

Université de Montréal

**Traitement de l'insuffisance cardiaque
De la transplantation à la thérapie cellulaire**

Par

Anthony Nguyen

Laboratoire de chirurgie expérimentale animale
Département de chirurgie cardiaque

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de PhD
en Sciences Biomédicales (3-484-1-0), option générale
Avril, 2020

© Anthony Nguyen, 2020

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée

**Traitement de l'insuffisance cardiaque
De la transplantation à la thérapie cellulaire**

Présenté par

Anthony Nguyen

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Pierre Pagé

Président-rapporteur

Hung Quoc Ly

Directeur de recherche

Louis P Perrault

Co-directeur de recherche

Jean Diodati

Membre du jury

Eric Charbonneau

Examineur externe

Guy Rousseau

Représentant de la doyenne

Résumé

La transplantation demeure le traitement de choix de l'insuffisance cardiaque (IC) et ce malgré les récents progrès des techniques de support d'assistance mécanique. Une amélioration considérable de la prévention et du traitement du rejet aigu a été réalisée ces 20 dernières années. Cependant, le succès à long terme des transplantations d'organes a été peu modifié : il est toujours compromis par la survenue d'une dysfonction chronique du greffon. Ainsi, l'avenir des transplantés cardiaques demeure sombre et représente un fardeau médical avec un impact socioéconomique important. Toutefois, la recherche a récemment mis en avant l'énorme potentiel de régénération des cellules souches (CS) et représenterait une nouvelle avenue thérapeutique pour les patients souffrant d'IC. Une meilleure compréhension des processus biologiques des CS et de leur interaction avec le cœur transplanté, permettrait d'exploiter pleinement leur potentiel de réparation cardiaque. Le but de cette thèse est d'explorer les différents aspects du traitement de l'IC en 2020. Les hypothèses proposées dans cette thèse sont les suivantes : (1) les excellents résultats obtenus (>20 ans de survie) chez près d'1/3 des patients greffés lors de la 1^{ère} décennie de notre expérience à ICM serait difficile à obtenir de nos jours à la vue de l'évolution d'une population plus malade et plus âgée; (2) le cœur artificiel total (CAT) temporaire Syncardia permet d'amener des patients en insuffisance cardiaque terminale à la greffe de façon satisfaisante; (3) la thérapie cellulaire, plus spécifiquement les CS d'origine adipeuse (ASC) sous forme sphéroïdes, permet de diminuer l'impact de la vasculopathie du greffon cardiaque; et (4) l'effet paracrine des ASC permet une diminution de l'inflammation dans un modèle expérimental de péritonite chez le rat.

Mots-clés : Insuffisance cardiaque, rejet chronique, thérapie cellulaire, régénération myocardique, effet paracrine, cellules souches mésenchymateuses

Abstract

Transplantation remains the preferred treatment for heart failure (HF) despite recent advances in mechanical support devices. A considerable improvement in the prevention and treatment of acute rejection has been achieved over the past 20 years. However, the long-term survival of organ transplants has not been changed: it is still compromised by the occurrence of chronic graft dysfunction. Thus, the future of cardiac transplant patients remains bleak and represents a medical burden with a significant socio-economic impact. However, research has recently highlighted the potential for regeneration of stem cells (SC) and would represent a new therapeutic avenue for patients with HF. A better understanding of the biological processes of SC and their interaction with the transplanted heart would allow them to fully exploit their cardiac repair potential. The aim of this thesis is to explore the various aspects of the treatment of HF in 2020. The hypotheses proposed in this thesis are as follows: (1) the excellent results obtained (> 20 years of survival) in almost 1/3 of the patients transplanted during the 1st decade of our experience at ICM would be difficult to obtain from our days at the sight of the evolution of a sicker and older population; (2) the temporary Syncardia total artificial heart (CAT) allows patients with end-stage heart failure to be transplanted satisfactorily; (3) cell therapy, more specifically CS of adipose origin (ASC) cultured as spheroid, reduce the impact of cardiac allograft vasculopathy (CAV); and (4) the paracrine effect of ASCs reduces inflammation in a rat experimental model of peritonitis.

Keywords : Heart failure, chronic rejection, cellular therapy, myocardial regeneration, paracrine effect, mesenchymal stem cells

Table des matières

Résumé	5
Abstract	7
Table des matières	9
Liste des tableaux	15
Liste des figures	17
Liste des sigles et abréviations	19
Remerciements	25
Introduction	29
La charge clinique de la maladie cardiaque ischémique	29
Limitations des stratégies thérapeutiques actuelles du MCI	29
Chapitre 1 – Définition et approches de l’insuffisance cardiaque	33
1.1. Terminologie	34
1.2. Insuffisance cardiaque à FE préservée, moyenne ou réduite	34
1.3. Classification et diagnostic de l’IC	35
1.4. Épidémiologie et étiologie	38
1.5. Physiopathologie de l’IC	40
1.5.1. Insuffisance cardiaque à FE réduite	43
1.5.2. Insuffisance cardiaque à FE préservée	43
1.5.3. Insuffisance du VG	44
1.5.4. Insuffisance du VD	45
1.5.5. Réponse cardiaque	45
1.5.6. Réponses hémodynamiques	46
1.5.7. Réponses rénales	46
1.5.8. Réponses neuro-hormonales	47
1.5.9. Modifications liées au vieillissement	48
1.6. Symptomatologie	49
1.6.1. Anamnèse	52
1.6.2. Examen	53
1.7. Diagnostic	54
1.7.1. Radiographie de thorax	55
1.7.2. Electrocardiogramme	55

1.7.3.	Imagerie.....	56
1.7.4.	Analyse de sang.....	57
1.8.	Pronostic.....	58
1.8.1.	Soins de fin de vie	58
1.9.	Traitements.....	59
1.9.1.	Prise en charge de la maladie	60
1.9.2.	Traitement médicamenteux	61
1.9.3.	Troubles du rythme	62
1.9.4.	Dispositifs thérapeutiques	63
1.9.5.	Approches chirurgicales	65
1.9.5.1.	<i>Revascularisation coronarienne</i>	65
1.9.5.2.	<i>Reconstruction ventriculaire</i>	67
1.9.5.3.	<i>Anévrismectomie ventriculaire gauche</i>	67
1.9.5.4.	<i>Chirurgie valvulaire</i>	68
1.9.5.4.1.	<i>Sténose aortique</i>	68
1.9.5.4.2.	<i>Insuffisance aortique (IAo)</i>	69
1.9.5.4.3.	<i>Insuffisance mitrale (IM)</i>	69
1.9.5.4.4.	<i>Insuffisance tricuspide (IT)</i>	70
1.9.5.5.	<i>Assistance circulatoire mécanique (ACM)</i>	70
1.9.5.5.1.	<i>MCS et IC aigue</i>	71
1.9.5.5.2.	<i>MCS et IC chronique</i>	71
1.9.5.6.	<i>Greffe cardiaque</i>	75
1.9.5.6.1.	<i>Volume de transplantation</i>	75
1.9.5.6.2.	<i>Données démographiques et caractéristiques des donneur et receveur</i>	76
1.9.5.6.3.	<i>Survie</i>	78
1.9.5.6.4.	<i>Causes de décès</i>	81
1.9.6.	Insuffisance cardiaque persistante.....	83
Chapitre 2 – Manuscrit #1		85
2.1.	Avant-propos au Manuscrit #1	86
Chapitre 3 – Assistance mécanique de longue durée		105
3.1.	Introduction	106
3.2.	Assistance bi ventriculaire	107
3.3.	Description des appareils d’assistances.....	108
3.3.1.	Thoratec (BiVAD).....	108

3.3.2.	Cœur Artificiel Total Syncardia (CAT)	109
3.3.3.	Comparaison des deux dispositifs	111
Chapitre 4 –	Manuscrit #2	115
4.1.	Avant-propos au Manuscrit #2	116
Chapitre 5 –	Physiopathologie de la coronaropathie du greffon	135
5.1.	Définition et statistiques récentes	136
5.2.1.	Pathogenèse et caractéristiques histologiques	137
5.2.2.	Atteinte endothéliale	138
5.2.3.	Facteurs lésionnels à l'origine de la MCG	142
5.2.3.1.	<i>Facteurs immuns</i>	143
5.2.3.2.	<i>Facteurs non-immuns</i>	145
5.2.4.	Autres facteurs impliqués dans la MCG	146
5.2.3.1.	<i>La mort encéphalique</i>	146
5.2.3.2.	<i>L'âge du donneur</i>	147
5.2.3.3.	<i>L'ischémie-reperfusion du greffon</i>	147
5.2.3.4.	<i>Le cytomégalovirus</i>	148
5.3.1.	Diagnostic de la MCG	148
5.3.1.1.	<i>Imagerie invasive</i>	149
5.3.1.2.	<i>Imagerie non invasive</i>	153
5.3.2.	Traitement de la MCG	156
5.3.2.1.	<i>Pharmacothérapie</i>	156
5.3.2.2.	<i>Immunosuppression</i>	158
5.3.2.3.	<i>Traitement interventionnel</i>	159
5.3.2.4.	<i>Traitement chirurgical</i>	160
5.3.2.5.	<i>Recherche translationnelle et théories émergentes</i>	161
Chapitre 6 –	Thérapie cellulaire et greffe cardiaque	163
6.1.	État des connaissances actuelles et validité de l'étude	164
7.1.1.	Charge clinique de la maladie cardiaque ischémique	164
7.1.2.	Limitations des stratégies thérapeutiques actuelles	164
7.2.	Approche thérapeutique basée sur les SC	166
7.2.1.	Base biologique	166
7.2.2.	Source potentielle de CS du donneur pour la régénération cardiaque	166
7.2.2.1.	<i>CS embryonnaire</i>	167
7.2.2.2.	<i>CS adulte exogène cardiaque</i>	167

7.2.2.3.	<i>CS dérivés de la moelle osseuse</i>	168
7.2.2.4.	<i>CS hématopoïétiques (CSH)</i>	168
7.2.2.5.	<i>CS mésenchymateuses (CSM)</i>	169
7.2.2.6.	<i>CS d'origine adipeuse (ASCs)</i>	170
7.2.3.	Voies d'administrations des CS	173
7.2.3.1.	<i>Application topique et Injection locale</i>	173
7.2.3.2.	<i>Injection intra-artérielle</i>	174
7.2.3.3.	<i>Injection intra veineuse</i>	175
7.2.4.	Application clinique de la thérapie cardio-vasculaire à base de CS	176
7.2.5.	Les controverses actuelles et limitations concernant l'approche à base de cellules pour la régénération cardiaque	177
7.3.	Revue de la littérature : CSM et maladie ischémique	178
7.4.	Revue de la littérature : CSM et transplantation cardiaque.....	183
7.5.	Potentialisation de l'effet des CS par culture en 3D	185
7.6.	Principales études cliniques dans la réparation myocardique	187
Chapitre 7 – Cellules souches et immunomodulation		190
7.1.	Introduction	191
7.2.	Cellules souches et niches inflammatoires.....	194
7.3.	Propriétés immunosuppressives des CSM	196
7.4.	Amélioration immune des CSM.....	201
7.5.	Greffe de CSM dans les sites d'atteinte ou d'inflammation tissulaire	202
Chapitre 8 – Manuscrit #3		206
8.	Avant-propos au Manuscrit #3	207
Chapitre 9 – Effets paracrine potentiels des CSM sur le myocarde.....		239
9.1.	Introduction	240
9.1.	Survie et cytoprotection	241
9.2.	Prolifération des cardiomyocytes	242
9.3.	Néovascularisation	243
9.4.	Remodelage cardiaque	243
9.5.	Activation des CS résidentes.....	245
9.6.	Dysfonction endothéliale.....	245
9.7.	Facteurs de croissance.....	247
Chapitre 10 – Manuscrit #4		251
10.1.	Avant-propos au Manuscrit #4.....	252

Chapitre 11 – Discussion.....	284
Chapitre 12 – Conclusions	292
Chapitre 13 – Annexes	293
13.1. Annexe 1 : Chaire Marcelle et Jean Coutu en insuffisance cardiaque et traitement novateur	293
13.2. Annexe 2 : Articles publiés ou en cours de révision	294
13.3. Annexe 3 : Communications tirées des présentes études	295
Références bibliographiques	297
Chapitre 14 – Curriculum Vitae	335

Liste des tableaux

Tableau 1. –	Classification fonctionnelle NYHA et description de leurs symptômes.....	35
Tableau 2. –	Étiologies de l'IC	39
Tableau 3. –	Symptômes et signes d'IC.....	50
Tableau 4. –	Différence histologique entre MCG et athérosclérose	141
Tableau 5. –	Classification lésionnelle de MCG selon ISHLT	149
Tableau 6. –	Exploration non invasive de la MCG.....	153

Liste des figures

Figure 1. –	Algorithme décisionnel pour le diagnostic d'IC.....	37
Figure 2. –	Guide diagnostic de l'étiologie de l'IC.....	38
Figure 3. –	Principe de Frank-Starling.....	41
Figure 4. –	Illustration du HeartMate II (Abbott Laboratories, IL, USA).....	72
Figure 5. –	Illustration du HeartWare HVAD (Medtronic).....	73
Figure 6. –	Illustration du HeartMate III(Abbott Laboratories,Chicago, IL, USA).....	74
Figure 7. –	Nombre de transplantations (adulte et pédiatrique) dans le monde.....	76
Figure 8. –	Distribution de l'âge des receveurs par ère.....	77
Figure 9. –	Pourcentage de patients sous assistances par année et type de support.....	78
Figure 10. –	Courbe de survie en fonction du type de support mécanique :	78
Figure 11. –	Courbe de survie Kaplan-Meier par ère.....	79
Figure 12. –	Incidence cumulative des causes de mortalité	80
Figure 13. –	Incidence des causes de décès après transplantation	82
Figure 14. –	Survie des patients greffés avec ou sans MCG.....	82
Figure 15. –	Illustration du Thoratec PVAD (Abbott Laboratories, IL, USA).....	109
Figure 16. –	Illustration du CAT Syncardia (Syncardia Systems, Tucson, AZ, USA).....	110
Figure 17. –	Maladie coronaire du greffon cardiaque.....	138
Figure 18. –	Vasculite dans la MCG.	139
Figure 19. –	Représentation schématique de la MCG vs athérosclérose typique du patient non transplanté.....	140
Figure 20. –	Mécanismes impliqués dans la genèse des lésions vasculaires du greffon.....	141
Figure 21. –	Mécanismes immuns et non-immuns impliqués dans la MCG	142
Figure 22. –	Représentation des facteurs immuns et non immuns à l'origine des lésions de MCG.....	143
Figure 23. –	Image d'USIV dans l'IVA d'un patient greffé avec atteinte endothéliale MCG.....	151
Figure 24. –	Coronographie et couplage avec USIV.....	152
Figure 25. –	Analyse multi-fonctionnelle de la RMC.....	155
Figure 26. –	Evolution de l'utilisation des cellules souches au cours du temps	172
Figure 27. –	Représentation des diverses voies d'administrations des CS	176
Figure 28. –	Interaction des CSM avec les cellules immunes.....	191
Figure 29. –	Mécanismes d'action proposé des CSM.	192
Figure 30. –	Propriétés immunosuppressives de CSM.....	197
Figure 31. –	Proposition d'interaction entre CSM et cellules immunes au cours de la réparation cellulaire.	200
Figure 32. –	Résumé des effets paracrines sur le signalment des CS adultes	202

Liste des sigles et abréviations

ACC = American College of Cardiology

ACM = Assistance circulatoire mécanique

AHA = American Heart Association

ASC = Adipose Stromal Cell

AVC = accident vasculaire cérébral

BM = bone marrow

BNP = brain natriuretic peptide

CAT = Coeur Artificiel total

CAV= Cardiac Allograft Vasculopathy

CEC = circulation extracorporelle

CEP = cellules endothéliales progénitrices

CMI = cardiomyopathie ischémique

CMN = cellules mononucléaires

CMV= cytomégalovirus

CS = cellules souches

CSH = cellules souches hématopoïétiques

CSM = cellules souches mésenchymateuses

DVGS = Dysfonction ventriculaire gauche systolique

EACTS = European Association for Cardio-Thoracic Surgery

ECMO = Extracorporeal membrane oxygenation

ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay

eNOS = endothelial nitric oxide synthase

EPC = endothelial progenitor cells

EPO = erythropoietin

ETT = échocardiographie transthoracique

FA = fibrillation auriculaire

FÉVG = fraction d'éjection du ventricule gauche

FGF = fibroblast growth factor

FRSQ = Fonds de la recherche en santé du Québec

HGF = hepatic growth factor
IAo = insuffisance aortique
IM = insuffisance mitrale
IT = insuffisance tricuspide
IC = insuffisance cardiaque
ICA = insuffisance cardiaque aigue
ICC = insuffisance cardiaque chronique
ICFEm = insuffisance cardiaque à FE moyenne
ICFEp = insuffisance cardiaque à FE préservée
ICFEr = insuffisance cardiaque à FE réduite
ICM = Institut de Cardiologie de Montréal
IDM = infarctus du myocarde
IECA = inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
IGF-1 = insulin-like growth factor 1
IL = interleukine
ISHLT = International Society of Heart and Lung Transplantation
IVA = interventriculaire antérieure
LVAD = left ventricular assist device
MCG = maladie coronaire du greffon
MCI = maladie cardiaque ischémique
MCP-1 = monocyte chemoattractant protein-1
MEC = matrice extracellulaire
MMP = matrix metalloproteinases
MNC = mononuclear nuclear cell
MSC = mesenchymal stem cells
NO = nitric oxide (monoxyde d'azote)
NYHA = New York Heart Association
PCR = polymerase chain reaction
PECAM-1 = platelet endothelial cell adhesion molecule 1
PIGF = placental growth factor
PDGF = platelet-derived growth factor

PTLD= Post-transplantation lymphoproliferative disorders

RL = radicaux libres

RMN = résonance magnétique nucléaire

ROS = reactive oxygen species

RVAD= right ventricular assist device

TAH=total artificial heart

TC = transplantation cardiaque

TGF = transforming growth factor

TIMP = tissue inhibitor of metalloproteinases

TNF = tumor necrosis factor

TRC = thérapie de resynchronisation cardiaque

VAD= ventricular assist device

VDG = vasculopathie du greffon

VEGF = vascular endothelial growth factor

VEGFR = vascular endothelial growth factor receptor

VG = ventricule gauche

Ever tried. Ever failed. No matter. Try again. Fail again. Fail better.

-Samuel Beckett-

Remerciements

La thèse de doctorat demeure une étape déterminante dans la vie de tout praticien. Et celle-ci ne fait pas exception. Elle est le fruit de rencontres humaines et de collaborations avec de nombreuses personnes sans lesquelles ce travail n'aurait pu voir le jour.

J'aimerais vivement les remercier ici.

Tout d'abord, je souhaite adresser mes sincères remerciements aux membres du Jury :

Au **Docteur Hung Quoc Ly** pour son rôle essentiel de guide et sa bienveillance dans l'élaboration des études nécessaires à cette thèse de doctorat. Tu m'as accueilli au sein de ton laboratoire expérimental de l'Institut de Cardiologie de Montréal (ICM) et n'a cessé de me montrer la voie du succès. Malgré tes nombreuses tâches universitaires et cliniques, tu as toujours su garder du temps pour me prodiguer tes judicieux conseils. Tes connaissances et ton expertise dans le domaine de la thérapie cellulaire appliqués à la cardiologie font de toi un expert international. Pour m'avoir guidé, reçois toute mon admiration, ma profonde gratitude et mon amitié sincère.

Au **Professeur Louis Perrault**. Vous m'avez accueilli à l'Institut de Cardiologie de Montréal où j'ai pu développer à la fois mes compétences en chirurgie cardiaque mais également participer aux nombreux projets scientifiques de l'ICM. En tant que chirurgien-chercheur de renommée internationale, vous m'avez soutenu et guidé tout au long de ce difficile chemin qu'est le doctorat et m'avez fait l'honneur d'être co-directeur de cette thèse. Je vous remercie pour votre soutien inconditionnel et votre confiance aussi bien clinique que dans le domaine de la recherche fondamentale. J'ai eu la chance et la fierté d'avoir été votre élève. Recevez toute mon admiration, ma gratitude et mon profond respect.

Au **Docteur Eric Charbonneau**. Vous êtes un chirurgien-chercheur de renommée internationale et me faites l'honneur de juger cette thèse. Recevez tout mon respect et ma gratitude.

Au **Docteur Jean Diodati**. Vous êtes un cardiologue-chercheur de renommée internationale dans le domaine des traitements antiplaquettaires et me faites l'honneur de juger cette thèse. Recevez tout mon respect et ma gratitude.

Au **Docteur Pierre Pagé**. Mentor et chirurgien d'exception, référence internationale en neurophysiologie cardiaque et arythmie, vous me faites l'honneur d'être président du jury de cette thèse. Recevez toute ma gratitude et mon profond respect.

Au **Docteur Guy Rousseau**. Vous êtes un chercheur de renommée internationale et me faites l'honneur de représenter la doyenne afin de juger cette thèse. Recevez toute ma gratitude et mon profond respect.

Je tiens également à adresser mes remerciements à l'équipe de recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal pour son soutien technique avec qui j'ai eu le plaisir de travailler : Au **Professeur Martin Sirois**. Vous êtes un chercheur de renommée internationale. Je vous remercie pour votre écoute attentive, vos conseils avisés et votre sens critique toujours constructif. Recevez toute ma gratitude.

Marie-Elaine Clavet pour son soutien inconditionnel et son expertise en immunohistochimie, et **Louis Villeneuve** pour son expertise en immunofluorescence, sans qui ces résultats n'auraient pu être atteints.

A **Celia Sid-Otmane**, ma co-fellow de recherche. Merci pour tes conseils avisés, ta disponibilité et ton expertise dans la genèse des cellules souches sphéroïdes. Ce travail n'aurait pas pu aboutir sans ton soutien.

Au **Docteur Nicola Vistarini**. Cette thèse est également le fruit de ton travail. Merci mon co-fellow pour ces bons moments passés à l'Institut de Cardiologie. Je ne les oublierai jamais. Merci à Philippe Pouliot pour son expertise en résonance magnétique chez le murin. Merci à Valérie Pedneault-Gagnon pour ton aide et tes conseils.

A Robert Clément pour sa bonne humeur.

A Natacha Duquette et Vanessa Durocher-Granger pour leur aide précieuse au sein du laboratoire animal. Je remercie l'équipe de chirurgie cardiaque de l'Institut de Cardiologie de Montréal qui a contribué à parfaire ma formation chirurgicale : les Drs Michel Carrier, Louis Perrault, Pierre Pagé, Raymond Cartier, Michel Pellerin, Philippe Demers, Ismail El-Hamamsy, Denis Bouchard, Nancy Poirier et Yoan Lamarche.

