivabradine and outcomes in chronic heart failure (SHIFT): a randomised placebo-controlled study*. The Lancet, 2010. **376**(9744): p. 875-885.
 82. Moss, A.J., et al., *Prophylactic Implantation of a Defibrillator in Patients with Myocardial Infarction and Reduced Ejection Fraction*. New England Journal of Medicine, 2002. **346**(12): p. 877-883.
 83. Québec, T. *Statistiques 2019*. 2019; Available from: <https://www.transplantquebec.ca/statistiques-0>.
 84. Der Sarkissian, S., et al., *Heat shock protein 90 inhibition and multi-target approach to maximize cardioprotection in ischaemic injury*. British Journal of Pharmacology, 2020. **177**(15): p. 3378-3388.
 85. Fam, N.P., et al., *Clinician Guide to Angiogenesis*. Circulation, 2003. **108**(21): p. 2613-2618.
 86. Gerhardt, H., *VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting*. Organogenesis, 2008. **4**(4): p. 241-6.
 87. Horowitz, A. and M. Simons, *Branching morphogenesis*. Circ Res, 2008. **103**(8): p. 784-95.
 88. Chien, S., *Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(3): p. H1209-24.
 89. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. Nature Medicine, 2000. **6**(4): p. 389-395.
 90. Krock, B.L., N. Skuli, and M.C. Simon, *Hypoxia-Induced Angiogenesis: Good and Evil*. Genes & Cancer, 2011. **2**(12): p. 1117-1133.
 91. Sluimer, J.C. and M.J. Daemen, *Novel concepts in atherogenesis: angiogenesis and hypoxia in atherosclerosis*. The Journal of Pathology, 2009. **218**(1): p. 7-29.
 92. Kockx, M.M., et al., *Phagocytosis and Macrophage Activation Associated With Hemorrhagic Microvessels in Human Atherosclerosis*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2003. **23**(3): p. 440-446.
 93. Jamaiyar, A., et al., *Cardioprotection during ischemia by coronary collateral growth*. American journal of physiology. Heart and circulatory physiology, 2019. **316**(1): p. H1-H9.
 94. Faber, J.E., et al., *A brief etymology of the collateral circulation*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2014. **34**(9): p. 1854-1859.

95. Chilian, W.M., et al., *Coronary collateral growth--back to the future*. J Mol Cell Cardiol, 2012. **52**(4): p. 905-11.
96. Teng, C.J., K. Lachapelle, and R.C. Chiu, *Reappraisal of recent clinical trials of angiogenic therapy in myocardial ischemia*. Asian Cardiovasc Thorac Ann, 2005. **13**(1): p. 90-7.
97. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. Circulation, 1986. **74**(5): p. 1124-36.
98. Zhao, Z.Q., et al., *Inhibition of myocardial injury by ischemic preconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(2): p. H579-88.
99. Wu, M.Y., et al., *Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury*. Cellular Physiology and Biochemistry, 2018. **46**(4): p. 1650-1667.
100. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial Reperfusion Injury*. New England Journal of Medicine, 2007. **357**(11): p. 1121-1135.
101. Allencherril, J., et al., *Pathophysiology, Diagnosis, and Management of the No-Reflow Phenomenon*. Cardiovascular Drugs and Therapy, 2019. **33**(5): p. 589-597.
102. Gill, C., R. Mestril, and A. Samali, *Losing heart: the role of apoptosis in heart disease--a novel therapeutic target?* Faseb j, 2002. **16**(2): p. 135-46.
103. Eltzschig, H.K. and T. Eckle, *Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation*. Nature medicine, 2011. **17**(11): p. 1391-1401.
104. Timmers, L., et al., *The innate immune response in reperfused myocardium*. Cardiovasc Res, 2012. **94**(2): p. 276-83.
105. Fulda, S., et al., *Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death*. International Journal of Cell Biology, 2010. **2010**: p. 214074.
106. Kukreja, R.C., V.R. Emani, and M.L. Hess, *Activated Oxygen Species in Heart Failure*. Heart Failure Reviews, 1999. **4**(2): p. 1-12.