Je remercie l'ADETEC de m'avoir accordé une bourse de recherche (2015), à l'APHP pour sa bourse de mobilité (2014), et l'UDEM pour ses bourses d'excellences (2014, 2016, 2019). Je remercie la Chaire Marcelle et Jean Coutu de traitements chirurgicaux novateurs en insuffisance cardiaque de l'Université de Montréal à l'Institut de cardiologie de Montréal pour leur soutien de mes travaux scientifiques.

Enfin, des remerciements particuliers à mes parents pour leur amour et soutien inconditionnel au cours de mes études médicales, chirurgicales et scientifiques.

A Gabriel et Rafael, mes enfants qui sont le soleil de ma vie.

A Nadia pour m'avoir supporté tant d'années. A ma grand-mère.

Pour terminer, une pensée particulière à Céline pour m'avoir soutenu et réconforté dans les moments de découragement qui pavent ce long chemin. Merci d'être à mes côtés.

Introduction

La charge clinique de la maladie cardiaque ischémique

La maladie cardiaque ischémique (MCI) menant à l'insuffisance cardiaque (IC) demeure l'une des principales causes de mortalité et de morbidité dans le monde¹⁻³. En Amérique du Nord, l'infarctus aigu du myocarde (IAM) représente plus de 50% des décès liés aux pathologies cardiovasculaires. Chaque année, environ un million de patients souffrent d'un IAM, qui porte un taux de mortalité d'environ 25% sur 3 ans. Parmi les patients qui survivent à un infarctus du myocarde avec surélévation ST, une certaine proportion présentera une atteinte coronarienne avec une restauration anormale des flux épocardiques⁴ et une reperfusion microvasculaire inadéquate⁵. La perte subséquente de myocytes viables endommage de façon irréversible le myocarde. Avec un plus grand nombre de patients survivants à l'IAM ainsi que d'un vieillissement de la population, l'insuffisance cardiaque congestive post-infarctus (ICP) est devenu un problème de santé publique majeur avec une augmentation de l'impact social et du fardeau économique. Ce dernier porte un pronostic défavorable pour les patients symptomatiques (jusqu'à 50% de mortalité par an).

Limitations des stratégies thérapeutiques actuelles du MCI

Malgré les progrès récents accomplis à la fois dans les stratégies de reperfusion aiguë dans IMA et les thérapies préventives chroniques post-infarctus, les méthodes de traitements actuelles sont limitées comme en témoignent les statistiques susmentionnées. Les stratégies thérapeutiques actuelles visent à améliorer la reperfusion myocardique pendant IMA⁶ et de limiter les effets délétères de l'activation des systèmes sympathique / neuroendocrines dans l'espoir de stopper la progression de l'insuffisance cardiaque (IC)⁷.

La transplantation demeure le traitement de choix de l'IC et ce malgré les récents progrès des techniques de support d'assistance mécanique (courte ou longue durée). Une amélioration considérable de la prévention et du traitement du rejet aigu a été réalisée ces 20 dernières années.

Une meilleure connaissance de l'immunologie de greffe associée à une utilisation de plus en plus efficace et ciblée des traitements immunosuppresseurs a permis une amélioration de la survie à court terme des patients transplantés. Cependant, le succès à long terme des transplantations d'organes a été peu modifié : il est toujours compromis par la survenue d'une dysfonction chronique du greffon. Les facteurs déterminants la survenue d'une dysfonction chronique du greffon sont multiples, immunologiques ou non immunologiques. La vasculopathie du greffon (VDG) reste un des facteurs déterminants de l'évolution des greffes cardiaques pouvant aboutir à une défaillance chronique du greffon. C'est la principale cause de perte de greffon après 1 an. Ainsi, le registre de la Société Internationale de Transplantation Cardiaque et Pulmonaire (ISHLT) montre des taux de survie des greffés cardiaques à 5 et 10 ans de 60 et 45% respectivement^{8,9}. Ce registre indique également que des lésions vasculaires chroniques sont mises en évidence par l'angiographie chez 8% des survivants à un an, 32% des survivants à cinq ans et 43% des survivants à huit ans. Par ailleurs, des travaux récents ont suggéré que l'impact de la maladie vasculaire du greffon serait sous-estimé en transplantation hépatique ou rénale.

À l'heure actuelle, la transplantation cardiaque orthotopique reste le seul traitement curatif pour les dommages graves et irréversibles post-infarctus. Pourtant, la pénurie de greffons cardiaque a limité l'accès à la transplantation cardiaque. Cet écart entre l'offre et la demande souligne la dure réalité actuelle : cette avenue thérapeutique ne remplit plus les exigences d'un besoin clinique croissant. En conséquence, de nombreuses nouvelles thérapies alternatives ont été explorées¹⁰ dont les traitements moléculaires, pharmacologiques ou d'assistances mécaniques¹¹. Parmi ces stratégies, la thérapie à base de cellules souches (CS) pour la régénération cardiaque a capté l'attention des cliniciens et des scientifiques et a émergé comme une thérapie controversée, mais prometteuse, et potentiellement curative¹². Une meilleure compréhension des processus biologiques des CS et de leur interaction avec le cœur transplanté, permettrait d'exploiter pleinement leur potentiel de réparation cardiaque. C'est donc avec l'objectif principal de mieux comprendre l'impact des nouvelles thérapies dans le traitement des patients souffrant d'IC terminale que j'ai entrepris, en 2014, un doctorat à l'Université de Montréal.

Les hypothèses qui sous-tendent cette thèse de doctorat sont les suivantes : (1) les excellents résultats obtenus (>20 ans de survie) chez près d'un tiers des patients greffés lors de la 1^{ère} décennie de notre expérience à ICM serait difficile à obtenir de nos jours à la vue de l'évolution d'une population plus malade et plus âgée; (2) le cœur artificiel total (CAT) temporaire Syncardia

permet d'amener des patients en insuffisance cardiaque terminale à la greffe de façon satisfaisante; (3) la thérapie cellulaire, plus spécifiquement les CS d'origine adipeuse (ASC) sous forme sphéroïdes, permet de diminuer l'impact de la vasculopathie du greffon cardiaque (VDG); et (4) l'effet paracrine des ASC permet une diminution de l'inflammation dans un modèle expérimental de péritonite chez le rat.

Cette thèse comporte quatre études originales, deux cliniques publiées et deux fondamentales soumises. La première étude clinique permet au lecteur de mieux appréhender les évolutions des caractéristiques des 210 patients transplantés au cours des 30 dernières années à l'ICM. En collaboration avec le Dr Michel Carrier, nous avons démontré que les excellents résultats obtenus chez les patients transplantés de plus de 20 ans comparés aux patients transplantés dans l'ère actuelle sont difficiles à reproduire à la vue de la population plus malade et plus âgée. La deuxième étude clinique aborde le traitement des patients insuffisants cardiaques bi ventriculaires par le CAT à l'ICM. Nous démontrerons que cette technologie unique au Canada permet de mener des patients extrêmement malades à la transplantation avec un taux de survie satisfaisant. La troisième étude évalue l'impact des cellules souches mésenchymateuses (CSM) issus des adipocytes humains sous forme sphéroïde (ASCs) sur l'avancée de la VDG dans un modèle de transplantation chez le murin. La dernière étude expérimentale étudie l'effet des ASCs dans un modèle de péritonite chez le rat et notamment les propriétés anti-inflammatoires des CS.

Enfin, la discussion portera sur les avantages de la thérapie cellulaire en termes de réparation et régénération cellulaire, de même que son potentiel de translation en clinique. Les limitations liées à chacune de ces études et les perspectives futures sont traitées en conclusion de cette thèse.

Chapitre 1 – Définition et approches de l'insuffisance cardiaque

Dans le présent chapitre, nous présenterons la définition, l'étiologie, l'impact clinique sur la santé publique et les limites des traitements actuels des patients insuffisants cardiaques terminaux. Le candidat au doctorat en sciences biomédicales présentera ensuite son premier travail de recherche clinique réalisé en association avec le Dr Michel Carrier. Cette étude originale, débutée dans le cadre du programme de PhD est axée sur l'expérience de l'ICM en transplantation cardiaque en se focalisant sur le pronostic des patients greffés survivants à très long terme (>20ans).

1.1. Terminologie

L'IC est un syndrome clinique complexe caractérisé par des symptômes typiques (dyspnée, fatigue) accompagnés de signes caractéristiques (tachycardie, polypnée, épanchements...) mais également une preuve objective d'anomalie structurelle ou fonctionnelle du cœur au repos (souffle cardiaque, cardiomégalie, anomalie échographique).^{13, 14}

Bien que cette définition se soit traditionnellement concentrée sur des patients présentant un dysfonctionnement ventriculaire gauche systolique (DVGS), il existe une prise de conscience accrue du syndrome qui touche les patients atteints d'IC aiguë et chronique, d'IC droite ou d'IC sur troubles ventriculaires ou dysfonctions valvulaires.

L'IC chronique est définie comme une évolution persistante et progressive de la maladie.

L'ICA est définie quant à elle comme un changement progressif ou rapide des signes et symptômes de l'IC, nécessitant une prise en charge thérapeutique urgente.

L'IC dite avancée, bien que fréquemment utilisée en clinique, n'est plus une définition communément acceptée.

1.2. Insuffisance cardiaque à FE préservée, moyenne ou réduite

Plusieurs termes spécifiques sont utilisés dans la littérature afin de mieux stratifier les patients souffrant d'IC :

- FE avec fraction d'éjection préservée (ICFEp): fraction d'éjection VG (FEVG) $\geq 50\%$;
- FE avec une fraction d'éjection dans la moyenne (ICFEm): FEVG 41% à 49%;
- FE avec fraction d'éjection réduite (ICFr): FEVG $\leq 40\%$.

Ceci reconnaît le côté incertain de l'évaluation de la FEVG en fonction des différentes études et les moyens diagnostics permettant d'évaluer la FEVG. L'échocardiographie est la méthode la plus facilement accessible pour évaluer la FEVG au Canada. Ces mesures peuvent varier en fonction de facteurs intrinsèques au patient ou à des facteurs techniques, ainsi que du traitement en cours ou de l'état clinique du patient. Les limites de FE mentionnés précédemment reconnaissent qu'il existe un grand nombre de preuves liées au traitement des patients atteints de ICFEr et de nouvelles preuves pour les patients atteints de ICFEp et de ICFEm. ICFEm peut représenter de nombreux phénotypes différents, y compris des patients progressant de l'ICFEp.

Le terme FE ayant pu récupérer a également été décrit dans la littérature ¹⁵, en référence à des patients ayant précédemment présenté une ICFEr mais dont la FE est désormais > 40%. Ces patients pourraient éventuellement être classés dans les groupes ICFEm ou ICFEp mais méritent d'être reconnus, car malgré des paramètres d'imagerie restitués, ils pourraient tout de même présenter un risque supplémentaire d'effets cliniques indésirables. Une incertitude règne quant aux stratégies de traitement individuels des personnes atteintes de ICFEm, notamment la surveillance, le traitement et le pronostic.

1.3. Classification et diagnostic de l'IC

Les symptômes cliniques sont décrits à l'aide de la New York Heart Association (NYHA) classe fonctionnelle I-IV. (Tableau 1)

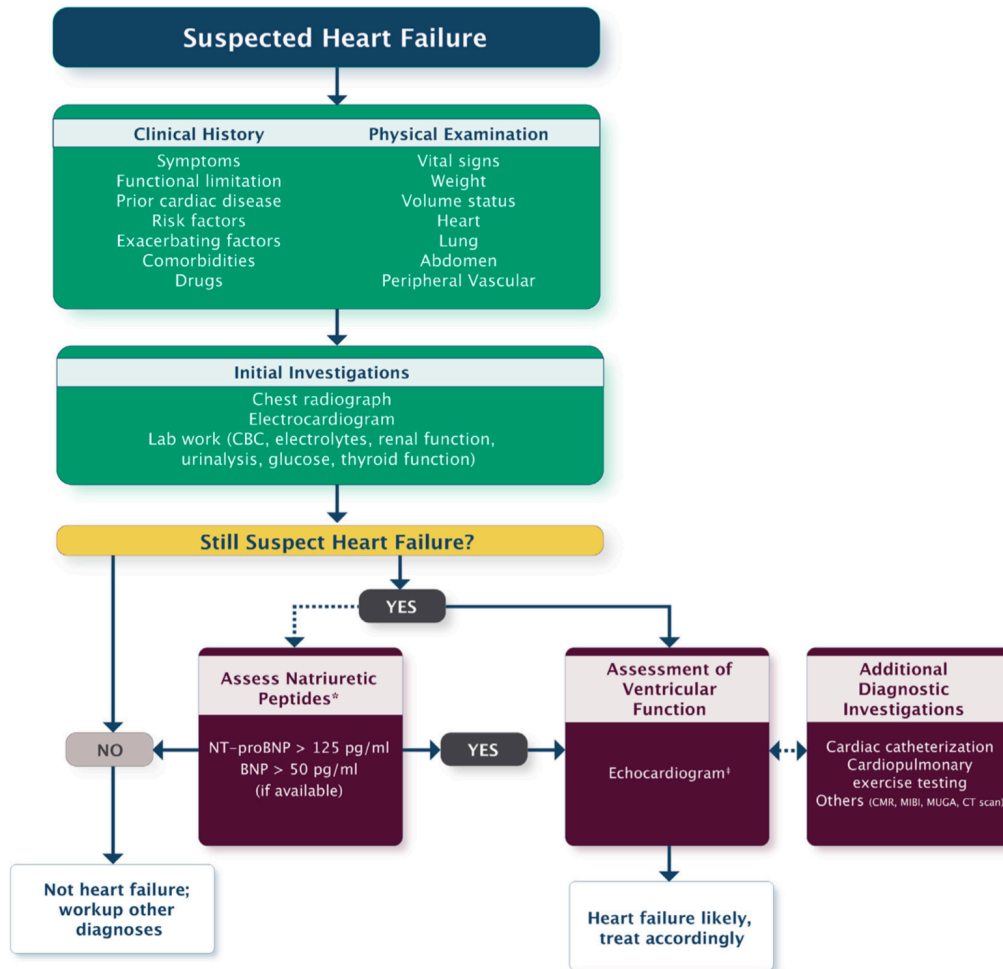
Tableau 1. – Classification fonctionnelle NYHA et description de leurs symptômes

Classe	Définition	Autre description
I	Aucun symptôme	Asymptomatique
II	Symptômes avec activité ordinaire	Symptômes légers
III	Symptômes avec diminution de l'activité ordinaire	Symptômes modérés
IV	Symptômes au repos ou pour une activité minime	Symptômes sévères

Ainsi, cette classification permet de grader la sévérité des patients souffrant d'IC. De plus, la mesure du peptide cérébral natriurétique est utile, car de faibles concentrations permettent d'exclure l'IC et que des concentrations élevées peuvent confirmer l'IC chez les patients présentant une dyspnée lorsque le diagnostic clinique reste incertain^{16,17}.

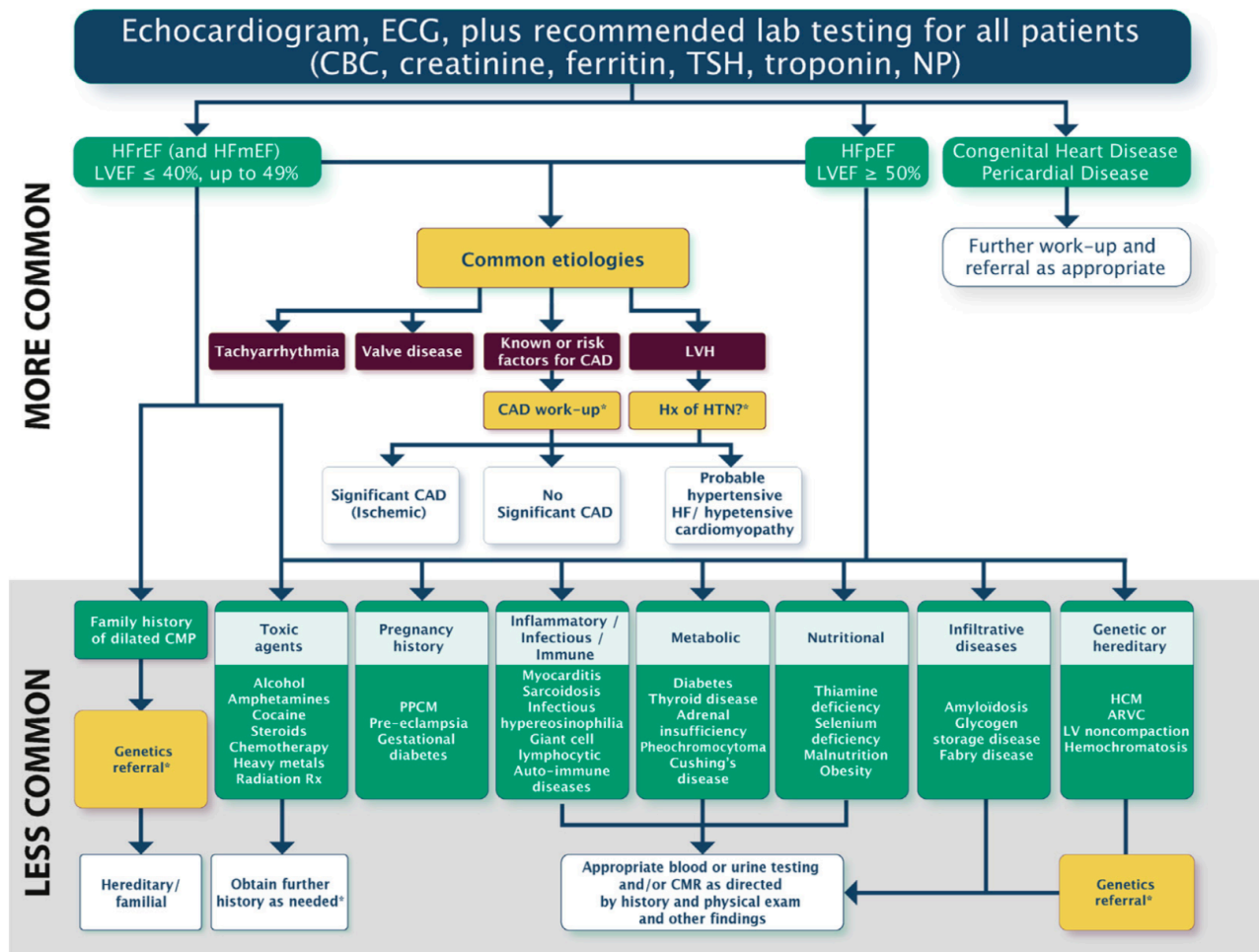
L'échocardiographie bidimensionnelle et l'échographie-doppler trans-thoracique est la technique d'imagerie initiale chez les patients soupçonnés d'insuffisance cardiaque parce qu'elle permet l'évaluation de la fonction ventriculaire systolique et diastolique, l'épaisseur de la paroi ventriculaire, la taille des cavités cardiaques, la présence de dysfonction valvulaire et l'atteinte péricardique.¹⁸ Une échocardiographie de contraste ou une angiographie pourraient être utiles chez les patients pour lesquels les images écho-cardiographiques sont de mauvaise qualité. Le cathétérisme cardiaque avec mesures hémodynamiques et ventriculographie de contraste, tomodensitométrie (TDM) et la résonance magnétique cardiaque (IRM) peuvent être utilisés lorsque les autres tests non invasifs sont peu concluants et peuvent être nécessaires pour la détection de cardiomyopathies spécifiques.

Figure 1. – *Algorithme décisionnel pour le diagnostic d'IC*



(tiré de Ezekowitz et al. 2017 CCS HF Guidelines Update)

Figure 2. – Guide diagnostique de l'étiologie de l'IC



(tiré de Ezekowitz et al. 2017 CCS HF Guidelines Update)

1.4. Épidémiologie et étiologie

La prévalence de l'IC est très importante, variant en fonction des définitions entre 1-2% de la population adulte dans les pays développés, pouvant atteindre > 10% chez les patients de plus de 70 ans¹⁹⁻²². Au Canada, la prévalence de la maladie est estimée à près de 600000 cas, avec plus de 50000 nouveaux cas recensés par an. Chaque année, 22000 Canadiens décèdent d'IC.

La survie des patients symptomatiques est de 50% à 5 ans et 80% à 1 an chez les insuffisants cardiaques avancés.^{8, 19} Le risque d'IC à l'âge de 55 ans est de 33% pour les hommes et 28% pour les femmes.²²

Son étiologie est diverse variant en fonction de l'individu et des régions du monde. Il n'existe pas à l'heure actuelle une seule classification des causes d'IC. Nous pouvons cependant nous baser sur la [Tableau 2](#).

Tableau 2. – Étiologies de l'IC

DISEASED MYOCARDIUM		
Ischaemic heart disease	Myocardial scar	
	Myocardial stunning/hibernation	
	Epicardial coronary artery disease	
	Abnormal coronary microcirculation	
	Endothelial dysfunction	
Toxic damage	Recreational substance abuse	Alcohol, cocaine, amphetamine, anabolic steroids.
	Heavy metals	Copper, iron, lead, cobalt.
	Medications	Cytostatic drugs (e.g. anthracyclines), immunomodulating drugs (e.g. interferons monoclonal antibodies such as trastuzumab, cetuximab), antidepressant drugs, antiarrhythmics, non-steroidal anti-inflammatory drugs, anaesthetics.
	Radiation	
Immune-mediated and inflammatory damage	Related to infection	Bacteria, spirochaetes, fungi, protozoa, parasites (Chagas disease), rickettsiae, viruses (HIV/AIDS).
	Not related to infection	Lymphocytic/giant cell myocarditis, autoimmune diseases (e.g. Graves' disease, rheumatoid arthritis, connective tissue disorders, mainly systemic lupus erythematosus), hypersensitivity and eosinophilic myocarditis (Churg–Strauss).
Infiltration	Related to malignancy	Direct infiltrations and metastases.
	Not related to malignancy	Amyloidosis, sarcoidosis, haemochromatosis (iron), glycogen storage diseases (e.g. Pompe disease), lysosomal storage diseases (e.g. Fabry disease).
Metabolic derangements	Hormonal	Thyroid diseases, parathyroid diseases, acromegaly, GH deficiency, hypercortisolaemia, Conn's disease, Addison disease, diabetes, metabolic syndrome, pheochromocytoma, pathologies related to pregnancy and peripartum.
	Nutritional	Deficiencies in thiamine, L-carnitine, selenium, iron, phosphates, calcium, complex malnutrition (e.g. malignancy, AIDS, anorexia nervosa), obesity.
Genetic abnormalities	Diverse forms	HCM, DCM, LV non-compaction, ARVC, restrictive cardiomyopathy (for details see respective expert documents), muscular dystrophies and laminopathies.
ABNORMAL LOADING CONDITIONS		
Hypertension		
Valve and myocardium structural defects	Acquired	Mitral, aortic, tricuspid and pulmonary valve diseases.
	Congenital	Atrial and ventricular septum defects and others (for details see a respective expert document).
Pericardial and endomyocardial pathologies	Pericardial	Constrictive pericarditis Pericardial effusion
	Endomyocardial	HES, EMF, endocardial fibroelastosis.
High output states		Severe anaemia, sepsis, thyrotoxicosis, Paget's disease, arteriovenous fistula, pregnancy.
Volume overload		Renal failure, iatrogenic fluid overload.
ARRHYTHMIAS		
Tachyarrhythmias		Atrial, ventricular arrhythmias.
Bradyarrhythmias		Sinus node dysfunctions, conduction disorders.