107. Shahzad, S., et al., *Elevated DNA Damage, Oxidative Stress, and Impaired Response Defense System Inflicted in Patients With Myocardial Infarction*. Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis, 2018. **24**(5): p. 780-789.
108. Neri, M., et al., *Cardiac Oxidative Stress and Inflammatory Cytokines Response After Myocardial Infarction*. Current vascular pharmacology, 2013. **13**.
109. Williams, R.S. and I.J. Benjamin, *Protective responses in the ischemic myocardium*. The Journal of clinical investigation, 2000. **106**(7): p. 813-818.
110. Dybdahl, B., et al., *Myocardial ischaemia and the inflammatory response: release of heat shock protein 70 after myocardial infarction*. Heart (British Cardiac Society), 2005. **91**(3): p. 299-304.
111. Li, C.Y., et al., *Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation*. J Biol Chem, 2000. **275**(33): p. 25665-71.
112. Li, J., J. Soroka, and J. Buchner, *The Hsp90 chaperone machinery: Conformational dynamics and regulation by co-chaperones*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2012. **1823**(3): p. 624-635.
113. Rossello, X. and D.M. Yellon, *The RISK pathway and beyond*. Basic research in cardiology, 2017. **113**(1): p. 2-2.

114. Taipale, M., D.F. Jarosz, and S. Lindquist, *HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(7): p. 515-28.
115. Kupatt, C., et al., *Heat shock protein 90 transfection reduces ischemia-reperfusion-induced myocardial dysfunction via reciprocal endothelial NO synthase serine 1177 phosphorylation and threonine 495 dephosphorylation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(8): p. 1435-41.
116. Jung, F., et al., *Hypoxic regulation of inducible nitric oxide synthase via hypoxia inducible factor-1 in cardiac myocytes*. Circ Res, 2000. **86**(3): p. 319-25.
117. Dulak, J., et al., *Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine*. Acta Biochim Pol, 2015. **62**(3): p. 329-37.
118. Dulak, J., et al., *Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in vascular pathobiology: focus on angiogenesis*. Circulation, 2008. **117**(2): p. 231-41.
119. Schirone, L., et al., *A Review of the Molecular Mechanisms Underlying the Development and Progression of Cardiac Remodeling*. Oxidative medicine and cellular longevity, 2017. **2017**: p. 3920195-3920195.
120. Prabhu, S.D. and N.G. Frangogiannis, *The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis*. Circ Res, 2016. **119**(1): p. 91-112.
121. Gąsecka, A., et al., *Extracellular vesicles in post-infarct ventricular remodelling*. Kardiol Pol, 2018. **76**(1): p. 69-76.
122. Ailawadi, S., et al., *Pathologic function and therapeutic potential of exosomes in cardiovascular disease*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1852**(1): p. 1-11.
123. Vats, A., et al., *Stem cells*. The Lancet, 2005. **366**(9485): p. 592-602.
124. Weissman, I.L., *Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution*. Cell, 2000. **100**(1): p. 157-68.
125. Zakrzewski, W., et al., *Stem cells: past, present, and future*. Stem Cell Res Ther, 2019. **10**(1): p. 68.
126. Knoblich, J.A., *Mechanisms of Asymmetric Stem Cell Division*. Cell, 2008. **132**(4): p. 583-597.
127. P. De Miguel, M., S. Fuentes-Julián, and Y. Alcaina, *Pluripotent Stem Cells: Origin, Maintenance and Induction*. Stem Cell Reviews and Reports, 2010. **6**(4): p. 633-649.
128. He, S., D. Nakada, and S.J. Morrison, *Mechanisms of stem cell self-renewal*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2009. **25**: p. 377-406.
129. Beltrami, A.P., et al., *Adult Cardiac Stem Cells Are Multipotent and Support Myocardial Regeneration*. Cell, 2003. **114**(6): p. 763-776.
130. Smith, A., *A glossary for stem-cell biology*. Nature, 2006. **441**(7097): p. 1060-1060.
131. Kolios, G. and Y. Moodley, *Introduction to stem cells and regenerative medicine*. Respiration, 2013. **85**(1): p. 3-10.
132. Jon S. Odorico MD, D.S.K., James A. Thomson *Multilineage Differentiation from Human Embryonic Stem Cell Lines*. STEM CELLS, 2001. **19**(3): p. 193-204.