ARVC = arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy; DCM = dilated cardiomyopathy; EMF = endomyocardial fibrosis; GH = growth hormone; HCM = hypertrophic cardiomyopathy; HES = hypereosinophilic syndrome; HIV/AIDS = human immunodeficiency virus/acquired immune deficiency syndrome; LV = left ventricular.

(tiré de Ezekowitz et al. 2017 CCS HF Guidelines Update)

De nombreux patients présentant une IC et une maladie ischémique ont une histoire d'IAM ou de revascularisation. Cependant, une angiographie coronaire normale n'exclue pas une cicatrice myocardique (ex par RMN) ou une microcirculation coronaire altérée. L'amélioration des traitements et de la prise en charge de l'IC sur les trois dernières décennies a permis une augmentation de la survie et une réduction de la durée d'hospitalisation des patients avec ICFEr. Le taux de mortalité à 1 an chez les patients stables ou ambulatoires est de 7% comparé à 17% chez les patients hospitalisés. Les causes de décès sont essentiellement dues aux maladies cardiovasculaires, comme la mort subite ou la progression de l'IC. Les taux de mortalité sont généralement plus élevés en cas d'ICFEr que d'ICFEp.^{23, 24}

A 12 mois, le taux d'hospitalisation est de 32% et 44% respectivement.²³ Les causes sont généralement liées à des pathologies non cardiovasculaires, particulièrement chez les ICFEp. Bien que les hospitalisations pour causes cardiaques n'aient que peu évolué sur la dernière décennie, celles pour causes non-cardiaques ont augmenté.²⁵

1.5. Physiopathologie de l'IC

La contractilité cardiaque (force et vitesse de contraction), la performance ventriculaire et les besoins en oxygène du myocarde sont déterminés par cinq éléments essentiels:

- La précharge
- La post-charge
- La disponibilité des substrats (p. ex., O₂, acides gras libres, glucose)
- La fréquence et le rythme cardiaques
- La quantité de myocarde viable

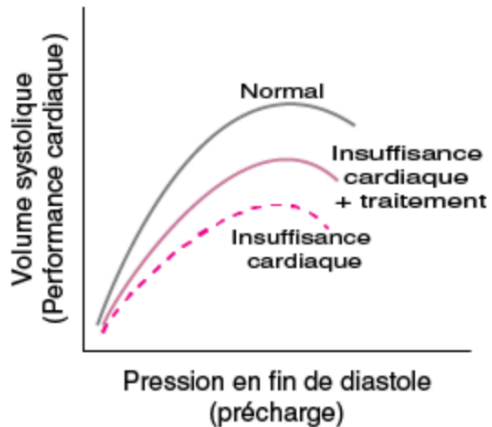
Le **débit cardiaque** est le produit du volume systolique par la fréquence cardiaque; il est également affecté par le retour veineux, le tonus vasculaire périphérique et les facteurs neurohormonaux.

La **pré-charge** représente les conditions de charge du cœur à la fin de sa phase de relaxation et de remplissage (diastole), juste avant la contraction (systole). La précharge représente le degré d'étirement de la fibre en télédiastole et le volume télédiastolique, qui est lui-même influencé par la pression diastolique ventriculaire et la structure de la paroi myocardique. Typiquement, la pression ventriculaire gauche, télédiastolique, en particulier si elle est augmentée, est une mesure fiable de la précharge. La dilatation et l'hypertrophie du ventricule gauche, les modifications de la capacité de distension du myocarde (compliance) influencent la précharge.

La **post-charge** est la force de résistance que doit surmonter la contraction des fibres du myocarde au début de la systole. Elle est déterminée par la pression intracavitaire, le rayon et l'épaisseur de la paroi au moment de l'ouverture de la valvule aortique. Cliniquement, la PA systémique à l'ouverture de la valvule aortique ou peu après est corrélée au pic de contrainte de la paroi systolique et se rapproche de la post-charge.

Le **principe de Frank-Starling** décrit la relation entre la précharge et la performance cardiaque. Il établit que, dans des conditions normales, la performance systolique contractile (représentée par le volume systolique ou le débit cardiaque) est proportionnelle à la précharge dans des conditions physiologiques. La contractilité est difficile à évaluer cliniquement (car elle nécessite un cathétérisme cardiaque avec analyse pression-volume mais est raisonnablement reflétée par la fraction d'éjection, qui est la fraction du volume télédiastolique éjecté à chaque contraction (volume systolique/volume télédiastolique). La fraction d'éjection peut généralement être évaluée de manière adéquate de façon non invasive par l'échocardiographie, l'imagerie nucléaire, ou l'IRM.

Figure 3. – Principe de Frank-Starling



La **réserve cardiaque** est la capacité du cœur à augmenter sa performance au-delà des niveaux de repos en réponse à un stress psychologique ou un effort physique; la consommation corporelle en O₂ peut augmenter de 250 à ≥ 1500 mL/min au cours d'un effort maximal. Les mécanismes comprennent l'augmentation de la fréquence cardiaque, des volumes systolique et diastolique, du volume systolique et de l'extraction tissulaire de l'O₂ (la différence entre la concentration en O₂ du sang artériel et du sang veineux mixte ou de l'artère pulmonaire). Chez l'adulte jeune bien entraîné, au cours d'un exercice d'intensité maximale, la fréquence cardiaque peut augmenter de 55 à 70 battements/minute initialement jusqu'à 180 battements/minute et le débit cardiaque peut passer de 6 à ≥ 25 L/min. Au repos, le sang artériel contient environ 18 mL d'O₂/dL de sang, et le sang veineux mêlé ou l'artère pulmonaire contiennent environ 14 mL/dL. L'extraction de l'O₂ est donc d'environ 4 mL/dL. Quand la demande augmente, elle peut atteindre 12 à 14 mL/dL. Ce mécanisme permet également de compenser la réduction du flux sanguin vers les tissus due à l'insuffisance cardiaque.

Dans l'IC, le cœur peut ne pas apporter aux tissus suffisamment de sang pour les besoins métaboliques, et l'augmentation des pressions veineuses pulmonaire ou systémiques pulmonaires secondaires au dysfonctionnement cardiaque peut induire une congestion d'organe. Ce trouble peut être la conséquence d'anomalies de la fonction systolique ou diastolique ou, souvent, des deux. Bien que l'anomalie primitive consistant en une modification de la fonction cardiomyocytaire, des modifications du turnover du collagène de la matrice extracellulaire peuvent également être en cause. Des anomalies cardiaques structurelles (p. ex., anomalies congénitales, valvulopathies), des troubles du rythme (y compris les fréquences cardiaques

chroniquement élevées), et des contraintes métaboliques élevées (p. ex., dues à une thyrotoxicose) peuvent également causer une insuffisance cardiaque.

1.5.1. Insuffisance cardiaque à FE réduite

Dans l'ICFEr (également appelée insuffisance cardiaque systolique), la dysfonction systolique globale du VG prédomine. Le ventricule se contracte et se vide mal, entraînant une augmentation du volume et de la pression diastolique et une diminution de la fraction d'éjection. Nombre de troubles de l'utilisation des réserves énergétiques, de l'apport en substrats énergétiques, des fonctions électro physiologiques et d'interaction entre les éléments contractiles, existent et sont associés à des troubles de la modulation intracellulaire du Ca^{2+} et de la production de l'AMPc. Une dysfonction systolique prédominante est fréquente dans en cas d'IC due à un IDM, à une myocardite, ou à une cardiomyopathie dilatée. La dysfonction systolique peut affecter principalement le ventricule gauche ou le ventricule droit; l'insuffisance ventriculaire gauche est souvent associée à une insuffisance ventriculaire droite.

1.5.2. Insuffisance cardiaque à FE préservée

Dans l'ICFEp (également connue sous le nom d'insuffisance cardiaque diastolique), le remplissage du ventricule gauche est altéré, ce qui entraîne une augmentation de la pression de fin de diastole du ventricule gauche au repos ou à l'effort. La contractilité globale et donc la FE restent normales. Chez la majeure partie des patients qui ont une insuffisance cardiaque avec fraction d'éjection préservée, le volume télé-diastolique est normal. Cependant, chez certains patients, une réduction marquée du remplissage du VG peut entraîner une insuffisance du volume télé diastolique du ventricule gauche et entraîner des symptômes de bas débit cardiaque ainsi que des symptômes systémiques. Des pressions auriculaires gauches élevées peuvent entraîner une hypertension artérielle pulmonaire et une congestion pulmonaire.

Le dysfonctionnement diastolique provient habituellement de l'altération de la relaxation ventriculaire (qui est un processus actif), d'une augmentation de la raideur ventriculaire, d'une péricardite constrictive ou d'une sténose de la valvule mitrale. L'IAM est également une cause de dysfonctionnement diastolique. Cette résistance au remplissage augmente avec l'âge et reflète une perte de cardiomyocytes et une dysfonction des cardiomyocytes et l'augmentation des dépôts de collagène interstitiel; ainsi le dysfonctionnement diastolique est particulièrement fréquent chez les personnes âgées. Le dysfonctionnement diastolique est prédominant dans les

cardiomyopathies hypertrophiques, les hypertrophies ventriculaires secondaires (p. ex., HTA, rétrécissement aortique évolué), et en cas d'infiltration amyloïde du myocarde. Le remplissage et la fonction du ventricule gauche peuvent également être compromis si des augmentations importantes de la pression ventricule droit déplacent le septum interventriculaire vers les cavités gauches (septum paradoxal).

Le dysfonctionnement diastolique est plus en plus reconnu comme une cause d'IC. Les estimations varient, mais environ 50% des patients qui ont une insuffisance cardiaque avec fraction d'éjection préservée; la prévalence augmente avec l'âge et en cas de diabète. On sait maintenant que l'ICFEp est un syndrome systémique complexe, hétérogène, multi organique, souvent avec de multiples pathophysiologies concomitantes. Les données actuelles suggèrent que plusieurs comorbidités (p. ex., obésité, hypertension, diabète, maladie rénale chronique) entraînent une inflammation systémique, un dysfonctionnement endothélial extensif, un dysfonctionnement microvasculaire cardiaque et, enfin, des modifications moléculaires cardiaques qui provoquent une aggravation de la fibrose myocardique et une rigidification ventriculaire. Ainsi, bien que l'ICFEr soit typiquement associée à une lésion myocardique primitive, l'ICFEp peut être associée à une lésion myocardique secondaire due à des anomalies à la périphérie.

1.5.3. Insuffisance du VG

Dans l'insuffisance cardiaque due à une insuffisance VG le débit cardiaque diminue et la pression veineuse pulmonaire augmente. Lorsque la pression capillaire pulmonaire dépasse la pression oncotique des protéines plasmatiques (environ 24 mmHg), le liquide fuit des capillaires à l'espace interstitiel et aux alvéoles, réduisant la compliance pulmonaire et augmentant le travail respiratoire. Le drainage lymphatique augmente mais ne peut compenser l'augmentation des liquides pulmonaires. Une accumulation importante des liquides dans les alvéoles (œdème du poumon) modifie significativement les relations ventilation/perfusion (V/Q): du sang artériel pulmonaire désoxygéné passe dans des alvéoles mal ventilées, diminuant l'oxygénation artérielle systémique (Pao₂) et cause une dyspnée. Cependant, la dyspnée peut survenir avant les anomalies V/Q, probablement du fait d'une pression veineuse pulmonaire élevée et de l'augmentation du travail respiratoire; le mécanisme précis est peu clair.

Dans l'insuffisance VG sévère ou chronique, des épanchements pleuraux se développent généralement, aggravant encore la dyspnée. La ventilation-minute augmente; ainsi, la PaCO₂

diminue et le pH sanguin augmente (alcalose respiratoire). Un œdème interstitiel important des bronchioles peut perturber la ventilation, élevant la PaCO₂, un signe de défaillance respiratoire imminente.

1.5.4. Insuffisance du VD

Dans l'IC dues à la dysfonction ventriculaire droite, la pression veineuse systémique augmente, entraînant l'extravasation du liquide et un œdème conséquent, principalement dans les tissus dépendants (pieds et chevilles des patients ambulatoires) et dans les viscères abdominaux. Le foie est le plus gravement touché, mais l'estomac et l'intestin sont également congestionnés; une accumulation de liquide dans la cavité péritonéale (ascite) peut se produire. Une défaillance ventriculaire droite provoque fréquemment une insuffisance hépatique modérée, avec des augmentations habituellement modestes de la bilirubine conjuguée et non, du TQ, et des enzymes hépatiques (en particulier phosphatase alcaline PAL et gamma-glutamyl transpeptidase GGT). Le foie congestif catabolise moins d'aldostérone, celle-ci contribue à l'accumulation de liquide. La congestion veineuse chronique dans les viscères peut entraîner une anorexie, une malabsorption des nutriments et des médicaments, une entéropathie avec perte de protéines (entéropathie exsudative) (caractérisée par une diarrhée et une hypoalbuminémie importante), une hémorragie digestive chronique et rarement une ischémie mésentérique.

1.5.5. Réponse cardiaque

Dans l'ICFEr, la fonction systolique ventriculaire gauche est gravement réduite; par conséquent, une précharge plus élevée est nécessaire au maintien du débit cardiaque. Par conséquent, les ventricules sont remodelés avec le temps: le ventricule gauche devient moins ovoïde et plus sphérique, se dilate et s'hypertrophie; le ventricule droit se dilate et peut s'hypertrophier. Initialement compensatoires, ces modifications finissent par augmenter la raideur diastolique et la tension de la paroi (c'est-à-dire, que se développe un dysfonctionnement diastolique), mettant en jeu la performance cardiaque, en particulier pendant un effort physique. L'augmentation de la tension sur la paroi accroît les besoins en O₂ et accélère l'apoptose (mort cellulaire programmée) des cellules du myocarde. La dilatation des ventricules peut également provoquer une régurgitation valvulaire mitrale ou tricuspide (due à une dilatation annulaire) avec de nouvelles hausses des volumes télédiastoliques.

1.5.6. Réponses hémodynamiques

Avec la réduction du débit cardiaque, la distribution tissulaire de l'O₂ est maintenue par l'augmentation de l'extraction d'O₂ et parfois en déplaçant la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine (Courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine.) vers la droite pour favoriser la libération de l'O₂.

La réduction du débit cardiaque avec baisse de la pression artérielle systémique active les baroréflexes artériels, ce qui augmente le tonus sympathique et diminue le tonus parasympathique. Par conséquent, la fréquence cardiaque et la contractilité myocardique augmentent, les artéριοles dans certains territoires vasculaires réduisent leur calibre, une veinoconstriction apparaît et le Na⁺ et l'eau sont retenus. Ces modifications compensent la baisse de la fonction ventriculaire et permettent de maintenir l'homéostasie hémodynamique dans les stades précoces de l'insuffisance cardiaque. Cependant, ces modifications compensatoires augmentent le travail cardiaque, la précharge et la post-charge; réduisent la perfusion coronaire et rénale; provoquent une accumulation de liquide provoquant une congestion; augmentent l'excrétion du K⁺; et peuvent provoquer une nécrose des cardiomyocytes et des troubles du rythme.

1.5.7. Réponses rénales

Lorsque la fonction cardiaque se détériore, le débit sanguin rénal diminue (en raison du bas débit cardiaque). En outre, les pressions veineuses rénales augmentent, conduisant à une congestion veineuse rénale. Ces modifications aboutissent à une diminution du flux sanguin rénal et du taux de filtration glomérulaire et le flux sanguin est redistribué dans le rein. La fraction de filtration et le Na⁺ filtré diminuent, mais la réabsorption tubulaire augmente, engendrant une rétention de Na⁺ et d'eau. Le flux sanguin est ultérieurement redistribué vers les territoires extrarénaux à l'effort, mais le flux sanguin rénal s'améliore au repos.

La diminution de la perfusion rénale (et une possible diminution de l'étirement artériel systolique secondaire au déclin de la fonction ventriculaire) active le système rénine-angiotensine-aldostérone, augmentant la rétention d'eau et de Na⁺ et le tonus vasculaire périphérique et rénal. Ces effets sont amplifiés par l'augmentation de l'activité sympathique intense associée à l'insuffisance cardiaque.

Le système rénine-angiotensine-aldostérone-vasopressine (hormone antidiurétique [ADH]) entraîne une cascade d'effets potentiellement délétères. L'angiotensine II aggrave l'insuffisance

cardiaque par vasoconstriction, dont une vasoconstriction rénale efférente et par augmentation de la production d'aldostérone, qui augmente la réabsorption du Na^+ dans le néphron distal et entraîne également un dépôt myocardique et vasculaire collagène cellulaire et de la fibrose. L'angiotensine II augmente la libération de noradrénaline, stimule la libération de vasopressine, et déclenche l'apoptose. On peut considérer que l'angiotensine II serait impliquée dans l'hypertrophie des parois vasculaires et du myocarde, contribuant ainsi au remodelage du cœur et des vaisseaux périphériques et à l'aggravation potentielle de l'insuffisance cardiaque. L'aldostérone peut être synthétisée dans le cœur et les vaisseaux indépendamment de l'angiotensine II (peut-être médiée par la corticotrophine, l'oxyde nitrique, les radicaux libres et d'autres stimuli) et elle peut présenter des effets délétères dans ces organes. L'IC qui provoque un dysfonctionnement rénal progressif (qui comprend le dysfonctionnement rénal provoqué par les médicaments utilisés pour traiter l'insuffisance cardiaque) contribue à l'aggravation de l'insuffisance cardiaque et a été appelée syndrome cardio-rénal.

1.5.8. Réponses neuro-hormonales

Dans des conditions de stress, les réactions neuro-humorales améliorent la fonction cardiaque et peuvent maintenir la PA et la perfusion des organes, mais l'activation chronique de ces réponses est préjudiciable à l'équilibre normal entre les hormones de stimulation du myocarde et vasoconstrictrices et entre les hormones de relaxation du myocarde et vasodilatatrices.

Le cœur contient de nombreux récepteurs neuro-humoraux (α_1 , β_1 , β_2 , β_3 , angiotensine II de type 1 [AT1] et de type 2 [AT2], muscariniques, endothéline, sérotonine, adénosine, cytokine, peptides natriurétiques); le rôle de tous ces récepteurs n'est pas encore totalement défini. Chez le patient insuffisant cardiaque, les récepteurs β_1 (qui constituent 70% des récepteurs β cardiaques) voient leur nombre diminué (downregulation), probablement en réponse à une activation sympathique intense. Le résultat de cette down-régulation est une baisse de la contractilité des myocytes et augmentation du rythme cardiaque.

Les taux plasmatiques de noradrénaline sont augmentés, reflétant largement l'intense stimulation nerveuse sympathique, les taux plasmatiques d'adrénaline n'étant pas augmentés. Les effets nuisibles comprennent une vasoconstriction avec augmentation de la pré-charge et de la post-charge, des lésions myocardiques directes dont l'apoptose, une réduction du flux sanguin rénal et l'activation d'autres systèmes neuro-humoraux dont la cascade rénine-angiotensine-aldostérone-vasopressine.

La vasopressine est libérée en réponse à une chute de PA via différents stimuli neuro-hormonaux. L'augmentation de la vasopressine diminue l'excrétion rénale d'eau libre, pouvant contribuer à l'hyponatrémie de l'insuffisance cardiaque. Les taux de vasopressine dans l'insuffisance cardiaque avec une PA normale varient.

Le peptide natriurétique atrial est libéré en réponse à une augmentation du volume et de la pression auriculaire; le peptide natriurétique cérébral (type B) (BNP) est sécrété par le ventricule en réponse à l'élongation pariétale ventriculaire. Ces peptides augmentent l'excrétion rénale de Na, mais, chez les insuffisants cardiaques, cet effet est annulé par la diminution (down-regulation) de la pression de perfusion rénale, par la diminution des récepteurs et peut-être par l'augmentation de la dégradation enzymatique de ces molécules. En outre, des taux élevés de peptides natriurétiques exercent un effet contre-régulateur sur le système rénine-angiotensine-aldostérone et sur la stimulation des catécholamines.

Du fait du dysfonctionnement endothélial présent dans l'insuffisance cardiaque, les vasodilatateurs endogènes (p. ex., oxyde nitrique, prostaglandines) sont produits en moins grande quantité, alors que plus de vasoconstricteurs endogènes (p. ex., endothéline) sont sécrétés, ce qui augmente la post-charge.

L'insuffisance du cœur et d'autres organes produit du tumor necrosis factor (TNF)- α . Cette cytokine augmente le catabolisme et est probablement responsable de la cachexie cardiaque (perte de masse maigre $\geq 10\%$), qui peut accompagner une insuffisance cardiaque cliniquement sévère et d'autres modifications nuisibles. Le cœur défaillant subit également des modifications métaboliques avec l'utilisation accrue d'acides gras libres et diminution de l'utilisation du glucose; ces modifications peuvent devenir des cibles thérapeutiques.

1.5.9. Modifications liées au vieillissement

Les modifications liées à l'âge du cœur et du système cardiovasculaire abaissent le seuil d'expression de l'insuffisance cardiaque. Le collagène interstitiel situé au sein du myocarde augmente, le raidit, ce qui prolonge la relaxation du myocarde. Ces modifications induisent une réduction significative de la fonction diastolique ventriculaire gauche, même chez les personnes âgées en bonne santé. Une baisse modeste de la fonction systolique se produit également avec le vieillissement. La diminution liée à l'âge de la réactivité du myocarde et des vaisseaux à la

stimulation β -adrénergique diminue encore la capacité du système cardiovasculaire à répondre aux demandes de travail accrues.

Il résulte de ces modifications, une diminution significative de la capacité d'exercice de crête (environ 8%/décennie après l'âge de 30 ans). Le débit cardiaque en exercice de pointe diminue plus modestement. Ce déclin peut être ralenti par un exercice physique régulier. Ainsi, les patients âgés sont plus enclins que les jeunes à développer des symptômes d'insuffisance cardiaque en réponse aux stress dus à des troubles systémiques ou à des lésions cardiovasculaires relativement modestes. Les facteurs de stress comprennent les infections (en particulier la pneumonie), l'hyperthyroïdie, l'anémie, l'HTA, l'ischémie myocardique, l'hypoxie, l'hyperthermie, l'insuffisance rénale, les apports liquidiens périopératoires par voie IV, la non-observance des protocoles thérapeutiques ou des régimes à faible teneur en sel, et l'utilisation de certains médicaments (en particulier les AINS).