133. Ilic, D. and C. Ogilvie, *Concise Review: Human Embryonic Stem Cells-What Have We Done? What Are We Doing? Where Are We Going?* Stem Cells, 2017. **35**(1): p. 17-25.
134. Wagers, A.J. and I.L. Weissman, *Plasticity of Adult Stem Cells*. Cell, 2004. **116**(5): p. 639-648.
135. Bianco, P., *"Mesenchymal" stem cells*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2014. **30**: p. 677-704.

136. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.* *Cytotherapy*, 2006. **8**(4): p. 315-317.
137. Karantalis, V., et al., *Allogeneic cell therapy: a new paradigm in therapeutics.* *Circ Res*, 2015. **116**(1): p. 12-5.
138. Voog, J. and D.L. Jones, *Stem cells and the niche: a dynamic duo.* *Cell stem cell*, 2010. **6**(2): p. 103-115.
139. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors.* *Cell*, 2006. **126**(4): p. 663-676.
140. Weissman, I.L. and J.A. Shizuru, *The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases.* *Blood*, 2008. **112**(9): p. 3543-3553.
141. Mount, N.M., et al., *Cell-based therapy technology classifications and translational challenges.* *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 2015. **370**(1680): p. 20150017-20150017.
142. Orlic, D., et al., *Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium.* *Nature*, 2001. **410**(6829): p. 701-705.
143. Nygren, J.M., et al., *Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation.* *Nat Med*, 2004. **10**(5): p. 494-501.
144. Ziegelhoeffer, T., et al., *Bone Marrow-Derived Cells Do Not Incorporate Into the Adult Growing Vasculature.* *Circulation Research*, 2004. **94**(2): p. 230-238.
145. Murry, C.E., et al., *Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts.* *Nature*, 2004. **428**(6983): p. 664-8.
146. Gneocchi, M., et al., *Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy.* *Circulation research*, 2008. **103**(11): p. 1204-1219.
147. L, P.K., et al., *The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine.* *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2019. **46**: p. 1-9.
148. Gneocchi, M., et al., *Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement.* *Faseb j*, 2006. **20**(6): p. 661-9.
149. Uemura, R., et al., *Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling.* *Circ Res*, 2006. **98**(11): p. 1414-21.
150. Zhang, M., et al., *SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction.* *The FASEB Journal*, 2007. **21**(12): p. 3197-3207.
151. Gneocchi, M., et al., *Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells.* *Nat Med*, 2005. **11**(4): p. 367-8.
152. Timmers, L., et al., *Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction.* *Stem Cell Res*, 2011. **6**(3): p. 206-14.
153. Oh, H., et al., *Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(21): p. 12313-8.

154. Ohnishi, S., et al., *Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions*. FEBS Lett, 2007. **581**(21): p. 3961-6.
155. Feng, Y., et al., *Ischemic preconditioning potentiates the protective effect of stem cells through secretion of exosomes by targeting Mecp2 via miR-22*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e88685.
156. Arslan, F., et al., *Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury*. Stem Cell Res, 2013. **10**(3): p. 301-12.
157. Koh, G.Y., et al., *Long-term survival of AT-1 cardiomyocyte grafts in syngeneic myocardium*. Am J Physiol, 1993. **264**(5 Pt 2): p. H1727-33.
158. Li, R.-K., et al., *Cardiomyocyte Transplantation Improves Heart Function*. The Annals of Thoracic Surgery, 1996. **62**(3): p. 654-661.
159. Stamm, C., et al., *Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration*. Lancet, 2003. **361**(9351): p. 45-6.
160. Müller, P., H. Lemcke, and R. David, *Stem Cell Therapy in Heart Diseases – Cell Types, Mechanisms and Improvement Strategies*. Cellular Physiology and Biochemistry, 2018. **48**(6): p. 2607-2655.
161. Yu, H., et al., *Stem cell therapy for ischemic heart diseases*. British Medical Bulletin, 2017. **121**(1): p. 135-154.