1.6. Symptomatologie

Les manifestations varient en fonction de la mesure dans laquelle le ventricule gauche et le ventricule droit sont initialement affectés. La gravité clinique varie significativement et est habituellement classée selon le système de la New York Heart Association (NYHA).

Les symptômes de l'IC sont souvent peu spécifiques et difficiles à discriminer des autres causes de maladies.²⁶⁻³⁰ Les signes de l'IC dues à une rétention hydrique répondent généralement bien aux traitements par diurétiques. Ces signes peuvent être plus difficiles à interpréter chez les patients obèses, en âgés ou en insuffisance respiratoire chronique.³¹⁻³³ Chez les patients plus jeunes en IC, la présentation clinique, l'étiologie et les signes sont souvent différents des patients plus âgés.^{34, 35}

Tableau 3. – Symptômes et signes d’IC

Symptômes	Signes
Typique	Plus spécifique
Dyspnée	Augmentation de la pression jugulaire veineuse
Orthopnée	Reflux hépatojugulaire
Dyspnée paroxystique nocturne	Rythme de galop
Réduction de la tolérance à l’effort	Auscultation apical déplacé latéralement
Fatigue, temps de récupération plus long	
Gonflement des chevilles	
Moins typique	Moins spécifique

Toux nocturne	Gain de poids (>2kg)
Sifflement	Perte de poids (dans IC avancée)
Sentiment de gonflement	Cachexie
Perte d'appétit	Œdème périphérique
Asthénie	Crépitations pulmonaires
Dépression	Tachycardies
Palpitations	Tachypnée
Syncopes	Arythmie
	Respiration Cheyne-Stokes
	Hépatomégalie
	Ascite
	Oligurie
	Extrémités froides

L'IC ayant un éventail de sévérité très large, certains experts suggèrent de subdiviser la classe NYHA III en IIIA ou IIIB. La classe IIIB est généralement réservée aux patients qui ont récemment eu une exacerbation de l'insuffisance cardiaque. L'American College of Cardiology/American Heart Association (ACC/AHA) a préconisé un système de classification par stade de l'insuffisance cardiaque (A, B, C ou D) pour mettre en évidence le besoin de prévention de l'insuffisance cardiaque.

A: Risque élevé d'insuffisance cardiaque mais pas d'anomalies ou de symptômes cardiaques structurels ou fonctionnels

B: Anomalies cardiaques structurales ou fonctionnelles mais sans symptôme d'insuffisance cardiaque

C: Maladie cardiaque structurale avec symptômes d'insuffisance cardiaque

D: insuffisance cardiaque réfractaire nécessitant des thérapies avancées (p. ex., soutien circulatoire mécanique, transplantation cardiaque) ou des soins palliatifs

Une grave insuffisance du ventricule gauche peut provoquer un œdème pulmonaire ou un choc cardiogénique.

1.6.1. Anamnèse

Une anamnèse détaillée doit systématiquement être obtenue. Le diagnostic d'IC est inhabituel chez les patients sans antécédents médicaux, notamment d'IAM. ^{26-28, 30}

Dans les insuffisances du ventricule gauche, les symptômes les plus fréquents sont la dyspnée et la fatigue due à l'augmentation des pressions veineuses pulmonaires et au bas débit cardiaque (au repos ou l'incapacité à augmenter le débit cardiaque à l'effort). La dyspnée se produit habituellement pendant l'effort et est soulagée par le repos. Au fur et à mesure que l'insuffisance cardiaque s'aggrave, la dyspnée peut survenir pendant le repos et la nuit, entraînant parfois une toux nocturne. Une dyspnée survenant immédiatement ou précocement après passage en position allongée et soulagée rapidement par la position assise (orthopnée) est fréquente. Dans la dyspnée paroxystique nocturne, la dyspnée réveille le patient plusieurs heures après qu'il se soit couché et n'est soulagée qu'après qu'il se soit assis pendant 15 à 20 min. Dans les formes d'insuffisance cardiaque sévère, des cycles périodiques de respiration (respiration de Cheyne-Stokes, une brève période d'augmentation de la respiration [hyperpnée] suivie d'une brève période de pause respiratoire [apnée]), peut apparaître pendant la journée ou la nuit; la phase soudaine hyperapnéique peut réveiller le patient. La respiration de Cheyne-Stokes diffère de la dyspnée paroxystique nocturne en ce que la phase hyperapnéique est courte, elle ne dure que 10 à 15 s, mais le cycle réapparaît régulièrement, durant 30 s à 2 min. Une dyspnée paroxystique nocturne est associée à une congestion pulmonaire et à une respiration de Cheyne-Stokes avec bas débit cardiaque. Les troubles respiratoires liés au sommeil, tels que le syndrome d'apnée du sommeil sont fréquents dans l'insuffisance cardiaque et peuvent l'aggraver. Une réduction sévère du flux sanguin cérébral et une hypoxémie sévère peuvent entraîner une irritabilité chronique et altérer les performances intellectuelles. Dans l'insuffisance ventriculaire droite, les symptômes les plus fréquents sont les œdèmes malléolaires et l'asthénie. Parfois, le patient ressent une sensation de pesanteur dans l'abdomen ou le cou. Une congestion hépatique peut entraîner une douleur de l'hypochondre droit (hépatalgie) et une congestion de l'estomac et de l'intestin peut entraîner une satiété précoce, une anorexie et un météorisme. Les symptômes moins spécifiques de l'insuffisance cardiaque comprennent des extrémités froides, des lipothymies posturales, une

nycturie et une oligurie diurne. Un amaigrissement musculaire squelettique (amyotrophie) peut être observé dans l'insuffisance biventriculaire sévère et peut refléter une diminution de l'activité physique, mais également une augmentation du catabolisme associée à une augmentation de la production de cytokines. Une perte importante de poids (cachexie cardiaque) est un signe défavorable en rapport avec une mortalité élevée. Chez les personnes âgées, les plaintes peuvent être atypiques se présentant, comme un syndrome confusionnel, des chutes, un soudain déclin fonctionnel, une incontinence urinaire nocturne, ou des troubles du sommeil. Des troubles cognitifs et une dépression coexistante peuvent également influencer l'évaluation et les interventions thérapeutiques et ils peuvent être aggravés par l'insuffisance cardiaque.

1.6.2. Examen

L'examen général peut détecter des signes de troubles systémiques ou cardiaques qui causent ou aggravent une insuffisance cardiaque (p. ex., anémie, hyperthyroïdie, alcoolisme, hémochromatose, fibrillation auriculaire avec rapide, insuffisance mitrale).

Une tachycardie et une tachypnée peuvent se produire dans l'insuffisance ventriculaire gauche. Le patient qui présente une grave insuffisance du ventricule gauche peut sembler franchement dyspnéique ou cyanosé, hypotendu et confus ou agité du fait de l'hypoxie et de la mauvaise perfusion cérébrale. Certains de ces symptômes plus spécifiques (p. ex., confusion) sont plus fréquents chez les personnes âgées.

La cyanose centrale (affectant tout le corps, dont les parties chaudes telles que la langue et les muqueuses) reflète une hypoxémie sévère. La cyanose périphérique des lèvres, des doigts et des orteils reflète un flux sanguin bas avec augmentation de l'extraction de l'O₂. Si un massage vigoureux améliore la couleur du lit unguéal, la cyanose peut être périphérique; l'augmentation du flux sanguin local n'améliore pas la couleur si la cyanose est centrale.

Les signes cliniques cardiaques de l'IC avec fraction d'éjection réduite comprennent un élargissement du choc de pointe, qui est déplacé vers la gauche; un 3e (B3) et 4e (B4) bruit du cœur audible et parfois palpable et une composante pulmonaire accentuée (P2) du 2e bruit (B2). Ces bruits cardiaques anormaux peuvent également se produire dans l'insuffisance cardiaque avec fraction d'éjection préservée. Un souffle pan systolique de régurgitation (insuffisance) mitrale à l'apex peut se produire dans l'ICFEr ou ICFEp. Les signes cliniques pulmonaires comprennent

des crépitements inspiratoires précoces des bases qui ne disparaissent pas en toussant et, en cas d'épanchement pleural, une matité à la percussion et une diminution du murmure vésiculaire aux bases pulmonaires.

Les signes de défaillance du VD sont un œdème périphérique non douloureux prenant le godet (une pression digitale laisse des empreintes visibles et palpables, parfois profondes) au niveau des pieds et des chevilles; un foie augmenté de volume et parfois pulsatile, palpable sous le rebord costal droit; un gonflement de l'abdomen et une ascite; et une élévation visible de la pression veineuse jugulaire, parfois avec de grandes ondes a ou v visibles même lorsque le patient est assis ou debout (Pouls veineux jugulaire normal.). De grandes ondes V dans les veines jugulaires indiquent généralement une régurgitation tricuspide significative qui est souvent présente dans l'insuffisance du ventricule droit. Une augmentation paradoxale de la pression veineuse jugulaire pendant l'inspiration (signe de Kussmaül) indique une insuffisance cardiaque droite et peut être observée dans l'insuffisance cardiaque, la cardiomyopathie restrictive, la péricardite constrictive et l'insuffisance tricuspide sévère. Dans les cas sévères de l'insuffisance cardiaque, les œdèmes périphériques peuvent s'étendre aux cuisses ou même au sacrum, au scrotum, au bas de la paroi abdominale et parfois encore plus haut. Un œdème grave de multiples zones est appelé une anasarque. L'œdème peut être asymétrique si le patient est préférentiellement couché sur le côté.

En cas de congestion hépatique, le foie peut être hypertrophié ou sensible à la palpation et un reflux hépatojugulaire ou abdominojugulaire peut être détecté (Veines du cou). La palpation du précordium permet de détecter le choc parasternal gauche de la dilatation ventriculaire droite et l'auscultation peut détecter le souffle d'insuffisance tricuspidiennne ou un B3 ventriculaire droit le long du bord gauche du sternum; ces deux signes augmentent à l'inspiration.

1.7. Diagnostic

La symptomatologie (p. ex., dyspnée d'effort et fatigue, orthopnée, œdème, tachycardie, râles crépitants pulmonaires, existence d'un B3, turgescence des jugulaires) suggère une insuffisance cardiaque mais n'est pas apparente au début. Des symptômes similaires peuvent être dus à une BPCO ou à des pneumonies récurrentes ou peuvent être attribués par erreur à l'âge ou à une obésité. La suspicion d'insuffisance cardiaque doit être élevée en cas d'antécédent d'infarctus

du myocarde, d'HTA ou de troubles ou de souffles valvulaires, et doit être modérée chez tout patient âgé ou diabétique.

Le bilan doit comprendre une radiographie du thorax, un électrocardiogramme et un test objectif de la fonction cardiaque, généralement une échocardiographie. Les examens sanguins, sauf le taux de peptide natriurétique de type B (BNP), ne sont pas utilisés pour le diagnostic mais sont utiles pour identifier la cause et les effets systémiques.

1.7.1. Radiographie de thorax

Les signes à la radiographie de thorax en faveur d'une insuffisance cardiaque comprennent un élargissement de la silhouette cardiaque, un épanchement pleural, la présence de liquide dans la grande scissure et des lignes horizontales dans la périphérie des bases pulmonaires (stries B de Kerley). Ces signes témoignent d'une élévation chronique de la pression auriculaire gauche et correspondent à l'épaississement chronique des septa intralobulaires du fait de l'œdème. Une congestion veineuse pulmonaire et interstitielle du lobe supérieur ou un œdème alvéolaire peuvent également être présents mais cet examen est plus utile en cas d'épisode aiguë que chronique.^{32, 36} L'examen attentif de la silhouette cardiaque sur un cliché de profil peut identifier une dilatation des cavités ventriculaires et auriculaires mais une dysfonction ventriculaire sévère peut être présente sans cardiomégalie à la radio de thorax.^{32, 36} Les radiographies peuvent également suggérer certains diagnostics (p. ex., BPCO, pneumonie, fibrose pulmonaire idiopathique, cancer du poumon).

1.7.2. Electrocardiogramme

Bien que peu spécifique, un électrocardiogramme (ECG) anormal, démontrant notamment des séquelles d'infarctus du myocarde, une hypertrophie ventriculaire gauche, un bloc de branche gauche ou une tachyarythmie (p. ex., fibrillation auriculaire rapide), augmente la suspicion d'insuffisance cardiaque et permet d'en identifier la cause.^{30, 36-38} Un ECG tout à fait normal demeure rare dans les insuffisances cardiaques chroniques (sensibilité de 89%)²⁷. Ainsi la réalisation d'un ECG est recommandée en routine dans le bilan d'IC.

1.7.3. Imagerie

L'échocardiographie demeure l'examen le plus utile afin d'évaluer les dimensions cavitaires, la fonction des valvules, la fraction d'éjection du VG, les anomalies de la cinétique pariétale, l'existence d'une hypertrophie du ventricule gauche, la fonction diastolique, la pression artérielle pulmonaire, les pressions de remplissage du VG et du VD, le fonctionnement du ventricule droit et un épanchement péricardique.³⁹⁻⁴⁷ Les thrombi intracardiaques, les tumeurs et les calcifications des valvules cardiaques, de l'anneau mitral et les anomalies de la paroi aortique peuvent être détectés. Des troubles de la cinétique segmentaire ou des anomalies localisées du mouvement pariétal suggèrent fortement une coronaropathie sous-jacente mais peuvent également être en rapport avec des foyers de myocardite. L'échocardiographie Doppler ou Doppler couleur détectent avec précision les valvulopathies et les shunts. L'association de l'évaluation Doppler de l'afflux mitral avec l'imagerie Doppler tissulaire de l'anneau mitral permet d'identifier et de quantifier le dysfonctionnement diastolique du VG et les pressions de remplissage du VG. La mesure de la fraction d'éjection du ventricule gauche permet de distinguer une insuffisance cardiaque avec fraction d'éjection préservée prédominant (fraction d'éjection $\geq 50\%$) et une insuffisance cardiaque avec fraction d'éjection réduite (fraction d'éjection $\leq 40\%$). Il est important de souligner à nouveau qu'une insuffisance cardiaque peut être observée avec une fraction d'éjection du ventricule gauche normale. L'échocardiographie de suivi (qui permet de détecter des signes fonctionnels systoliques infracliniques et des types spécifiques de dysfonctionnement myocardique) peut devenir importante, mais elle n'est actuellement disponible que dans les centres spécialisés.

La scintigraphie peut également permettre d'évaluer la fonction systolique et diastolique, les antécédents d'infarctus du myocarde et une ischémie ou une hibernation myocardiques inductibles.

L'IRM cardiaque produit des images précises des structures cardiaques et de plus en plus disponibles. Elle est l'examen de choix pour les mesures de masses, volumes et FE des deux ventricules. Il s'agit de la meilleure alternative pour les patients souffrant de défaillance droite et également pour les patients atteints d'anomalies congénitales complexes.⁴⁸⁻⁵⁰ L'IRM cardiaque est utile pour évaluer la cause de la maladie myocardique et pour détecter la fibrose myocardique focale et diffuse.^{48, 51} L'amylose cardiaque, la sarcoïdose, l'hémochromatose et la myocardite sont

des causes d'insuffisance cardiaque qui peuvent être détectées ou suspectées sur les résultats de l'IRM cardiaque.^{48, 51-53}

La **coronarographie ou la coronarographie TDM** est indiquée en cas de suspicion de coronaropathie ou lorsque l'étiologie de l'insuffisance cardiaque est incertaine.⁵⁴⁻⁵⁶ Elle est recommandée en cas d'angine de poitrine ne cédant pas au traitement médicamenteux.⁵⁷

Le cathétérisme cardiaque avec mesure des pressions intracardiaques (hémodynamique invasive) peut être utile au diagnostic des cardiomyopathies restrictives et de la péricardite constrictive. Les mesures hémodynamiques invasives sont également très utiles lorsque le diagnostic d'insuffisance cardiaque est équivoque, en particulier en cas d'insuffisance cardiaque avec fraction d'éjection préservée. De plus, perturber le fonctionnement du système cardiovasculaire (p. ex., tests d'effort, stimulation volémique, stimulations médicamenteuses [p. ex., nitroglycérine, nitroprussiate]) peut s'avérer très utile lors des tests hémodynamiques invasifs pour diagnostiquer l'insuffisance cardiaque.

La **biopsie endocardique** est parfois effectuée quand une cardiomyopathie infiltrante est fortement suspectée mais ne peut pas être confirmée par l'imagerie non invasive (p. ex., l'IRM cardiaque).

1.7.4. Analyse de sang

Les taux plasmatiques de peptide natriurétique cérébral (NP/BNP) sont souvent élevés dans l'insuffisance cardiaque; ces tests de routine peuvent être utiles lorsque les signes cliniques ne sont pas clairs ou que d'autres diagnostics (p. ex., BPCO) doivent être éliminés. Ils peuvent être particulièrement utiles en cas d'antécédents de pathologies pulmonaires et cardiaques. Le NT-pro-BNP, une fraction inactive produite par le clivage du pro-BNP, peut être utilisé de la même manière que le BNP. Cependant, un niveau normal de BNP n'exclut pas le diagnostic d'insuffisance cardiaque.^{58, 59} Dans l'ICFEP, 30% des patients ont un taux de BNP inférieur au seuil communément utilisé de 100 pg/mL. L'obésité, qui devient une comorbidité de plus en plus fréquente dans l'insuffisance cardiaque, est associée à une production réduite de BNP et à une clairance accrue du BNP.⁶⁰

Outre le BNP, les examens sanguins recommandés comprennent la numération de la formule sanguine, le dosage de la créatinine, de l'urée, l'ionogramme sérique (dont Mg^{2+} , Ca^{2+}),

de la glycémie, de l'albuminémie et le bilan hépatique. Les tests des fonctions thyroïdiennes sont recommandés en cas de fibrillation auriculaire et chez certains patients, en particulier chez les personnes âgées.

1.8. Pronostic

Généralement, le patient qui présente une insuffisance cardiaque a un mauvais pronostic, à moins que la cause ne soit corrigable. La survie à cinq ans après une hospitalisation pour insuffisance cardiaque est d'environ 35%, quelle que soit la fraction d'éjection du patient. Dans les formes chroniques d'insuffisance cardiaque, la mortalité dépend de la gravité des symptômes et du dysfonctionnement ventriculaire et varie entre 10 et 40%/an.

Les facteurs spécifiques de mauvais pronostic sont une hypotension, une fraction d'éjection basse, la présence d'une coronaropathie, une libération de troponine, une élévation de l'urée sérique, une réduction du taux de filtration glomérulaire, une hyponatrémie et une mauvaise capacité fonctionnelle (p. ex., mesurée par un test de marche de 6 min).

Le BNP, le NTproBNP, et les scores de risque tels que le MAGGIC Risk Score et le Seattle Heart Failure model, sont utiles pour prédire le pronostic des patients insuffisants cardiaques en tant que groupe global, bien qu'il y ait une variation significative de la survie entre les individus.^{24, 61-65}

L'IC implique généralement une détérioration graduelle, interrompue par des épisodes de décompensation sévère, et finalement la mort, bien que l'évolution soit allongée par les thérapies modernes. Cependant, la mort peut également être subite et inattendue, sans être précédée d'une aggravation des symptômes.

1.8.1. Soins de fin de vie

Il faut informer tous les patients et les membres de la famille de la progression de la maladie et du risque de mort subite cardiaque. Dans le cas de certains patients, il est également important d'améliorer la qualité de la vie que de la prolonger. Ainsi est-il important de connaître les volontés du patient, en matière de réanimation (p. ex., intubation endotrachéale et réanimation cardiorespiratoire) si son état physique se détériore, en particulier en cas d'insuffisance cardiaque

sévère. Il faut rassurer tous les patients sur le fait que les symptômes seront soulagés et les encourager à consulter un médecin immédiatement si leurs symptômes changent de manière importante. Dans les soins de fin de vie, il est particulièrement important d'impliquer les pharmaciens, les infirmières, les assistants sociaux et le clergé (lorsque cela est désiré), qui peuvent faire partie d'une équipe interdisciplinaire ou d'un programme de prise en charge de la maladie déjà en place.

1.9. Traitements

Une hospitalisation immédiate est nécessaire en cas d'IC aiguë ou d'aggravation de certains troubles (p. ex., infarctus du myocarde, fibrillation auriculaire avec fréquence ventriculaire très rapide, HTA sévère, insuffisance valvulaire aiguë), ainsi qu'en cas d'œdème pulmonaire, de symptômes graves, d'IC d'apparition récente ou d'insuffisance cardiaque qui ne répond pas au traitement ambulatoire. Le patient qui présente des poussées modérées d'IC antérieurement diagnostiquée peut être traité à domicile. Le premier objectif est de diagnostiquer et corriger ou traiter la maladie qui a entraîné l'insuffisance cardiaque. Les **objectifs à court terme** sont de soulager les symptômes et d'améliorer l'hémodynamique; d'éviter l'hypokaliémie, les dysfonctionnements rénaux et l'hypotension symptomatique; et de corriger l'activation neurohumorale. Les **objectifs à long terme** comprennent la correction de l'HTA, la prévention de l'athérosclérose et de l'infarctus du myocarde, l'amélioration de la fonction cardiaque, la réduction des hospitalisations et l'amélioration de la survie et de la qualité de vie. Le traitement comprend des modifications du régime alimentaire et du mode de vie, la prise de médicaments et parfois la chirurgie. Le traitement est adapté à chaque patient, en fonction des causes, de la symptomatologie et des réactions médicamenteuses, y compris les effets indésirables. Il existe actuellement plusieurs thérapies fondées sur des données probantes dans l'insuffisance cardiaque avec fraction d'éjection réduite chronique ⁶⁶. Il y a moins de traitements fondés sur des données probantes dans l'ICFEp chronique, dans les syndromes d'IC aiguë et dans l'insuffisance du ventricule droit ⁶⁷.

1.9.1. Prise en charge de la maladie

Les **mesures générales**, en particulier la formation du patient et des aidants, le régime alimentaire et les modifications de style de vie, sont importantes chez tous les patients insuffisants cardiaques. La formation du patient et des soignants est essentielle au succès à long terme. Le patient et sa famille doivent être impliqués dans les choix de traitement. Il faut les informer de l'importance de l'observance médicamenteuse, des signes d'alarme de l'exacerbation et comment établir une relation de cause à effet (p. ex., augmentation du sel dans l'alimentation avec la prise de poids ou les symptômes). De nombreux centres (p. ex., hôpitaux de jours spécialisés) ont intégré des praticiens de différentes disciplines (p. ex., infirmières, pharmaciens, assistants sociaux, spécialistes de la rééducation) dans des équipes multidisciplinaires ou des programmes de prise en charge des patients insuffisants cardiaques ambulatoires. Ces approches peuvent améliorer les résultats et réduire les hospitalisations et sont les plus efficaces chez les patients les plus gravement atteints. Un **régime hyposodé** permet de limiter la rétention liquidienne. Tous les patients doivent éliminer le sel de la préparation des repas et à table et éviter les aliments salés; les plus gravement atteints doivent limiter le Na à < 2 g/jour en ne consommant que des aliments à faible teneur en Na.

Le **suivi journalier du poids** le matin permet de détecter précocement l'accumulation de Na et d'eau. Si le poids augmente de > 2 kg, le patient peut être en mesure d'adapter sa posologie diurétique lui-même, mais si la prise de poids continue ou que des symptômes apparaissent, il doit consulter un médecin.

La **prise en charge intensive** au cas par cas, en particulier par le suivi de l'observance des médicaments et la fréquence des consultations non prévues du médecin ou du service d'urgence et des hospitalisations, permet de déterminer la nécessité de l'intervention. Les infirmières spécialisées dans l'IC sont utiles dans l'éducation, le suivi et l'adaptation des doses selon des protocoles prédéfinis.

Le patient atteint d'athérosclérose ou de diabète doit suivre strictement un régime alimentaire adapté à son affection. L'obésité peut entraîner et aggrave toujours les symptômes de IC; les patients doivent atteindre un indice de masse corporelle (IMC) ≤ 30 kg/m² (idéalement 21 à 25 kg/m²).

On encourage généralement la pratique d'une **activité légère régulière** (p. ex., marche), adaptée aux symptômes. L'activité évite le déconditionnement musculaire squelettique, qui aggrave l'état fonctionnel; cependant, l'activité ne semble pas améliorer la survie ou réduire les hospitalisations. Le repos est indiqué au cours des poussées aiguës. La rééducation cardiaque est utile en cas d'ICFcr chronique et est probablement utile en cas d'ICFcr.

Les patients doivent être vaccinés contre la grippe chaque année car la grippe peut déclencher une aggravation de l'IC, en particulier chez la personne âgée.

Le traitement efficace d'une HTA, d'une tachyarythmie persistante, d'une anémie sévère, d'une hémochromatose, d'un diabète incontrôlé, d'une thyrotoxicose, d'un bérubéri, d'un alcoolisme, de la maladie de Chagas ou de la toxoplasmose, peut améliorer de manière très importante l'état du patient. Toute ischémie myocardique significative doit être traitée agressivement; le traitement peut comprendre une revascularisation par angioplastie coronaire ou pontage. La prise en charge des patients qui présentent une importante infiltration ventriculaire (p. ex., une amylose) s'est considérablement améliorée. Le traitement de l'amylose primitive (chaîne légères amyloïdiques) par la chimiothérapie, et dans certains cas, par la greffe de cellules souches autologues, a nettement amélioré le pronostic de ces patients.

1.9.2. Traitement médicamenteux

Le traitement médicamenteux de l'IC comprend le soulagement des symptômes (p. ex. diurétiques, dérivés nitrés ou digoxine) et la prise en charge à long terme pour l'amélioration de la survie (les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA)⁶⁸, les β -bloqueurs, les antagonistes de l'aldostérone ou les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (ARA-II))⁶⁹Toutes ces classes de médicaments ont été étudiées dans l'ICFcr et ont montré un bénéfice à long terme. ²¹Dans l'ICFcr, un moins grand nombre de médicaments a été suffisamment étudié. Cependant, les IECA, les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II et les β -bloqueurs sont généralement utilisés pour traiter l'insuffisance cardiaque avec fraction d'éjection préservée. Les inhibiteurs du récepteur de l'angiotensine et de la néprilysine sont actuellement à l'étude. Des essais contrôlés randomisés suggèrent que les antagonistes de l'aldostérone sont bénéfiques, mais les nitrates ne le sont probablement pas. En cas d'IC sévère avec fraction d'éjection préservée, l'abaissement de la fréquence cardiaque (p. ex., par un β -bloqueur) peut exacerber les symptômes, car le volume systolique est relativement fixe en raison d'un dysfonctionnement diastolique

sévère.²¹ Chez ces patients, le débit cardiaque dépend de la fréquence cardiaque et l'abaissement de la fréquence cardiaque peut donc diminuer le débit cardiaque au repos et/ou à l'effort. En cas de **cardiomyopathie hypertrophique**, la digoxine est inefficace et peut être nocive. Tous les patients doivent recevoir des informations claires et explicites au sujet de leurs médicaments, y compris sur l'importance du renouvellement de la prescription en temps opportun et l'observance du traitement, sur comment reconnaître les effets indésirables et quand contacter leur médecin.

1.9.3. Troubles du rythme

Il est important d'identifier et de traiter la cause d'un **trouble du rythme**. La **tachycardie sinusale**, une modification compensatrice fréquente dans l'IC, disparaît habituellement quand le traitement de l'IC est efficace. Si ce n'est pas le cas, il faut rechercher une étiologie associée (p. ex., hyperthyroïdie, embolies pulmonaires, fièvre, anémie, douleur). Si la tachycardie sinusale persiste malgré la correction des causes, le recours à un β -bloqueur, administré en augmentant progressivement les doses peut être utile chez certains patients sélectionnés. Cependant, abaisser la fréquence cardiaque au moyen d'un β -bloqueur peut être préjudiciable en cas d'insuffisance cardiaque avancée avec fraction d'éjection préservée (p. ex., dans la cardiomyopathie restrictive), car le volume systolique est fixe en raison d'un dysfonctionnement diastolique sévère. Chez ces patients, le débit cardiaque dépend de la fréquence cardiaque et l'abaissement de la fréquence cardiaque peut donc diminuer le débit cardiaque au repos et/ou à l'effort. Une **fibrillation auriculaire** avec une fréquence ventriculaire rapide doit être traitée; l'objectif de fréquence ventriculaire est généralement < 80 battements/minute. Les β -bloqueurs sont le traitement de choix, bien que les inhibiteurs calciques bradycardisants, utilisés avec prudence, puissent être préférables si la fonction systolique est conservée.⁷⁰ Ajouter de la digoxine, une faible posologie d'amiodarone, ou d'autres médicaments pour contrôler le taux et/ou le rythme peut aider certains patients.⁷¹ La régularisation en rythme sinusal et son maintien ne se sont pas révélés supérieurs au contrôle de la fréquence cardiaque dans grands essais cliniques. Cependant, il est préférable de faire cette détermination au cas par cas car certains patients s'améliorent significativement avec la restauration d'un rythme sinusal normal. Si la fibrillation auriculaire rapide ne répond pas aux médicaments, la pose d'un stimulateur cardiaque permanent avec ablation totale ou partielle du

nœud auriculoventriculaire, ou d'autres procédures d'interruption de la fibrillation auriculaire peut être envisagée chez certains patients pour restaurer un rythme sinusal ou régulier.

Les **extrasystoles ventriculaires isolées**, fréquentes dans l'insuffisance cardiaque, ne nécessitent pas de traitement spécifique, bien que rarement des extrasystoles ventriculaires très fréquentes (> 15 000/jour) ont été démontrées déclencher une insuffisance cardiaque. Cependant, l'optimisation des traitements de l'insuffisance cardiaque et la correction des troubles hydro-électrolytiques (en particulier K et Mg) réduisent le risque de troubles du rythme ventriculaires.

Une **tachycardie ventriculaire** soutenue qui persiste malgré la correction de la cause (p. ex., K ou Mg bas, ischémie) et un traitement médical optimal de l'insuffisance cardiaque peut exiger un médicament antiarythmique. L'amiodarone et les β -bloqueurs et le dofétilide sont les médicaments de choix car d'autres antiarythmiques ont des effets indésirables proarythmiques en cas de dysfonctionnement systolique du ventricule gauche.⁷² L'amiodarone augmentant les taux de digoxine et de wafarine, les doses de digoxine et/ou warfarine doivent être diminuées de moitié ou arrêtées. Le taux de digoxine sérique et l'INR doivent être surveillés régulièrement. Cependant, une intoxication médicamenteuse peut survenir même à des niveaux thérapeutiques. Le traitement à long terme par l'amiodarone peut provoquer des effets indésirables, une dose faible (200 mg po 1 fois/jour) sera donc préférée, lorsque cela est possible; on pratique un bilan hépatique et un dosage de la TSH à 6 mois. Si la radiographie de thorax est anormale ou si la dyspnée s'aggrave significativement, on effectue annuellement une radiographie thorax et des épreuves fonctionnelles respiratoires pour détecter une fibrose pulmonaire. En cas de troubles du rythme ventriculaires soutenus, l'amiodarone peut être nécessaire; afin de réduire le risque de mort subite, une dose de charge de 400 à 800 mg est administrée pendant 1 à 3 semaines jusqu'à ce que le contrôle du rythme soit suffisant, puis la dose est diminuée en 1 mois jusqu'à une dose d'entretien de 200 mg.

1.9.4. Dispositifs thérapeutiques

L'utilisation d'un **défibrillateur implantable** ou d'une thérapie de **resynchronisation cardiaque**, est appropriée chez certains patients. En effet, une grande proportion des décès brutaux chez les patients en IC est liée à l'apparition de troubles électriques comme les arythmies ventriculaires, les bradycardies, les asystolies, bien qu'une partie soit liée à des accidents coronariens,

valvulaires ou neurologiques. La mise en place d'un **défibrillateur implantable** est recommandée chez le patient dont l'espérance de vie est >1 an et ayant récupéré d'une arythmie ventriculaire symptomatique ou s'il reste symptomatique (NYHA II-III) et présente une FE $< 35\%$ malgré un traitement médical optimal d'au moins 3 mois. Les données pour l'utilisation du défibrillateur implantable dans l'ICFEr sont plus probantes pour la cardiomyopathie ischémique que pour la cardiomyopathie non-ischémique.¹³

La **thérapie de resynchronisation cardiaque** peut soulager les symptômes et réduire les hospitalisations des patients qui présentent une insuffisance cardiaque, une fraction d'éjection du ventricule gauche $< 35\%$ et un élargissement du complexe QRS avec un aspect de bloc de branche gauche ($> 0,15$ s; plus le QRS est élargi, plus le bénéfice est important).^{73, 74}

Les appareils de thérapie de resynchronisation cardiaque (Cardiac Resynchronization Therapy, CRT) sont efficaces mais chers et les patients doivent être judicieusement sélectionnés. De nombreux dispositifs de CRT intègrent également un défibrillateur implantable dans leur mécanisme.⁷⁵ Un dispositif implantable qui surveille à distance l'hémodynamique invasive (p. ex., la pression artérielle pulmonaire) peut guider la prise en charge de l'insuffisance cardiaque chez des patients très bien sélectionnés. Par exemple, la titration médicamenteuse (p. ex., diurétique) basée sur les lectures de l'un de ces dispositifs a été associée à une réduction marquée des hospitalisations pour IC dans un essai clinique qui comprenait des patients en ICFEr et des patients en ICFEp. Le dispositif utilise la pression diastolique de l'artère pulmonaire comme substitut de la pression capillaire pulmonaire (et donc de la pression auriculaire gauche) chez les patients qui ont une IC. Cependant, il n'a été évalué que chez les patients de classe III de la NYHA qui présentaient des exacerbations d'insuffisance cardiaque récidivantes. Des preuves supplémentaires guideront la mise en œuvre de cette technologie. Il faut également garder à l'esprit que tous les patients ne répondent pas favorablement au CRT.⁷⁴ Notamment, les patients souffrant d'IC et présentant une fibrose cicatricielle myocardique sont moins sujets à un remodelage favorable du VG.⁷⁶

L'**ultrafiltration** (filtration veineuse) peut être utile chez des patients hospitalisés sélectionnés qui ont un syndrome cardio-rénal avec une surcharge volémique réfractaire au traitement diurétique. Cependant, l'ultrafiltration ne doit pas être utilisée systématiquement car les essais cliniques ne montrent pas de bénéfice clinique à long terme.^{77, 78}

Un ballon de contre-pulsion intra-aortique (BCPIA) est utile chez certains patients en insuffisance cardiaque aiguë qui ont de bonnes chances de guérison (p. ex., infarctus aigu du myocarde) ou chez ceux en attente d'une chirurgie cardiaque (p. ex., revascularisation d'une coronaropathie), un dispositif d'assistance du ventricule gauche ou une transplantation cardiaque. Cependant, chez les patients en choc cardiogénique et souffrant d'IMA, l'étude IABP-SHOCK II n'a pas démontré d'amélioration de survie.^{79, 80} Ainsi, l'utilisation en routine du BCPIA n'est pas recommandée.

Une description exhaustive et détaillée du traitement médical de l'IC dépasse amplement les objectifs de cette thèse, et nous ne pouvons que citer sans entrer dans les détails les différents de types de médicaments disponibles dans notre arsenal thérapeutique.

1.9.5. Approches chirurgicales

La chirurgie peut être indiquée en présence de certains troubles sous-jacents. Son panel pour le traitement de l'IC est très étendu.⁸¹ La chirurgie en cas d'IC avancée doit être effectuée dans un centre spécialisé au sein d'un Heart Team. La fermeture chirurgicale des shunts intracardiaques congénitaux ou acquis peut être curative.

1.9.5.1. Revascularisation coronarienne

Les patients avec une atteinte significative du tronc commun ou équivalent (sténose proximale de l'artère interventriculaire antérieure et du réseau circonflexe) bénéficient d'une amélioration de la survie après pontages coronariens.^{54, 55} Cependant, les patients avec altération sévère de la FEVG ont une évolution plus défavorable que ceux ayant une FEVG conservée.⁸² Dans ce groupe de patients à très haut risque, les études CASS (Coronary Artery Surgery Study), VA (Veterans Administration Cooperative Study Group) et ECSS (European Coronary Surgery Study) ont démontré l'avantage du traitement chirurgical comparé au traitement médical optimal.⁸³⁻⁸⁵ Les résultats à 10 ans de l'étude STICH (Surgical Treatment for Ischemic Heart Failure) -incluant des patients avec atteinte du tronc commun et patients avec une classe CCS III-IV) -a démontré que le pontage aorto-coronarien est recommandé chez les patients avec ICFer (FE<35%), et atteinte du tronc commun.⁸⁶ A 10 ans, sur cette cohorte de patients ischémiques, le taux de mortalité de toute cause, le taux de mortalité cardiovasculaire et le taux d'hospitalisation étaient significativement réduits chez les patients recevant des pontages en supplément d'un traitement

médical comparé au traitement médical seul.⁸⁷ Dans les cas d'IC résultant d'une cardiomyopathie ischémique, la revascularisation est plus efficace sur du myocarde en hibernation sans mort cellulaire ni cicatrisation extensive. Une épaisseur satisfaisante de paroi ventriculaire gauche à l'échographie (> 8 mm) en l'absence d'infarctus est un indicateur fiable de viabilité. Une obstruction coronaire proximale de importance et une bonne distalité coronarienne représentent des conditions optimales pour le pontage coronarien. La maladie coronarienne avec altération sévère de la fonction ventriculaire gauche est la principale cause d'insuffisance cardiaque chez 27,5% des patients sur lesquels une transplantation cardiaque a été envisagée.⁸⁸ Cependant, la plupart des patients atteints d'IC au stade terminal en raison d'une cardiomyopathie ischémique ne sont pas éligibles pour la transplantation cardiaque en raison de la limite d'âge, de maladies associées ou d'une HTAP; par conséquent, la transplantation cardiaque n'est pas une option valable dans ce groupe de population. La revascularisation coronarienne demeure un traitement de première intention. Le risque chirurgical associé au pontage coronarien chez les patients atteints de cardiomyopathie ischémique a été considérablement réduit ces dernières années grâce aux progrès de la chirurgie cardiaque. Cependant, comme Ennker et al l'ont publié, le rôle du PAC comme traitement standard chez les patients atteints d'IC terminale reste matière à discussion.⁸⁹ À ce jour, peu d'études à grande échelle bien conduites ont examiné les facteurs sur lesquels une décision en faveur de la revascularisation chirurgicale devrait être fondée. Le bénéfice de la revascularisation myocardique en terme de survie et de rétablissement de la fonction ventriculaire gauche dépendront principalement de la présence de tissu myocardique revascularisable (myocarde hibernant).⁹⁰ Toutefois, Panza et al. n'ont pas retrouvé de corrélation entre la présence de viabilité myocardique et le bénéfice de pontages sur cette population avec cardiomyopathie ischémique. La présence de myocarde viable, quel que soit le traitement, était associée à une amélioration de la FEVG mais cette amélioration n'était pas reliée à une survie à long terme.⁹¹ De même, l'ajout de pontages au traitement médical présente de plus grands bénéfices (mortalité toute cause) chez les patients jeunes comparé aux patients plus âgés.⁹² Différentes méthodes de diagnostic sont actuellement utilisées pour évaluer la viabilité du myocarde, telles que la tomographie par émission de positons au fluorodésoxyglucose (FDG), l'imagerie par résonance magnétique, la tomographie par émission à photon unique ou l'échographie cardiaque, afin de différencier la sidération myocardique (encore perfusé et

métabolisé de façon adéquate), l'hibernation (différence entre la perfusion et le métabolisme demeurant intact) et une cicatrice d'infarctus (ni perfusé ni métabolisé).

Par conséquent, le risque opératoire peut être réduit grâce au dépistage préopératoire des patients et à l'évaluation de la viabilité du myocarde. Ce processus de sélection pourrait étendre l'indication du PAC aux patients autrement référés pour une transplantation cardiaque.

1.9.5.2. Reconstruction ventriculaire

La taille du ventricule gauche est un facteur pronostique important pour la survie à long terme des patients atteints de cardiomyopathie ischémique. La reconstruction ventriculaire est donc une option valable pour les patients présentant une dilatation ventriculaire et ceci pourrait ralentir l'apparition de l'insuffisance cardiaque chez ces patients. Les taux de mortalité périopératoire sont acceptables et les taux de survie à long terme sont bien meilleurs après la reconstruction ventriculaire chirurgicale qu'après la seule revascularisation coronarienne.⁹³ Il a également souligné que, comme dans le cas de la revascularisation coronaire, la décision de procéder ou non à une reconstruction ventriculaire dépend de la viabilité du myocarde résiduel et de la taille de la zone akinétique, étant donné que les patients présentant de vastes zones akinétiques représentant plus de 35% de la totalité du ventricule gauche ne sont pas des candidats appropriés pour cette procédure.⁹⁴ Par ailleurs, Jones et al. ont montré sur 1000 patients que l'ajout d'une reconstruction ventriculaire à une procédure de pontages réduisait le volume du ventricule gauche sans améliorer la survie à 5 ans ou l'hospitalisation pour cause cardiaque.⁹⁵

1.9.5.3. Anévrismectomie ventriculaire gauche

Cette procédure est idéale lorsque l'anévrisme est localisé et à paroi fine et que les autres artères coronaires ne sont pas atteintes. Le bénéfice maximal est obtenu chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque avancée. Comme pour la reconstruction ventriculaire, la valeur de la réduction du volume ventriculaire dépend de la qualité du myocarde restant. Afin d'évaluer les indications et les dimensions de la réduction ventriculaire, une utilisation combinée du CT scan et de l'échographie peut être utile

1.9.5.4. *Chirurgie valvulaire*

Si l'IC est principalement due à une valvulopathie, la réparation ou le remplacement de la valvule doivent être envisagés. Le patient qui présente une insuffisance mitrale primitive bénéficiera d'avantage d'une chirurgie que le patient qui présente une insuffisance mitrale secondaire à une dilatation du ventricule gauche, chez lequel la fonction myocardique restera mauvaise en post-opératoire. Il est préférable d'effectuer la chirurgie avant que la dilatation myocardique et les lésions ne deviennent irréversibles. Cette catégorie de patients IC et présentant une valvulopathie cardiaque constitue une population à très haut risque. Ainsi la décision thérapeutique doit se faire au sein d'un Heart-Team (cardiologues, chirurgiens, anesthésistes, intensivistes, gériatres).

1.9.5.4.1. *Sténose aortique*

L'entité « bas gradient, bas débit paradoxal » est d'une importance particulière chez les patients IC atteints d'une sténose aortique sévère (Surface valvulaire < 1 cm², FEVG<40% et gradient de pression <40mmHg). L'échographie dobutamine doit être envisagé chez ces patients afin de discriminer les patients avec sténose aortique modérée et des patients avec sténose sévère et bas gradient (en lien avec un volume d'éjection systolique bas) et évaluer la contractilité et la réserve fonctionnelle. Le TAVI est indiqué chez les patients avec sténose aortique sévère symptomatique qui ne sont pas éligibles pour la chirurgie, avec une espérance de vie >1an.

Le risque individuel et les conditions anatomiques doivent guider le choix chez les patients éligibles pour la chirurgie.^{96, 97}

Les résultats à 5 ans de l'étude **PARTNER 2** chez les patients à risques intermédiaires démontraient l'absence de différence significatives en terme de décès ou événements neurologiques entre TAVI et chirurgie.⁹⁸ Cependant, 8.5% des patients TAVI avaient une insuffisance paravalvulaire au moins modérée à 2 ans comparé à 0.4% dans le groupe chirurgie. Une insuffisance paravalvulaire légère était 7 fois plus importante dans le groupe TAVI (25.2% vs 3.5%). De même, 14.5% des patients du groupe chirurgie ont eu une chirurgie de pontages concomitants vers 3.9% dans le groupe TAVI ayant reçu un traitement par PCI concomitant. De plus, 9.1% des patients en chirurgie ont eu une procédure valvulaire associé (aucun dans le bras TAVI). Ainsi, 23.6% des patients en chirurgie ont reçu un traitement optimisé. Ces données

pourraient démontrer que la chirurgie offre un traitement tout-en-un pouvant apporter un bénéfice à long terme dans ce groupe de patients à risque.^{99, 100}

Dans l'étude **PARTNER 3**, chez les patients à bas risque chirurgical, la mortalité, les accidents neurologiques, le taux de ré-hospitalisation à 1 an étaient plus faibles dans le groupe TAVI (Sapiens 3) que dans le groupe chirurgie.¹⁰¹

1.9.5.4.2. *Insuffisance aortique (IAo)*

Tout patient avec une régurgitation aortique sévère est éligible pour une réparation ou un remplacement valvulaire s'il est symptomatique ou s'il présente une FEVG <50% et asymptomatique.^{102, 103}

1.9.5.4.3. *Insuffisance mitrale (IM)*

En cas d'**IM primaire**, la chirurgie est recommandée pour tout patient symptomatique avec IM sévère sans contre-indication à la chirurgie. En cas de FE <30%, la réparation valvulaire pourrait améliorer les symptômes bien que son impact sur la survie à long terme reste peu connu.