162. Jeevanantham, V., et al., *Adult bone marrow cell therapy improves survival and induces long-term improvement in cardiac parameters: a systematic review and meta-analysis*. Circulation, 2012. **126**(5): p. 551-68.
163. Wen, Y., et al., *Bone marrow-derived mononuclear cell therapy for patients with ischemic heart disease and ischemic heart failure*. Expert Opin Biol Ther, 2012. **12**(12): p. 1563-73.
164. Sadat, K., et al., *The effect of bone marrow mononuclear stem cell therapy on left ventricular function and myocardial perfusion*. J Nucl Cardiol, 2014. **21**(2): p. 351-67.
165. Traverse, J.H., T.D. Henry, and L.A. Moyer, *Is the measurement of left ventricular ejection fraction the proper end point for cell therapy trials? An analysis of the effect of bone marrow mononuclear stem cell administration on left ventricular ejection fraction after ST-segment elevation myocardial infarction when evaluated by cardiac magnetic resonance imaging*. Am Heart J, 2011. **162**(4): p. 671-7.
166. Kanelidis, A.J., et al., *Route of Delivery Modulates the Efficacy of Mesenchymal Stem Cell Therapy for Myocardial Infarction: A Meta-Analysis of Preclinical Studies and Clinical Trials*. Circ Res, 2017. **120**(7): p. 1139-1150.
167. Gao, L.R., et al., *A critical challenge: dosage-related efficacy and acute complication intracoronary injection of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction*. Int J Cardiol, 2013. **168**(4): p. 3191-9.
168. Perin, E.C., et al., *A Phase II Dose-Escalation Study of Allogeneic Mesenchymal Precursor Cells in Patients With Ischemic or Nonischemic Heart Failure*. Circ Res, 2015. **117**(6): p. 576-84.
169. Chullikana, A., et al., *Randomized, double-blind, phase I/II study of intravenous allogeneic mesenchymal stromal cells in acute myocardial infarction*. Cytotherapy, 2015. **17**(3): p. 250-261.

170. Lee, J.W., et al., *A randomized, open-label, multicenter trial for the safety and efficacy of adult mesenchymal stem cells after acute myocardial infarction*. J Korean Med Sci, 2014. **29**(1): p. 23-31.
171. Mathiasen, A.B., et al., *Bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment in patients with severe ischaemic heart failure: a randomized placebo-controlled trial (MSC-HF trial)*. Eur Heart J, 2015. **36**(27): p. 1744-53.
172. Yau, T.M., et al., *Intramyocardial Injection of Mesenchymal Precursor Cells and Successful Temporary Weaning From Left Ventricular Assist Device Support in Patients With Advanced Heart Failure: A Randomized Clinical Trial*. JAMA, 2019. **321**(12): p. 1176-1186.
173. Fisher, S.A., et al., *Meta-Analysis of Cell Therapy Trials for Patients With Heart Failure*. Circulation Research, 2015. **116**(8): p. 1361-1377.
174. Marvasti, T.B., et al., *CD34(+) Stem Cells: Promising Roles in Cardiac Repair and Regeneration*. Can J Cardiol, 2019. **35**(10): p. 1311-1321.
175. Asahara, T., A. Kawamoto, and H. Masuda, *Concise Review: Circulating Endothelial Progenitor Cells for Vascular Medicine*. STEM CELLS, 2011. **29**(11): p. 1650-1655.
176. Hill, J.M., et al., *Circulating Endothelial Progenitor Cells, Vascular Function, and Cardiovascular Risk*. New England Journal of Medicine, 2003. **348**(7): p. 593-600.
177. Yin, A.H., et al., *AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells*. Blood, 1997. **90**(12): p. 5002-12.
178. Li, Z., *CD133: a stem cell biomarker and beyond*. Experimental hematology & oncology, 2013. **2**(1): p. 17-17.
179. Röper, K., D. Corbeil, and W.B. Huttner, *Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(9): p. 582-92.
180. Bauer, N., et al., *New insights into the cell biology of hematopoietic progenitors by studying prominin-1 (CD133)*. Cells Tissues Organs, 2008. **188**(1-2): p. 127-38.
181. Kim, W.T. and C.J. Ryu, *Cancer stem cell surface markers on normal stem cells*. BMB Rep, 2017. **50**(6): p. 285-298.
182. Barzegar Behrooz, A., A. Syahir, and S. Ahmad, *CD133: beyond a cancer stem cell biomarker*. Journal of Drug Targeting, 2019. **27**(3): p. 257-269.
183. Donndorf, P. and G. Steinhoff, *CD133-Positive Cells for Cardiac Stem Cell Therapy: Current Status and Outlook*, in *Prominin-1 (CD133): New Insights on Stem & Cancer Stem Cell Biology*, D. Corbeil, Editor. 2013, Springer New York: New York, NY. p. 215-227.
184. Agbulut, O., et al., *Comparison of human skeletal myoblasts and bone marrow-derived CD133+progenitors for the repair of infarcted myocardium*. Journal of the American College of Cardiology, 2004. **44**(2): p. 458-463.
185. Bartunek, J., et al., *Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety*. Circulation, 2005. **112**(9 Suppl): p. I178-83.
186. Forcillo, J., et al., *Implantation of CD133+ stem cells in patients undergoing coronary bypass surgery: IMPACT-CABG pilot trial*. Can J Cardiol, 2013. **29**(4): p. 441-7.
187. Colombo, A., et al., *Myocardial blood flow and infarct size after CD133+ cell injection in large myocardial infarction with good recanalization and poor reperfusion: results from a randomized controlled trial*. J Cardiovasc Med (Hagerstown), 2011. **12**(4): p. 239-48.

188. Klein, H.M., et al., *Intramyocardial implantation of CD133+ stem cells improved cardiac function without bypass surgery*. Heart Surg Forum, 2007. **10**(1): p. E66-9.
189. Noiseux, N., et al., *The IMPACT-CABG trial: A multicenter, randomized clinical trial of CD133+ stem cell therapy during coronary artery bypass grafting for ischemic cardiomyopathy*. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2016. **152**(6): p. 1582-1588.e2.
190. Nasser, B.A., et al., *Autologous CD133+ bone marrow cells and bypass grafting for regeneration of ischaemic myocardium: the Cardio133 trial*. Eur Heart J, 2014. **35**(19): p. 1263-74.
191. Nasser, B.A., et al., *Autologous CD133+ bone marrow cells and bypass grafting for regeneration of ischaemic myocardium: the Cardio133 trial†*. European Heart Journal, 2014. **35**(19): p. 1263-1274.
192. Steinhoff, G., et al., *Cardiac Function Improvement and Bone Marrow Response -: Outcome Analysis of the Randomized PERFECT Phase III Clinical Trial of Intramyocardial CD133(+) Application After Myocardial Infarction*. EBioMedicine, 2017. **22**: p. 208-224.
193. Mansour, S., et al., *Stem cell therapy for the broken heart: mini-organ transplantation*. Transplant Proc, 2009. **41**(8): p. 3353-7.
194. Mansour, S., et al., *COMPARE-AMI trial: comparison of intracoronary injection of CD133+ bone marrow stem cells to placebo in patients after acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction: study rationale and design*. J Cardiovasc Transl Res, 2010. **3**(2): p. 153-9.
195. Mansour, S., et al., *One-Year Safety Analysis of the COMPARE-AMI Trial: Comparison of Intracoronary Injection of CD133 Bone Marrow Stem Cells to Placebo in Patients after Acute Myocardial Infarction and Left Ventricular Dysfunction*. Bone Marrow Res, 2011. **2011**: p. 385124.
196. Qiu, F., et al., *Impact of intracoronary injection of CD133+ bone marrow stem cells on coronary atherosclerotic progression in patients with STEMI: a COMPARE-AMI IVUS substudy*. Coron Artery Dis, 2016. **27**(1): p. 5-12.
197. Haddad, K., et al., *Analysis of the COMPARE-AMI trial: First report of long-term safety of CD133+ cells*. International Journal of Cardiology, 2020. **319**: p. 32-35.
198. Ott, H.C., et al., *Intramyocardial microdepot injection increases the efficacy of skeletal myoblast transplantation*. Eur J Cardiothorac Surg, 2005. **27**(6): p. 1017-21.