L'**IM secondaire** (fonctionnelle) est généralement liée à une dilatation du VG ou un remodelage ventriculaire avec défaut de coaptation et non pas à une dégénérescence de la valve. L'addition d'une réparation mitrale à une chirurgie de pontages n'a pas démontré d'avantages en termes de remodelage ventriculaire.^{104, 105}

En cas d'IM modéré-sévère chez les patients en IC, avec une régurgitation mitrale non opérable ou à très haut risque, le traitement percutané MitraClip peut être considéré afin d'améliorer les symptômes et la qualité de vie.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ En 2018, les publications de deux études d'importance : **MITRA-FR** (Multicentre Study of Percutaneous Mitral Valve Repair MitraClip Device in Patients With Severe Secondary Mitral Regurgitation)¹⁰⁹ et **COAPT** (Cardiovascular Outcomes Assessment of the MitraClip Percutaneous Therapy for Heart Failure Patients with Functional Mitral Regurgitation)¹¹⁰ ont évalué la sécurité et l'efficacité du traitement percutané par MitraClip en plus d'un traitement médical optimisé chez les patients en IC et porteurs d'une IM secondaire. Les données de ces deux études ont été diamétralement opposées, **MITRA-FR** étant neutre et **COAPT** très favorable au MitraClip. Les résultats à 2 ans de MITRA-FR ont confirmés la neutralité du MitraClip comparé au traitement médical seul en termes de risque de mortalité ou d'hospitalisation.¹¹¹ Dans l'étude **COAPT**, le risque d'hospitalisation à 2 ans était diminué de 47% (35.8% par patient-année dans le groupe MitraClip vs 67.9% dans le groupe contrôle) et le

risque de mortalité toute cause était diminué de 38% dans le groupe MitraClip (29.1% vs 46.1%).¹¹⁰

Les raisons données pour expliquer une telle divergence entre deux études au design en apparence identique viendraient d'une sélection plus drastique des patients dans l'étude **COAPT**. En effet, **COAPT** a inclus des patients avec des IM plus sévères (critères américains de sévérité : SOR > 30 mm² et un VR > 45 mL) que **MITRA-FR** (critères européens : SOR > 20 mm² et/ou un VR > 30 mL) ; avec une pathologie moins évoluée (FEVG ≥ 20 % et DTDVG < 70 mm) ; et mieux traités et optimisés sur le plan médicamenteux et de la resynchronisation cardiaque. En effet, ces différences pourraient expliquer les résultats différents de ces deux études. Ainsi, les patients en IC avec une dilatation/ dysfonction trop importante du VG ne bénéficieraient pas de la procédure MitraClip. A la lumière de ces deux études, il serait raisonnable de conclure que le MitraClip réduit la mortalité et l'hospitalisation chez les patients sélectionnés :

- IM modérée à sévère (3+) définie comme une SOR>30mm² et/ou un VR>45mL
- FEVG entre 20-50% et un diamètre télésystolique VG <70mm
- Des symptômes d'IC persistants (NYHA>II) malgré un traitement médical optima avec resynchronisation cardiaque et revascularisation coronaire si nécessaire.

1.9.5.4.4. *Insuffisance tricuspide (IT)*

L'insuffisance tricuspide secondaire (fonctionnelle) est lié à la dilatation annulaire et en relation avec l'augmentation de la pression de remplissage du VD. En cas de congestion hépatique, l'utilisation de doses natriurétiques importantes est préconisé pour faciliter la décongestion.¹¹²

Les indications de réparations chirurgicales ne sont pas clairement établies.^{113, 114}

1.9.5.5. *Assistance circulatoire mécanique (ACM)*

Les **dispositifs d'assistance du VG** sont des pompes implantables suppléantes au maintien du débit du VG défaillant et assurent le maintien d'une perfusion d'organe adéquat. Ils sont couramment utilisés pour maintenir les patients qui ont une IC grave en attente d'une transplantation et sont également utilisés comme « thérapie de destination » (c'est-à-dire comme une solution à long terme) chez certains patients qui ne sont pas candidats à la greffe. L'évolution des dispositifs d'ACM, visant à permettre la transplantation ou la récupération du myocarde, a

aidé de nombreux patients. De nos jours, ces dispositifs sont même implantés pour un soutien à long terme, en particulier chez les patients âgés et chez ceux qui présentent des contre-indications à la transplantation cardiaque. Cela pourrait même être la meilleure et la solution optimale pour traiter les patients souffrant d'IC à l'avenir. L'utilisation systématique de dispositifs d'assistance circulatoire pour maintenir les patients en vie jusqu'à la transplantation a ouvert la voie à leur utilisation clinique en tant que traitement efficace de l'IC terminale. Face à la pénurie croissante d'organes donateurs, un nombre croissant de patients bénéficie d'assistances circulatoires permanentes et de moins en moins de transplantations cardiaques. Différents systèmes d'assistance sont désormais capables d'améliorer l'état physique des patients et de leur offrir une bonne qualité de vie et ce pour plusieurs années. Ceci est également vrai pour les patients ayant des complications contre-indications à la transplantation cardiaque. De plus, certains patients préfèrent désormais un dispositif mécanique à un cœur de donneur.

1.9.5.5.1. MCS et IC aigue

En cas de choc cardiogénique (classe INTERMACS I), l'utilisation de dispositifs mécaniques de courte durée incluant les dispositifs implantables percutanés, l'ECLS (extracorporeal life support) et l'ECMO (extracorporeal membrane oxygenation) permettent d'assurer un débit suffisant en cas de défaillance gauche ou biventriculaire en attendant la récupération d'organe.

Des scores de survie peuvent être utilisé pour prédire la survie sous ECMO en cas de choc cardiogénique.¹¹⁵ De plus en plus fréquemment, l'ECMO est utilisé comme « pont vers la décision », permettant à la fois de stabiliser et évaluer cliniquement le patient, en attendant soit la récupération d'organe soit la transplantation cardiaque soit le pont vers un autre dispositif d'assistance de longue durée.¹¹⁶

L'utilisation de dispositifs percutanés de décharge du VG (Impella 2.5) chez les patients à haut risque bénéficiant d'une PCI n'a pas montré davantage par rapport à l'utilisation d'un BIACP en termes de mortalité à 30j (PROTECT II).¹¹⁷

1.9.5.5.2. MCS et IC chronique

Au vu de l'augmentation du nombre de patients en IC et la pénurie de greffons croissante, on observe un allongement du temps sur liste d'attente de transplantation.¹¹⁸

Selon le registre INTERMACS, sur les 25145 patients sous assistance mécanique, 74% ont reçu un LVAD à flux continu, 2.6% une assistance ventriculaire droite en plus du LVAD, 1.3% le cœur artificiel total et 0.07% une assistance droite unique.¹¹⁹

L'utilisation d'assistance ventriculaire gauche (LVAD) a démontré améliorer la survie des patients sur liste d'attente (91% vs 77% à 1 an).¹²⁰ Notamment, l'utilisation des pompes à flux continus LVAD-plus spécifiquement le HeartMate II^{121, 122} et le HeartWare HVAD¹²²- a considérablement augmenté, en alternative à la transplantation cardiaque (patients inéligibles à la transplantation ou trop vieux).¹²³

Figure 4. – Illustration du HeartMate II (Abbott Laboratories, IL, USA)

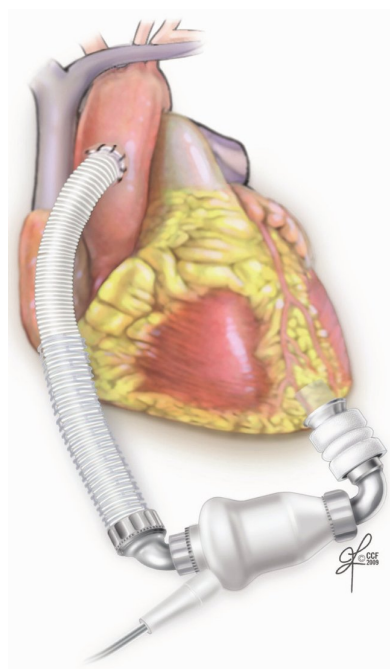
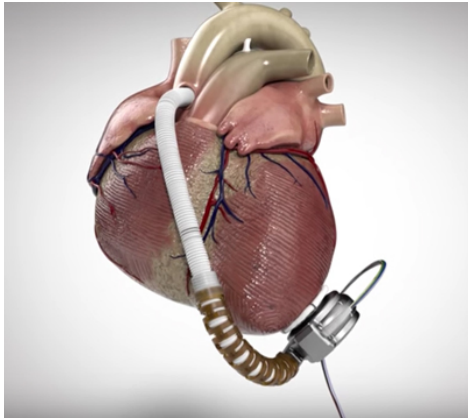


Figure 5. – Illustration du HeartWare HVAD (Medtronic)



Ce type d'assistance de longue durée demeure une avancée majeure dans le traitement de l'IC en permettant le « pont vers la transplantation » dans 80% des patients en attente de greffe selon le United Network of Organ Sharing (UNOS).¹²⁰ Actuellement, la survie à 1 an chez les patients recevant un LVAD à flux continu est excellente et comparable à la survie après transplantation.¹¹⁶ Cependant, peu de données sur la survie à long terme sont disponibles. Malgré les avancées technologiques, 60% des patients recevant ce type de pompes à flux continu souffrent de saignements, infections, dysfonction de pompe, thrombose, AVC et décès endéans la première année.¹²⁴

Le Heartmate III est le premier dispositif d'assistance ventriculaire de 3^{ème} génération dont le rotor est suspendu dans un champ magnétique, et permettant une pulsativité intrinsèque afin de diminuer la stase sanguine. Cette technologie permet de diminuer le traumatisme du sang à travers la pompe (force de cisaillement), et ainsi diminuer le risque de thrombose du dispositif.

Figure 6. – Illustration du HeartMate III(Abbott Laboratories,Chicago, IL, USA)



Les résultats finaux à 2 ans de l'étude MOMENTUM 3 (1028 patients en IC avancée) portant sur le dispositif d'assistance circulatoire de nouvelle génération Heartmate III (flux centrifuge) à son prédécesseur le Heartmate II (flux continu axial) a démontré moins d'événements neurologiques non invalidant et moins de réopération pour remplacement ou dysfonction de pompe.¹²⁵ Notons cependant que le taux d'AVC était plus faible dans le groupe HMIII (10.1% vs 19.2%) mais sans être significatifs pour les AVC invalidants (4% vs 5.8%) comparé au HMII.

Chez certains patients, le remodelage ventriculaire et l'amélioration de la FEVG permet le sevrage de l'assistance (« pont vers la récupération »). Cette évolution apparaît essentiellement chez les patients jeunes avec atteinte fulminante mais dont l'étiologie est potentiellement réversible (myocardite, cardiomyopathie du postpartum).¹²⁶⁻¹²⁸

L'étude ROADMAP a mis en évidence que l'implantation d'un LVAD chez des patients moins malades (ex. n'étant pas sous support vasopresseurs) menait à de meilleurs résultats que chez les patients sous traitement médical.¹²⁹ De même, le registre INTERMACS a démontré que les meilleurs résultats étaient obtenus chez les patients avec classe INTERMACS>3, bien que la plupart des patients implantés soient en classe 1-3.^{130, 131} On note également une évolution des profils des patients INTERMACS dans le temps avec une plus grande inclusion de patients en classe III (26% entre 2006-2011 vs 35% entre 2012-2016) et moins de patients en classe II (40% vs 35%). On décrit également une augmentation significative des patients ayant reçu un LVAD comme « implantation définitive » (48% vs 29%).¹¹⁹

Pour les patients en IC biventriculaires chronique ou à haut risque de développer une IC droite après implantation d'un LVAD, la mise en place d'une assistance biventriculaire (BiVAD) peut

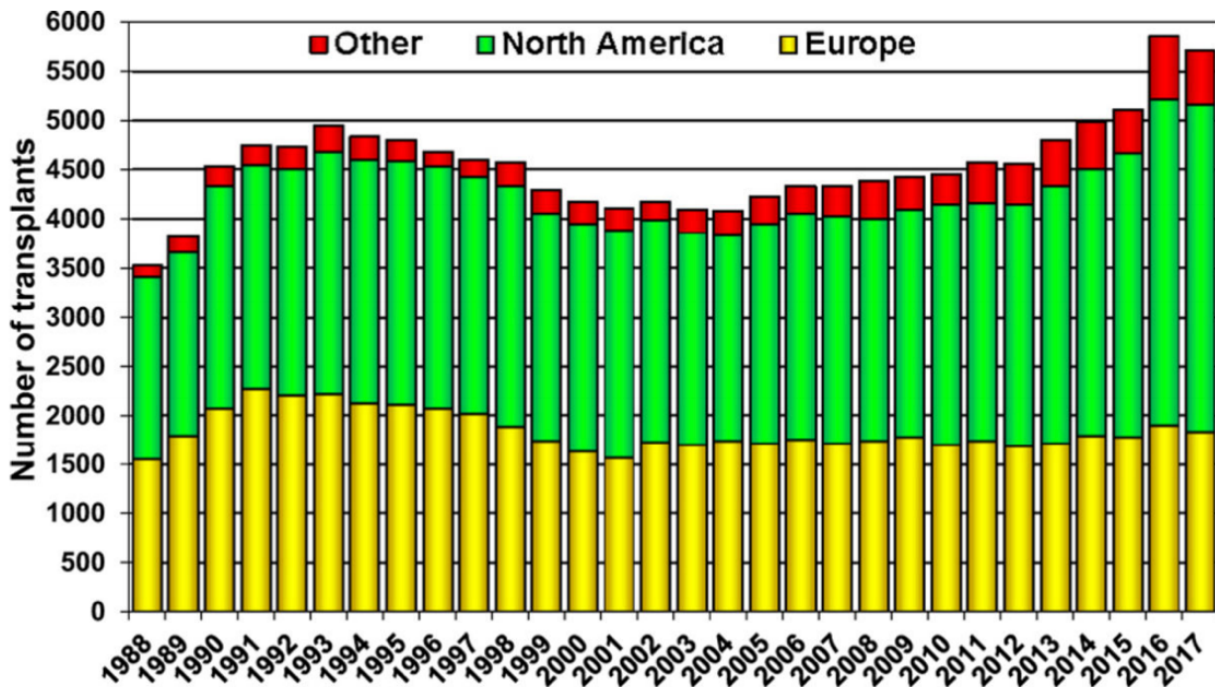
être nécessaire. Les résultats sous BiVAD¹³² sont moins bons que sous LVAD.¹³⁰ Ainsi l'indication d'assistance doit être discuté en Heart Team avant que la fonction ventriculaire droite ne se détériore. L'implantation du cœur artificiel total Syncardia avec exérèse des deux ventricules natifs doit être réservé à des patients très bien sélectionnés ne pouvant pas bénéficier du LVAD (communication interventriculaire non réparable, rupture cardiaque, condition anatomique particulière).^{133, 134} Nous détaillerons ultérieurement dans cette thèse le devenir de ces patients en IC bi ventriculaire à très haut risque.

1.9.5.6. Greffe cardiaque

1.9.5.6.1. Volume de transplantation

La **transplantation cardiaque** est le traitement de choix chez les patients en IC terminale.^{135, 136} Selon le dernier rapport de l'ISHLT (International Society of Heart and Lung Transplantation), plus de 5500 transplantations ont lieu à travers le monde chaque année.¹³⁷ Le nombre de transplantation cardiaque est significativement plus important qu'il y a 10 ans. Ceci pourrait être le reflet d'une augmentation de greffons disponibles avec une augmentation de décès par overdose aux USA, également reportés par dans d'autres pays, mais également par une augmentation du nombre de donneurs marginaux ou à « haut-risque ». La plupart des centres transplantateurs effectuent entre 10-19 greffes par an avec seulement 12 centres à travers le monde avec plus de 50 transplantations/an.

Figure 7. – Nombre de transplantations (adulte et pédiatrique) dans le monde

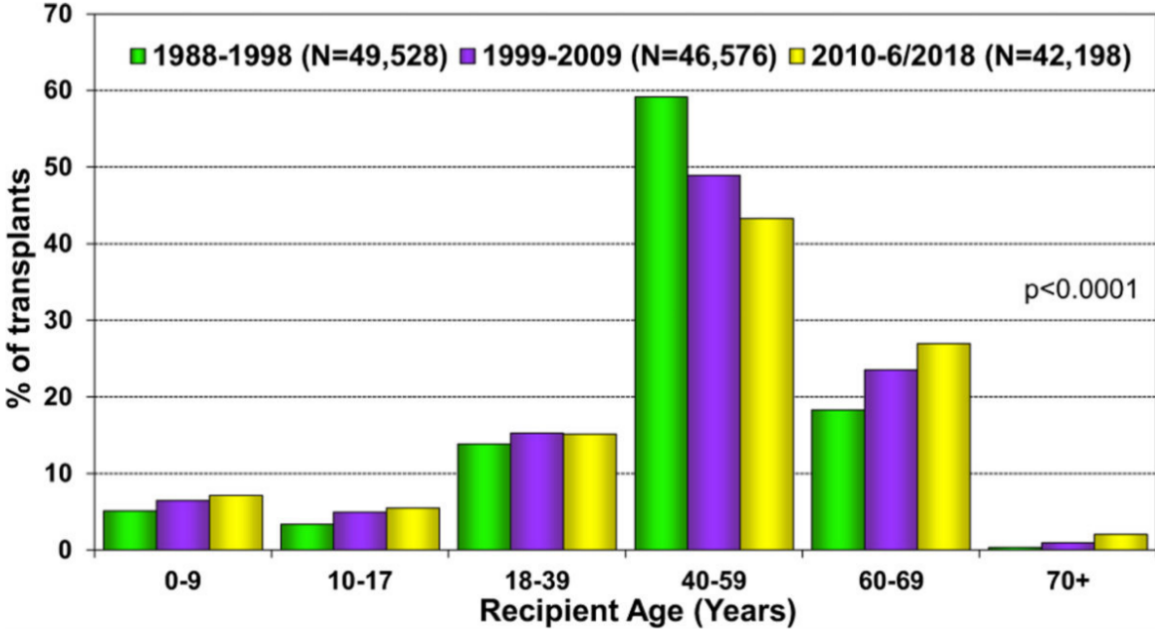


(Source :ISHLT 2017)

1.9.5.6.2. Données démographiques et caractéristiques des donneur et receveur

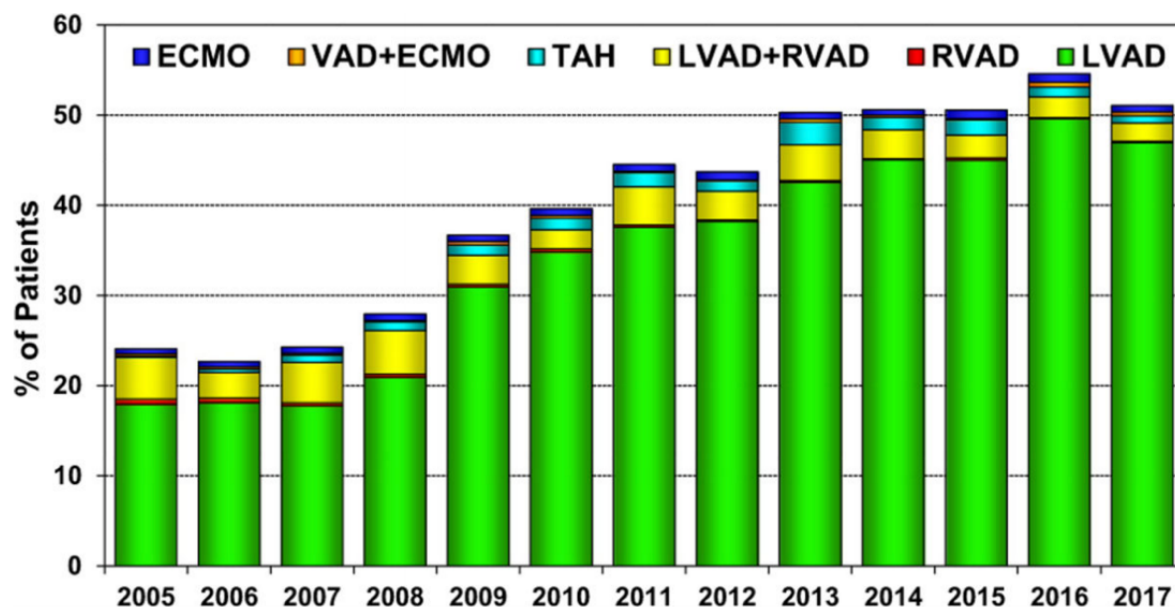
L'âge médian des receveurs est de 55 ans. On note une augmentation significative au cours des 30 dernières années de l'âge du donneur, du poids et BMI du donneur, du poids et BMI du receveur. L'âge des donneurs continue d'augmenter (surtout en Europe) avec de plus en plus de receveurs âgés (>60ans) comparés aux périodes antérieures (médiane 45 ans). Les indications de transplantation sont les cardiomyopathies dilatées non-ischémiques (51%) et les cardiomyopathies ischémiques (32%) dans la période la plus récente (2010-2018). On note quelques variations inter-régionales dans les co-morbidités des receveurs, avec une incidence de l'obésité (BMI>30kg/m²) et du diabète plus important en Amérique du Nord, alors que le tabagisme est plus important en Europe. De même, la proportion de patients sous assistance mécanique a considérablement augmenté entre 2007-2013 pour se stabiliser aux alentours de 50% de LVAD.