199. Smit, N.W. and R. Coronel, *Stem cells can form gap junctions with cardiac myocytes and exert pro-arrhythmic effects*. Frontiers in physiology, 2014. **5**: p. 419-419.
200. Kurdi, M., et al., *Hydrogels as a platform for stem cell delivery to the heart*. Congestive heart failure (Greenwich, Conn.), 2010. **16**(3): p. 132-135.
201. Li, M., et al., *Cell sheet technology: a promising strategy in regenerative medicine*. Cytotherapy, 2019. **21**(1): p. 3-16.
202. Guest, I., Z. Ilic, and S. Sell, *Origin of the stem cell niche concept*. Experimental Hematology, 2016. **44**(9): p. 809-810.
203. A., B., *Stem Cell Microenvironments and Beyond*, in *Stem Cell Microenvironments and Beyond*, C. Springer, Editor. 2017.
204. Shi, R.Z. and Q.P. Li, *Improving outcome of transplanted mesenchymal stem cells for ischemic heart disease*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **376**(2): p. 247-50.

205. Vasa, M., et al., *Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease*. *Circ Res*, 2001. **89**(1): p. E1-7.
206. Dimmeler, S. and A. Leri, *Aging and disease as modifiers of efficacy of cell therapy*. *Circulation research*, 2008. **102**(11): p. 1319-1330.
207. McCormick, J.B. and H.A. Huso, *Stem cells and ethics: current issues*. *Journal of cardiovascular translational research*, 2010. **3**(2): p. 122-127.
208. Haider, H. and M. Ashraf, *Preconditioning and stem cell survival*. *J Cardiovasc Transl Res*, 2010. **3**(2): p. 89-102.
209. Der Sarkissian, S., T. Lévesque, and N. Noiseux, *Optimizing stem cells for cardiac repair: Current status and new frontiers in regenerative cardiology*. *World J Stem Cells*, 2017. **9**(1): p. 9-25.
210. Tang, Y.L., et al., *Hypoxic preconditioning enhances the benefit of cardiac progenitor cell therapy for treatment of myocardial infarction by inducing CXCR4 expression*. *Circulation research*, 2009. **104**(10): p. 1209-1216.
211. Hu, X., et al., *Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2008. **135**(4): p. 799-808.
212. Das, R., et al., *The role of hypoxia in bone marrow-derived mesenchymal stem cells: considerations for regenerative medicine approaches*. *Tissue Eng Part B Rev*, 2010. **16**(2): p. 159-68.
213. He, A., et al., *The antiapoptotic effect of mesenchymal stem cell transplantation on ischemic myocardium is enhanced by anoxic preconditioning*. *Can J Cardiol*, 2009. **25**(6): p. 353-8.
214. Haider, H.K. and M. Ashraf, *Strategies to promote donor cell survival: combining preconditioning approach with stem cell transplantation*. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2008. **45**(4): p. 554-566.
215. Dzau, V.J., M. Gnechi, and A.S. Pachori, *Enhancing stem cell therapy through genetic modification*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. **46**(7): p. 1351-3.
216. Yau, T.M., et al., *Increasing transplanted cell survival with cell-based angiogenic gene therapy*. *Ann Thorac Surg*, 2005. **80**(5): p. 1779-86.
217. Tang, Y.L., et al., *Improved Graft Mesenchymal Stem Cell Survival in Ischemic Heart With a Hypoxia-Regulated Heme Oxygenase-1 Vector*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2005. **46**(7): p. 1339-1350.
218. Jiang, Y.B., et al., *[Effects of autologous mesenchymal stem cells transfected with heme oxygenase-1 gene transplantation on ischemic Swine hearts]*. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*, 2009. **37**(8): p. 692-5.
219. Ahmad, N., et al., *Cardiac protection by mitoKATP channels is dependent on Akt translocation from cytosol to mitochondria during late preconditioning*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **290**(6): p. H2402-8.
220. Park, A., et al., *Use of Statins to Augment Progenitor Cell Function in Preclinical and Clinical Studies of Regenerative Therapy: a Systematic Review*. *Stem Cell Rev Rep*, 2016. **12**(3): p. 327-39.

221. Szeto, A., et al., *Oxytocin attenuates NADPH-dependent superoxide activity and IL-6 secretion in macrophages and vascular cells*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008. **295**(6): p. E1495-501.
222. Noiseux, N., et al., *Preconditioning of stem cells by oxytocin to improve their therapeutic potential*. *Endocrinology*, 2012. **153**(11): p. 5361-72.
223. Der Sarkissian, S., et al., *Celastrol protects ischaemic myocardium through a heat shock response with up-regulation of haeme oxygenase-1*. *Br J Pharmacol*, 2014. **171**(23): p. 5265-79.
224. Sharma, S., et al., *Celastrol, an oral heat shock activator, ameliorates multiple animal disease models of cell death*. *Cell Stress Chaperones*, 2015. **20**(1): p. 185-201.
225. Tong, S., et al., *Celastrol pretreatment attenuates rat myocardial ischemia/ reperfusion injury by inhibiting high mobility group box 1 protein expression via the PI3K/Akt pathway*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018. **497**(3): p. 843-849.
226. Li, X., et al., *Protective effect of celastrol on myocardial ischemia-reperfusion injury*. *Anatol J Cardiol*, 2017. **18**(6): p. 384-390.
227. Westerheide, S.D., et al., *Celastrols as inducers of the heat shock response and cytoprotection*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(53): p. 56053-60.
228. Hieronymus, H., et al., *Gene expression signature-based chemical genomic prediction identifies a novel class of HSP90 pathway modulators*. *Cancer Cell*, 2006. **10**(4): p. 321-330.
229. Zhang, T., et al., *A novel Hsp90 inhibitor to disrupt Hsp90/Cdc37 complex against pancreatic cancer cells*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2008. **7**(1): p. 162-170.
230. Sreeramulu, S., et al., *Molecular Mechanism of Inhibition of the Human Protein Complex Hsp90–Cdc37, a Kinome Chaperone–Cochaperone, by Triterpene Celastrol*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2009. **48**(32): p. 5853-5855.
231. Aceros, H., et al., *Celastrol-type HSP90 modulators allow for potent cardioprotective effects*. *Life Sciences*, 2019. **227**: p. 8-19.
232. Trott, A., et al., *Activation of heat shock and antioxidant responses by the natural product celastrol: transcriptional signatures of a thiol-targeted molecule*. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(3): p. 1104-12.
233. Conde, A.G., et al., *Induction of Heat Shock Proteins by Tyrosine Kinase Inhibitors in Rat Cardiomyocytes and Myogenic Cells Confers Protection Against Simulated Ischemia*. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 1997. **29**(7): p. 1927-1938.
234. Budas, G.R., et al., *Mitochondrial import of PKCepsilon is mediated by HSP90: a role in cardioprotection from ischaemia and reperfusion injury*. *Cardiovasc Res*, 2010. **88**(1): p. 83-92.
235. Griffin, T.M., T.V. Valdez, and R. Mestril, *Radical activates heat shock protein expression and cardioprotection in neonatal rat cardiomyocytes*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. **287**(3): p. H1081-8.
236. Nasir, B.S., et al., *HSP90 Inhibitor Improves Lung Protection in Porcine Model of Donation After Circulatory Arrest*. *The Annals of Thoracic Surgery*, 2020. **110**(6): p. 1861-1868.
237. Wang, R., et al., *Activation of the antioxidant response element by specific oxidized metabolites of linoleic acid*. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2009. **81**(1): p. 53-59.

238. Taguchi, K., H. Motohashi, and M. Yamamoto, *Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution*. *Genes Cells*, 2011. **16**(2): p. 123-40.
239. Petrie, J.R., T.J. Guzik, and R.M. Touyz, *Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease: Clinical Insights and Vascular Mechanisms*. *The Canadian journal of cardiology*, 2018. **34**(5): p. 575-584.
240. Xu, X. and J. Ren, *Cardiac stem cell regeneration in metabolic syndrome*. *Curr Pharm Des*, 2013. **19**(27): p. 4888-92.
241. Fadini, G.P., et al., *Concise review: diabetes, the bone marrow niche, and impaired vascular regeneration*. *Stem cells translational medicine*, 2014. **3**(8): p. 949-957.