Figure 8. – Distribution de l'âge des receveurs par ère



(source :ISHLT 2018)

Figure 9. – *Pourcentage de patients sous assistances par année et type de support*

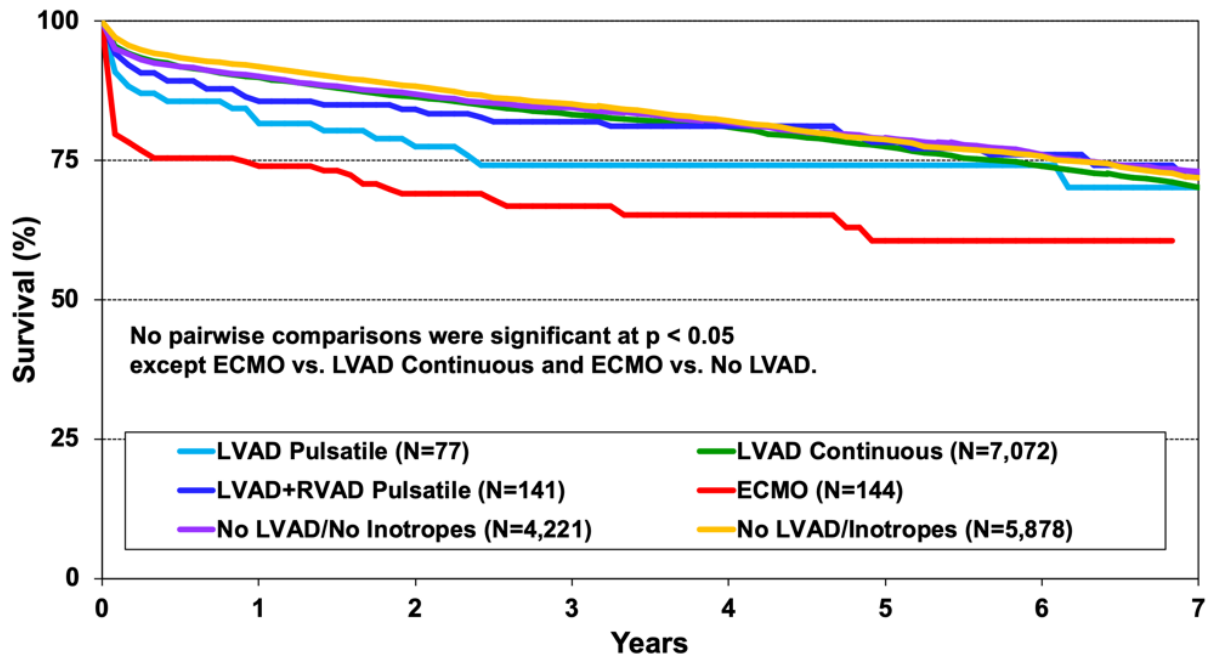


(source : ISHLT 2018)

1.9.5.6.3. *Survie*

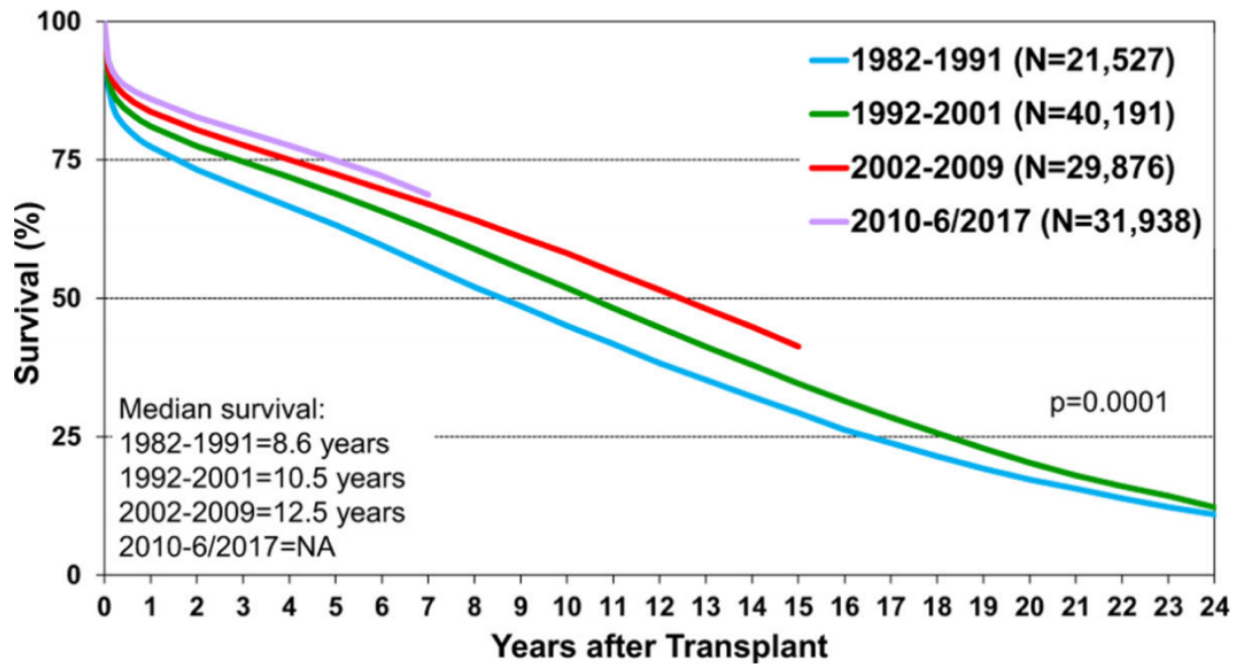
Malgré ces observations, le taux de survie reste excellent avec 85 à 90% à 1 an, et la mortalité par la suite est d'environ 4%/an. Cependant, la mortalité sur liste en attente de transplantation est de 12 à 15%. Le taux de survie à 10 ans est d'environ 50%.¹³⁸ Chez les patients ayant survécu à la 1^{ère} année post-greffe, la survie médiane est de 14.8 années (transplantation entre 2002 et 2008).¹³⁷ Le nombre de patients sous assistance ventriculaire en « pont vers la transplantation » est demeuré stable en 2017 avec 50% des patients sous LVAD et <1% sous ECMO. Ces derniers présentent une survie inférieure aux patients transplantés sous LVAD surtout dans la période post-transplant immédiate. En fonction de l'étiologie de l'IC, les courbes de survie divergent. En effet, les patients porteurs d'une cardiomyopathie ischémique ou non ischémique ont le meilleur taux de survie post transplant, alors que les re-transplantations ont la survie la plus faible.

Figure 10. – *Courbe de survie en fonction du type de support mécanique :*



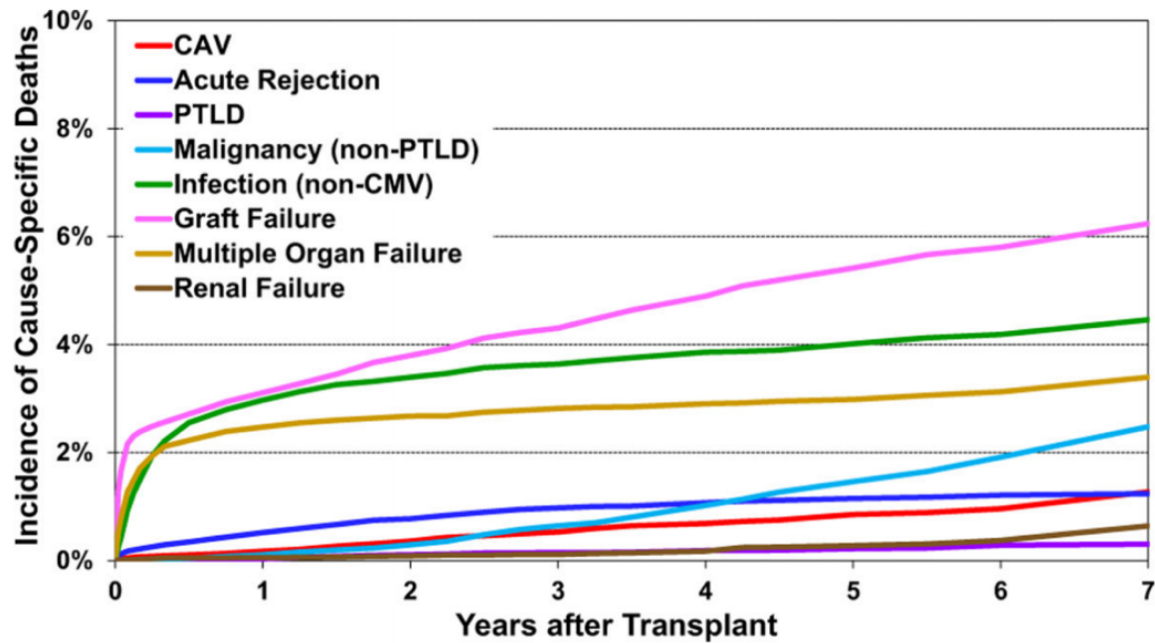
(source :ISHLT 2018)

Figure 11. – Courbe de survie Kaplan-Meier par ère



(source : ISHLT 2018)

Figure 12. – Incidence cumulative des causes de mortalité

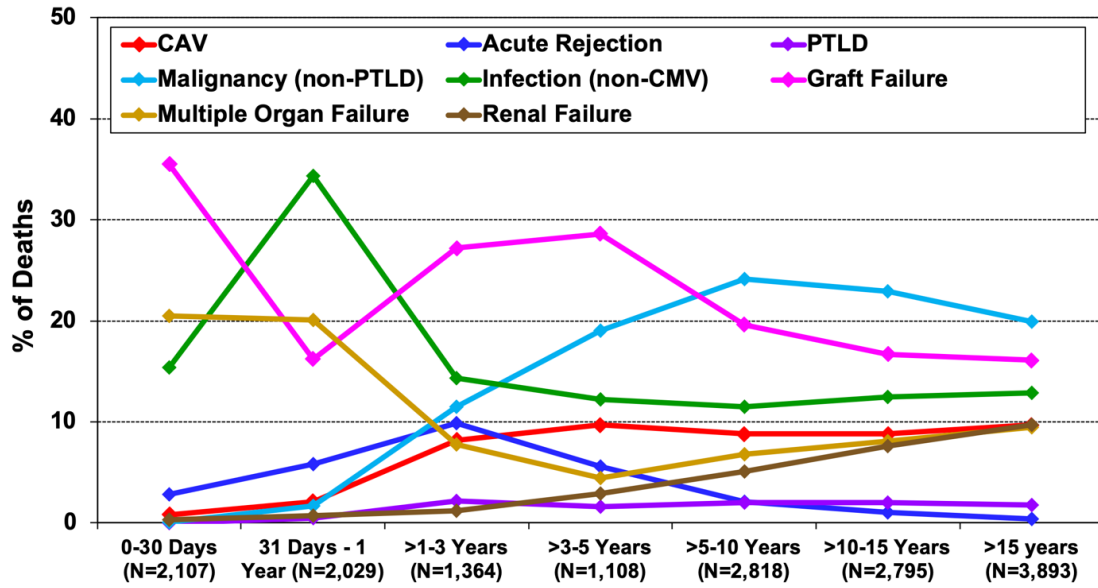


(source : ISHLT 2018)

1.9.5.6.4. Causes de décès

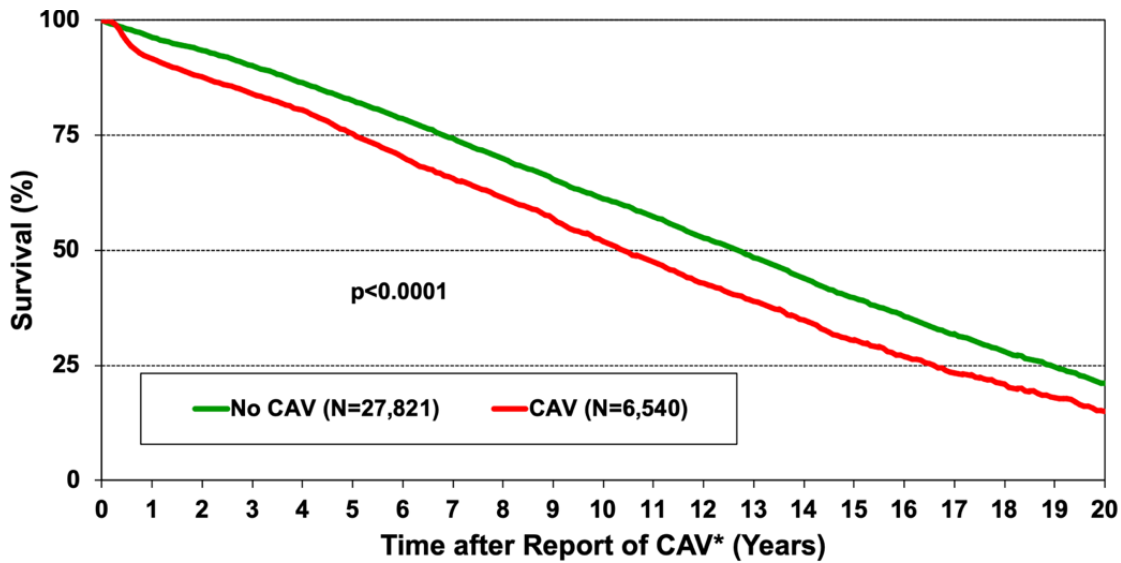
Les dons d'organes humains demeurent peu nombreux avec une augmentation du nombre de patients en attente de greffes. Mise à part le peu de donneur, les complications du traitement immunosuppresseur à long terme sont nombreuses et ont peu varié avec le temps: rejet médié par les anticorps, infection CMV, hypertension, insuffisance rénale, tumeurs et maladie vasculaire du greffon¹³⁹ Endéans les 30 premiers jours, la défaillance aigue du greffon est la principale cause de décès. Lors de la première année, il s'agit des complications infectieuses qui sont à l'avant-plan, et les tumeurs, le rejet aigue, la maladie vasculaire du greffon (MVG) et l'insuffisance rénale augmentent avec le temps. Au vue des avancées importantes en matière d'immunosuppression, de plus en plus de patients survivent aux complications précoces et s'exposent à la principale cause de défaillance chronique du greffon qui est la MVG.

Figure 13. – Incidence des causes de décès après transplantation



(Source : ISHLT 2019)

Figure 14. – Survie des patients greffés avec ou sans MCG



(Source : ISHLT 2019)

1.9.6. Insuffisance cardiaque persistante

Après le traitement, les symptômes persistent souvent. Les raisons en sont la persistance de l'affection sous-jacente (p. ex., HTA, ischémie/infarctus, maladie valvulaire) malgré le traitement; le traitement sous-optimal de l'insuffisance cardiaque; la non-observance des médicaments; l'apport excessif de Na alimentaire ou d'alcool; et la présence d'une affection thyroïdienne non diagnostiquée, l'anémie ou l'apparition d'un trouble du rythme (p. ex., fibrillation auriculaire avec réponse ventriculaire rapide, tachycardie ventriculaire intermittente). De plus, les médicaments utilisés pour traiter d'autres troubles peuvent perturber le traitement de l'insuffisance cardiaque. Les AINS, les thiazolidinediones (p. ex., pioglitazone) utilisés dans le diabète et les inhibiteurs calciques dihydropyridiniques ou non dihydropyridiniques à courte durée d'action peuvent aggraver l'insuffisance cardiaque et généralement ne doivent pas être utilisés; les patients qui doivent prendre ces médicaments doivent être suivis attentivement.

Chapitre 2 – Manuscrit #1

2.1. Avant-propos au Manuscrit #1

Comme nous l'avons abordé dans l'introduction, la transplantation cardiaque n'est plus considérée de nos jours comme une intervention expérimentale, mais bien comme une opération standardisée. Cependant, le contexte a considérablement changé ces dernières années en raison d'une pénurie de donneurs. Cette étude avait pour but de faire le point sur la situation contemporaine de la greffe cardiaque, et plus particulièrement sur la survie à très long terme (≥ 20 ans), et de la comparer aux résultats initiaux de l'expérience de l'Institut de Cardiologie de Montréal (ICM).

Dans ce manuscrit, le candidat au doctorat en sciences biomédicales vise à étudier, dans un groupe de 156 patients consécutifs greffés cardiaques, l'évolution à très long terme (>20 ans ou plus) (groupe 1) en comparaison aux patients décédés moins de 20 ans après l'intervention (groupe 2). Pour comparer les caractéristiques des premiers patients à celles des cas plus récents, nous avons fait un bilan des 5 années allant de 2010 à 2015 (groupe 3), en portant attention aux différences quant aux caractéristiques des donneurs et des receveurs.

Ces résultats nous permettront d'observer les limites de la transplantation cardiaque dans notre population actuelle constituée de receveurs plus âgés et plus malades, et recevant le cœur de donneurs plus âgés, tout en mettant en perspective la suite des travaux présentés dans les chapitres portant sur la thérapie cellulaire. Ce manuscrit est accepté pour publication dans le « *Canadian Journal of Surgery* » (*Can J Surg. 2017 Sep;60(5):305-310. doi: 10.1503/cjs.005716.*)

Changes in patient's characteristics following cardiac transplantation: the Montreal Heart Institute experience

A Nguyen,MD,MSc^{1*} N.Vistarini, MD,^{1,2*} M White,MD³ , N Racine, MD³, LP Perrault, MD, Ph.D,¹ A Ducharme, MD, MSc,³ D Bouchard, MD, Ph.D,¹ P Demers, MD,¹ M Pellerin, MD,¹ Y Lamarche, MD,¹ Y El-Hamamsy, MD, Ph.D¹ , Geneviève Giraldeau, MD³ , Guy Pelletier, MD³ and M Carrier, MD¹

*These authors contributed equally to this work.

Presented as an Oral Communication at 2015 Canadian Cardiovascular Congress

1. Department of Cardiac Surgery, Montreal Heart Institute, University of Montreal, Canada

2. Department of Clinical-Surgical, Diagnostic and Pediatric Sciences, Pavia University School of Medicine, Italy

3. Department of Medicine, Montreal Heart Institute, University of Montreal, Canada

Word Count: max 3177 abstract: 286

Short title: long-term survival after cardiac transplantation

Corresponding author and address reprint requests to:

Dr Michel Carrier

Department of Cardiac Surgery, Montreal Heart Institute, University of Montreal

5000 Bélanger Street East - H1T 1C8 - Montreal (Canada)

E-mail: micarrier@videotron.ca Tel: +1-514-376-3330 Fax: +1-514-376-1355

ABSTRACT

BACKGROUND - Heart transplantation is no longer considered an experimental operation, but rather a standard treatment; nevertheless the context has changed substantially in recent years owing to donor shortage. The aim of this study was to review the heart transplant experience focusing on very long-term survival (≥ 20 years) and to compare the initial results with the current era.

METHODS- From April 1983 through April 1995, 156 consecutive patients underwent heart transplantation. Patients who survived 20 years or longer (group 1) were compared with patients who died within 20 years after surgery (group 2). To compare patient characteristics with the current era, we evaluated our recent 5-year experience (group 3; patients who underwent transplantation between 2010 and 2015), focusing on differences in terms of donor and recipient characteristics.

RESULTS - Group 1 (n = 46, 30%) included younger patients (38 ± 11 v. 48 ± 8 yr, $p = 0.001$), a higher proportion of female recipients (28% v. 8%, $p = 0.001$) and a lower prevalence of ischemic heart disease (42% v. 65%, $p = 0.001$) than group 2 (n = 110, 70%). Patients in group 3 (n = 54) were older (52 ± 12 v. 38 ± 11 yr, $p = 0.001$), sicker (rate of hospital admission at transplantation 48% v. 20%, $p = 0.001$) and transplanted with organs from older donors (42 ± 15 v. 29 ± 11 yr, $p = 0.001$) than those in group 1.

CONCLUSIONS - Very long-term survival (≥ 20 yr) was observed in 30% of patients transplanted during the first decade of our experience. This outcome will be difficult to duplicate in the current era considering our present population of older and sicker patients transplanted with organs from older donors.

INTRODUCTION

Cardiac transplantation is the gold standard for patients with ischemic and nonischemic end-stage heart failure and is associated with a median survival exceeding 10 years.¹⁻³

This remarkable achievement of modern medicine was made possible with substantial improvements in the field of immunosuppression, infection prophylaxis and surgical techniques.^{1,4-11} Today, heart transplantation is no longer considered an experimental operation, but rather a standard treatment; nevertheless the context has changed substantially in recent years owing to donor shortage. With these concerns in mind, we decided to review the heart transplantation experience at the Montreal Heart Institute, focusing on patients who have experienced very long-term survival (≥ 20 yr).¹²⁻¹⁵ Our first objective was to determine the prevalence and characteristics of patients who achieved prolonged survival. The second objective was to compare these patients with those who had shorter survival in terms of recipient and donor characteristics. Finally, the third objective was to compare patient demographics in the first era with patients in our current practice, aiming to identify differences in terms of donor and recipient characteristics.

MATERIALS AND METHODS

Study population and study design

From April 1983 through April 2015, 425 consecutive patients underwent heart transplantation at the Montreal Heart Institute. We first analyzed patients who experienced very long-term survival (≥ 20 yr). For this reason, only patients transplanted before April 1995 were considered. Consequently, the study population for the present analysis is the group of patients who received transplants between April 1983 and April 1995 (156 consecutive patients). Patients who underwent a second heart transplantation were included in the analysis. To compare the transplant results of our initial experience with our current practice, we evaluated our recent 5-year experience (2010–2015), focusing on differences in terms of donor and recipient characteristics. We conducted a retrospective cohort study. Patients' clinical charts were reviewed, and pre-, intra- and postoperative data were prospectively recorded in an electronic database. We considered the following relevant clinical information for analysis: demographic characteristics of both donors and recipients (age, sex, race), cause of heart failure (HF; idiopathic, ischemic, miscellaneous), ischemic time of the transplanted heart, clinical preoperative status (active working or studying, at home stable, admitted to hospital with pharmacological support, admitted with mechanical support), time on the waiting list, long-term complications and causes of death. Patient follow-up involved regular visits at the specialized transplant clinic, with echocardiographic and/or hemodynamic controls and planned biopsies and coronary angiographies. All patients provided informed consent, and the Montreal Heart Institute Research Centre Ethics Committee approved the study protocol.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using analyses of variance and Fisher least significant difference (LSD) tests for continuous variables among the 3 groups and with χ^2 tests for categorical variables. Rates of survival, freedom from acute rejection, infection, chronic rejection characterized by any coronary lesions documented at angiographies and cancer were calculated according to actuarial analyses using the NCSS (2012) statistical system. We used the logrank test to study differences among the groups. Continuous variables are presented as means \pm standard deviations, and categorical variables are reported as frequencies (percentages). We developed a Cox regression model to study donor and recipient variables associated with late survival. We considered results to be significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Patients surviving 20 years after transplantation (1983–1995)

Preoperative characteristics of patients who underwent cardiac transplantation between 1983 and 1995 ($n = 156$) are shown in Table 1. Patients who survived 20 years or longer were included in group 1 ($n = 46$), whereas patients who died within 20 years of transplantation were included in group 2 ($n = 110$). Overall, 30% of patients transplanted during the first decade of our experience survived 20 years or more. The cumulative mean survival of the whole population was $35\% \pm 4\%$ 20 years after transplantation, and the median survival was 15 years (Fig. 1). All patients who underwent mechanical support in this era of our experience with left ventricular assist devices (LVAD) or total artificial hearts (TAH) waited in the hospital in status 4 (the most urgent status). Immunosuppression varied according to study periods, although the basic treatment was based on triple drug therapy including cyclosporine, azathioprine and prednisone in groups 1 and 2, and tacrolimus, mycophenolate mofetil (MMF) and prednisone in group 3. The treatment was individualized to allow prednisone tapering and cessation if it was possible in a case by case approach (Table 1). Causes of death for patients in group 2 were cancer ($n = 21$); myocardial infarction, chronic rejection or graft vasculopathy ($n = 18$); graft failure ($n = 15$); acute rejection ($n = 5$); renal failure ($n = 6$); bleeding ($n = 6$); pancreatitis ($n = 6$); sepsis ($n = 5$); stroke ($n = 3$); cardiac failure ($n = 4$); respiratory infection ($n = 2$); arrhythmias ($n = 1$); other infections ($n = 1$); hepatic failure ($n = 1$); and sudden death ($n = 1$). In 15 patients, the cause of death was unknown. As shown in Table 1, group 1 included younger patients (mean age 38 ± 11 v. 48 ± 8 yr, $p = 0.001$), a greater proportion of women (28% v. 8%, $p = 0.001$) and a lower prevalence of ischemic heart disease (42% v. 65%, $p = 0.001$) than group 2. Of interest, the number of Human Leukocyte Antigen - antigen D Related (HLADR) mismatches was similar in the 2 groups. Four patients in group 1 underwent a second heart transplant for chronic rejection or

transplant vasculopathy 14 ± 4 years after their initial graft. Freedom rates from cancer and chronic rejection, the 2 main causes of adverse long-term outcome, are shown in Figure 2 and Figure 3, respectively. Although patients in group 1 showed a significantly lower incidence of cancer than patients in group 2 ($p = 0.005$), the rate of allograft vasculopathy was similar in both groups ($p = 0.96$).