242. Moradipoor, S., et al., *Expression Profiling of Genes Related to Endothelial Cells Biology in Patients with Type 2 Diabetes and Patients with Prediabetes*. *BioMed research international*, 2016. **2016**: p. 1845638-1845638.
243. Tepper, O.M., et al., *Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures*. *Circulation*, 2002. **106**(22): p. 2781-6.
244. Rezabakhsh, A., et al., *Type 2 Diabetes Inhibited Human Mesenchymal Stem Cells Angiogenic Response by Over-Activity of the Autophagic Pathway*. *J Cell Biochem*, 2017. **118**(6): p. 1518-1530.
245. Fijany, A., et al., *Mesenchymal stem cell dysfunction in diabetes*. *Mol Biol Rep*, 2019. **46**(1): p. 1459-1475.
246. Pritz, T., B. Weinberger, and B. Grubeck-Loebenstien, *The aging bone marrow and its impact on immune responses in old age*. *Immunol Lett*, 2014. **162**(1 Pt B): p. 310-5.
247. Méndez-Ferrer, S., et al., *Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations*. *Nature*, 2008. **452**(7186): p. 442-7.
248. Albiero, M., et al., *Diabetes causes bone marrow autonomic neuropathy and impairs stem cell mobilization via dysregulated p66Shc and Sirt1*. *Diabetes*, 2014. **63**(4): p. 1353-65.
249. Ferraro, F., et al., *Diabetes impairs hematopoietic stem cell mobilization by altering niche function*. *Sci Transl Med*, 2011. **3**(104): p. 104ra101.
250. Fadini, G.P. and A. Avogaro, *Diabetes impairs mobilization of stem cells for the treatment of cardiovascular disease: a meta-regression analysis*. *Int J Cardiol*, 2013. **168**(2): p. 892-7.
251. Ling, L., et al., *Worse clinical outcomes in acute myocardial infarction patients with type 2 diabetes mellitus: relevance to impaired endothelial progenitor cells mobilization*. *PLoS One*, 2012. **7**(11): p. e50739.
252. Rocic, P., *Why is coronary collateral growth impaired in type II diabetes and the metabolic syndrome?* *Vascular pharmacology*, 2012. **57**(5-6): p. 179-186.
253. Mulvihill, N.T. and J.B. Foley, *Inflammation in acute coronary syndromes*. *Heart (British Cardiac Society)*, 2002. **87**(3): p. 201-204.
254. Wang, Y., et al., *C-X-C Motif Chemokine Receptor 4 Blockade Promotes Tissue Repair After Myocardial Infarction by Enhancing Regulatory T Cell Mobilization and Immune-Regulatory Function*. *Circulation*, 2019. **139**(15): p. 1798-1812.
255. Khodayari, S., et al., *Inflammatory Microenvironment of Acute Myocardial Infarction Prevents Regeneration of Heart with Stem Cells Therapy*. *Cell Physiol Biochem*, 2019. **53**(5): p. 887-909.

256. Abdelwahid, E., et al., *Stem cell death and survival in heart regeneration and repair*. Apoptosis : an international journal on programmed cell death, 2016. **21**(3): p. 252-268.
257. Ashburner, M., et al., *Gene ontology: tool for the unification of biology*. The Gene Ontology Consortium. Nat Genet, 2000. **25**(1): p. 25-9.
258. *The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong*. Nucleic Acids Res, 2019. **47**(D1): p. D330-d338.
259. Wolfien, M., et al., *Hematopoietic stem-cell senescence and myocardial repair - Coronary artery disease genotype/phenotype analysis of post-MI myocardial regeneration response induced by CABG/CD133+ bone marrow hematopoietic stem cell treatment in RCT PERFECT Phase 3*. EBioMedicine, 2020. **57**: p. 102862-102862.
260. Li, J., et al., *Gene expression profiling of CD133-positive cells in coronary artery disease*. Mol Med Rep, 2015. **12**(5): p. 7512-6.
261. Abeyrathna, P. and Y. Su, *The critical role of Akt in cardiovascular function*. Vascul Pharmacol, 2015. **74**: p. 38-48.
262. Morrison, D.K., *MAP kinase pathways*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(11).