The current era (2010–2015)

Table 1 also shows the preoperative characteristics of patients transplanted between 2010 and 2015 (group 3), who represent our current population of candidates. Patients in group 3 were older (mean age 52 ± 12 v. 38 ± 11 yr, $p = 0.001$), sicker (rate of hospital admission at transplantation 48% v. 20% , $p = 0.001$) and transplanted with organs from older donors (mean age 42 ± 15 v. 29 ± 11 yr, $p = 0.001$) than patients in group 1. It is important to recognize that 12 patients (22%) in group 3 were on mechanical support with LVAD or TAH before undergoing transplantation. Eight patients waited in hospital in status 4, and 4 patients waited at home in status 3 (urgent, but the patient can wait at home) before transplantation. Actuarial survival 5 years after transplantation averaged $71\% \pm 2\%$ in group 3 and $76\% \pm 3\%$ in groups 1 and 2. The freedom rate from acute rejection 1 year after transplantation averaged $37\% \pm 7\%$ in group 1, $41\% \pm 5\%$ in group 2 and $85\% \pm 5\%$ in group 3 ($p = 0.001$). A Cox regression multivariate analysis including all 11 variables reported in Table 1 showed that younger age of recipients (relative risk 1.04, $p < 0.001$) was the only characteristic associated with late survival.

DISCUSSION

Results from the present study show that one-third of the patients who underwent cardiac transplantation during the first decade of our experience achieved a long-term survival of 20 years or more. Patients with shorter survival after transplantation were older at the time of surgery and were more likely to have ischemic heart disease before transplantation.

Furthermore, in the current era, patients and organs transplanted were both significantly older than in our initial group of long-term survivors. Heart transplantation has made substantial progress in the last 50 years, with dramatic improvements in different fields, such as immunosuppression^{8,9} and prevention of infectious complications.^{10,11} As reported by the International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) in 2013, the median survival after cardiac transplantation in adults has increased from 8.4 years between 1982 and 1991 to 10.7 years between 1992 and 2011 and has remained at 11 years in 2012.¹ Several experienced centres have reported remarkable long-term outcomes after heart transplantation, with survival rates up to 56% at 15 years.^{12–15} In this regard, our long-term results compare favourably with the published literature and with other Canadian centres,^{16,17} with a 35% survival rate at 20 years. Moreover, acute rejection episodes were significantly reduced in group 3 patients, who were administered long-term tacrolimus and MMF immunosuppression. Patients who experienced better long-term survival were younger (<40 yr), were more likely to be women, were less frequently affected by ischemic heart disease and, in most cases, were in stable clinical condition at the time of transplantation. Although, the incidence of cardiac allograft vasculopathy was similar in both groups, cancer was a significant cause of death in patients who experienced a shorter survival after transplantation (Fig. 2 and Fig. 3). The Stanford group¹⁵ reported similar results, with long-term survivors being significantly younger at the time of transplantation (35.0 ± 10.5 yr) and with a lower prevalence of

coronary artery disease than shorter term survivors. Others have also reported excellent long term survival after cardiac transplantation in cohorts of patients who were younger at the time of transplantation and who had a greater prevalence of nonischemic cardiomyopathy.^{13,14} The causes of death among patients with longer survival after transplantation, in our experience, were similar to those reported in the literature, with chronic rejection or coronary allograft vasculopathy and cancer being the 2 major causes of death.¹ The 2002 report of the ISHLT showed that age distribution of heart transplant recipients has changed between the periods 1985–1996 and 1997–2001, with an increase in the proportion of patients between 50 and 64 years old.² Moreover, as stated in the 2013 report of the ISHLT, the current median age of a cardiac transplant recipient was 54 years.¹ In addition to being older, a substantial proportion of patients currently awaiting transplant are in unstable clinical conditions, with a preoperative hospitalization rate of 44% and a need for intravenous drugs in 42%, and they are supported by different types of mechanical circulatory devices (intra-aortic balloon 6%, LVAD 29%, right ventricular assist device 4%, extracorporeal membrane oxygenation 1%).¹ This new reality and the increasing use of ventricular assist devices is a reflection of the extreme shortage of donor organs, which greatly limits the number of patients who can receive a heart transplant. For this reason, we compared the characteristics of our long-term survivors (group 1) with our cohort of patients transplanted during the most recent 5-year period (group 3). This latter group reflects more accurately the present population of patients on the waiting list. These patients are older and more often hospitalized and on inotropes, short-term mechanical support or with device-related complications. In addition to having a higher risk profile, they undergo transplantation with organs from older donors (so-called marginal), which is associated with an increased risk of death and allograft failure.^{18–20} Furthermore, the shortage of donor organs is also associated with longer waiting time and the possibility of further clinical deterioration while on the waiting list.

CONCLUSIONS

Very long-term survival (≥ 20 yr) has been achieved in almost one-third of patients who received transplants during the first decade of our experience. This outcome will be difficult to match in the current era, considering our present population of older and sicker patients receiving organs from older donors. In the near future, a greater use of increasingly refined ventricular assist devices used as destination therapy may provide the ideal solution for many patients with advanced heart failure. Nevertheless, cardiac transplantation will certainly remain, for a long time, the best available treatment option of advanced heart failure for select patients.

AFFILIATIONS: From the Department of Cardiac Surgery, Montreal Heart Institute and Université de Montréal, Montreal, Que. (Vistarini, Nguyen, Perrault, Bouchard, Demers, Pellerin, Lamarche, El-Hamamsy, Carrier); and the Department of Medicine, Montreal Heart Institute and Université de Montréal, Montreal, Que. (White, Racine, Ducharme, Giraldeau, Pelletier).

COMPETING INTERESTS: None declared.

CONTRIBUTORS: All authors designed the study, acquired and analyzed the data, wrote and reviewed the article, and approved the final version for publication.

REFERENCES

1. Lund LH, Edwards LB, Kucheryavaya AY, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirtieth official adult heart transplant report-2013; focus theme: age. *J Heart Lung Transplant* 2013;32:951-64.
2. Hertz MI, Taylor DO, Trulock EP, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: nineteenth official report-2002. *J Heart Lung Transplant* 2002;21:950-70.
3. Wilhelm MJ. Long-term outcome following heart transplantation: current perspective. *J Thorac Dis* 2015;7:549-51.
4. Aziz T, Burgess M, Khafagy R, et al. Bicaval and standard techniques in orthotopic heart transplantation: medium-term experience in cardiac performance and survival. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;118:115-22.
5. Jacob S, Sellke F. Is bicaval orthotopic heart transplantation superior to the biatrial technique? *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2009;9:333-42.
6. Vistarini N, Pellegrini C, Aiello M, et al. Should we perform heart retransplantation in early graft failure? *Transpl Int* 2010;23:47-53.
7. Eisen HJ, Tuzcu EM, Dorent R, et al. Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients. *N Engl J Med* 2003;349:847-58.
8. Kobashigawa JA, Miller LW, Russell SD, et al. Tacrolimus with mycophenolate mofetil (MMF) or sirolimus vs cyclosporine with MMF in cardiac transplant patients: 1-year report. *Am J Transplant* 2006;6:1377-86.
9. Guethoff S, Meiser BM, Groetzner J, et al. Ten-year results of a randomized trial comparing tacrolimus versus cyclosporine a in combination with mycophenolate mofetil after heart transplantation. *Transplantation* 2013;95:629-34.
10. Fishman JA, Rubin RH. Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 1998;338:1741-51.
11. Merigan TC, Renlund DG, Keay S, et al. A controlled trial of ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after heart transplantation. *N Engl J Med* 1992;326:1182-6.
12. Roussel JC, Baron O, Perigaud C, et al. Outcome of heart transplants 15 to 20 years ago: graft survival, post-transplant morbidity, and risk factors for mortality. *J Heart Lung Transplant* 2008;27:486-93.

13. Ozduran V, Yamani MH, Chuang HH, et al. Survival beyond 10 years following heart transplantation: The Cleveland Clinic Foundation experience. *Transplant Proc* 2005;37:4509-12.
14. Rodriguez Cetina Biefer H, Sundermann SH, Emmert MY, et al. Surviving 20 years after heart transplantation: a success story. *Ann Thorac Surg* 2014;97:499-504.
15. Deuse T, Haddad F, Pham M, et al. Twenty-year survivors of heart transplantation at Stanford University. *Am J Transplant* 2008;8:1769-74.
16. Davies RA, Badovinac K, Haddad H, et al. Heart transplantation at the Ottawa Heart Institute: comparison with Canadian and International results. *Artif Organs* 2004;28:166-70.
17. Saito A, Novick RJ, Kiaii B, et al. Early and late outcomes after cardiac retransplantation. *Can J Surg* 2013;56:21-6.
18. Bernhardt AM, Reichenspurner H. High-risk donors: extending our criteria in times of organ shortage. *Curr Opin Organ Transplant* 2014;19:494-9.
19. Lietz K, John R, Mancini DM, et al. Outcomes in cardiac transplant recipients using allografts from older donors versus mortality on the transplant waiting list; implications for donor selection criteria. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:1553-61.
20. Bennett LE, Edwards EB, Hosenpud JD. Transplantation with older donor hearts for presumed 'stable' recipients: an analysis of the Joint International Society for Heart and Lung Transplantation/United Network for Organ Sharing Thoracic Registry. *J Heart Lung Transplant* 1998;17:901-5.

FIGURE LEGENDS

Figure 1.

Kaplan-Meier curve for survival after cardiac transplantation for patients operated between 1984 and 1995. One, 5, 10, 15- and 20-year patient survival averaged $84\pm 3\%$, $76\pm 3\%$, $69\pm 4\%$, $49\pm 4\%$ and $35\pm 4\%$. The number of patients at risk is shown at the bottom of the graft.

Figure 2.

Freedom from cancer after cardiac transplantation. The freedom rate from cancer at 10 and 20 years after transplantation averaged $82\pm 6\%$ and $61\pm 7\%$ in group 1 and $64\pm 6\%$ and $30\pm 9\%$ in group 2. The difference was statistically significant using Logrank test ($p=0.005$).

Figure 3.

Freedom from development of graft vasculopathy. Ten- and 15-years freedom from allograft vasculopathy (also called chronic rejection), defined by any coronary artery lesions at planned and unplanned coronary angiography, averaged $44\pm 7\%$ and $39\pm 7\%$ in group 1, and $46\pm 6\%$ and $36\pm 6\%$ in group 2. The difference was not statistically significant ($p=0.96$).

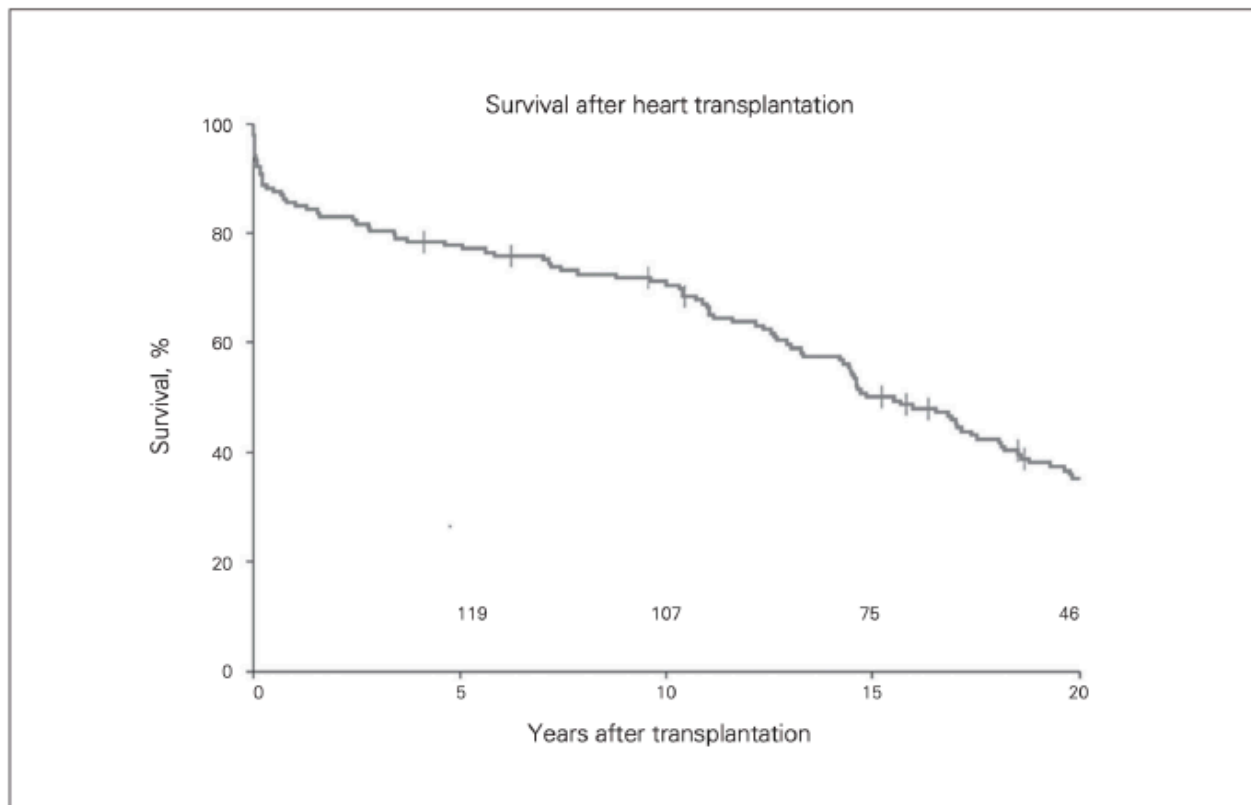


Fig. 1. Kaplan–Meier curve for survival after cardiac transplantation for patients operated between 1984 and 1995. Patient survival at 1, 5, 10, 15 and 20 years averaged $84\% \pm 3\%$, $76\% \pm 3\%$, $69\% \pm 4\%$, $49\% \pm 4\%$ and $35\% \pm 4\%$, respectively. The number of patients at risk is shown at the bottom of the graph.

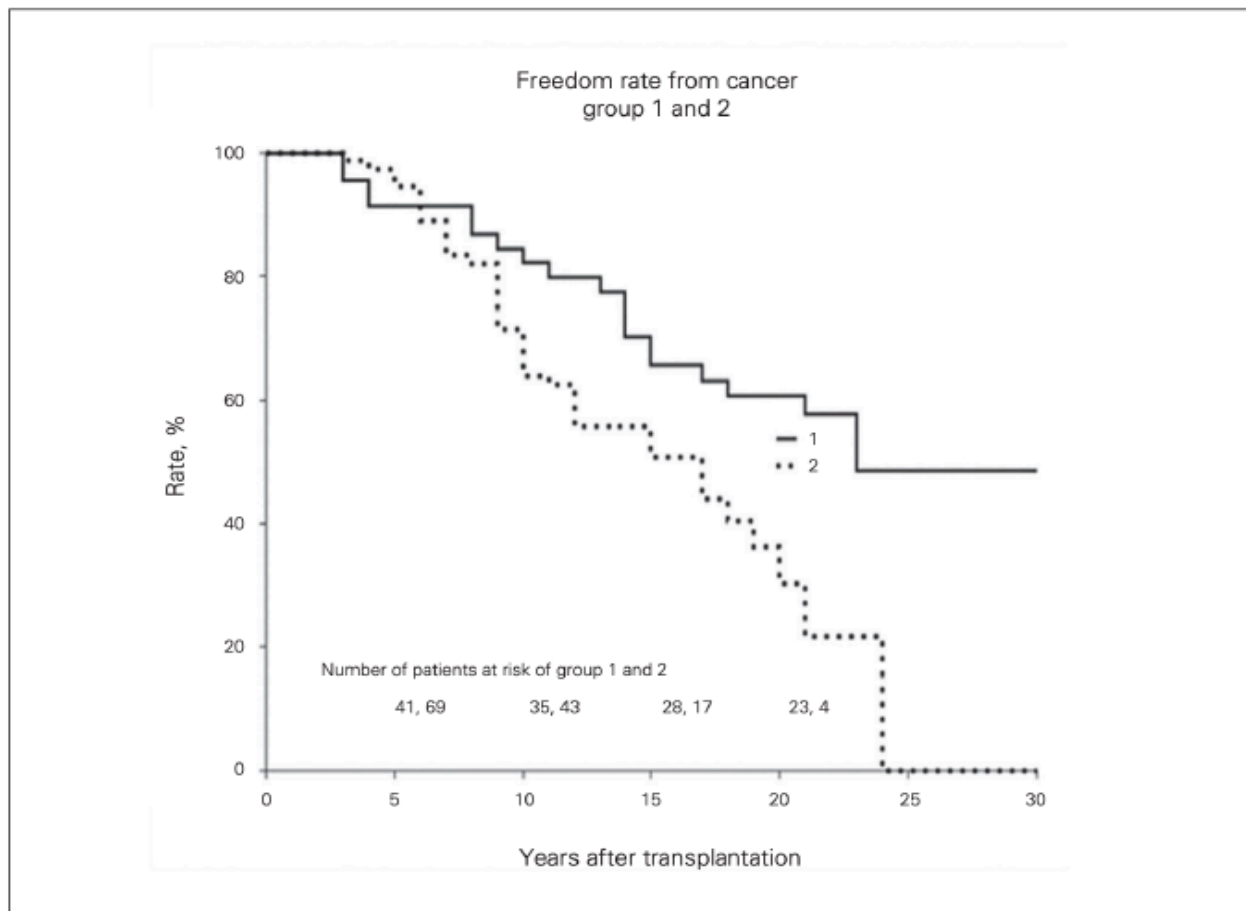


Fig. 2. Freedom from cancer after cardiac transplantation. The freedom rate from cancer averaged $82\% \pm 6\%$ and $61\% \pm 7\%$, respectively, 10 and 20 years after transplantation in group 1 patients compared with $64\% \pm 6\%$ and $30\% \pm 9\%$, respectively, in group 2. The difference was significant using the log-rank test ($p = 0.005$).

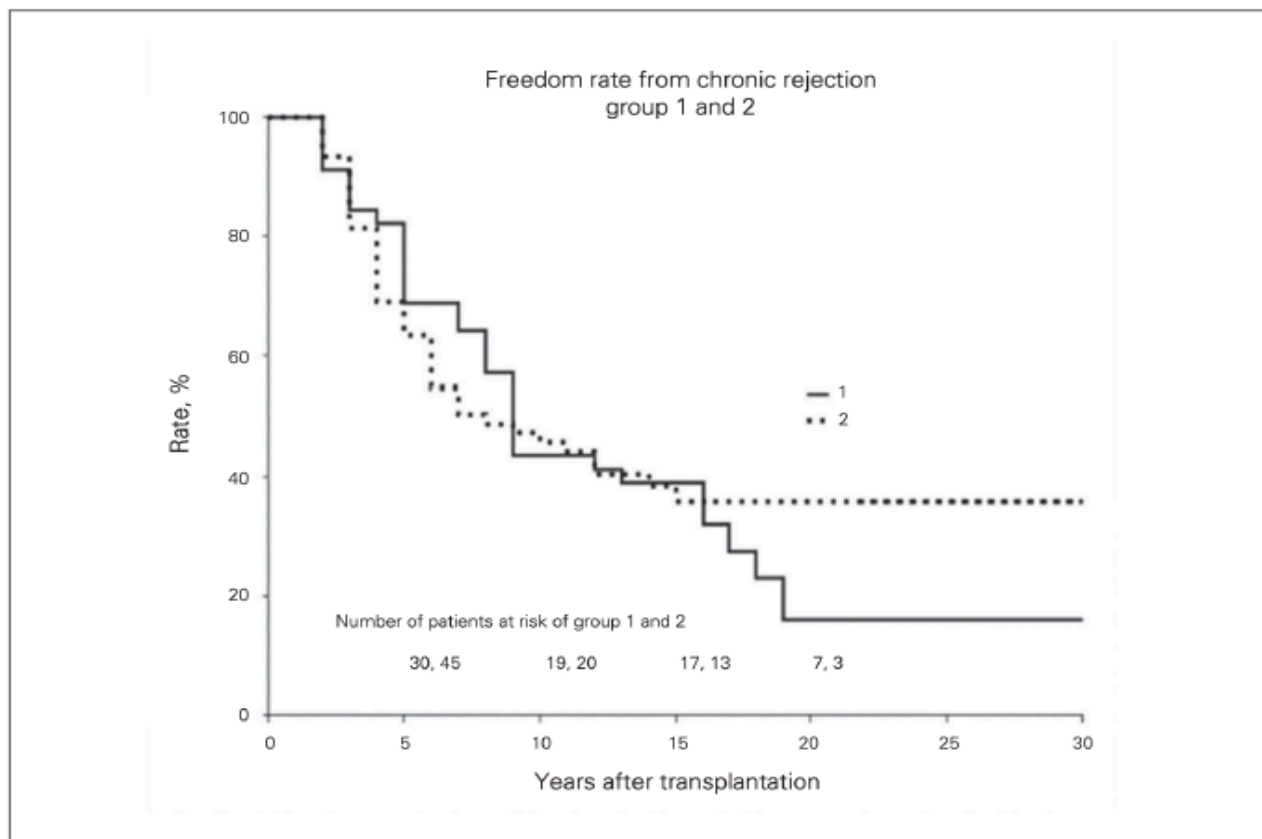


Fig. 3. Freedom from development of graft vasculopathy. The freedom rate from allograft vasculopathy (also called chronic rejection), defined by any coronary artery lesions at planned and unplanned coronary angiography, averaged $44\% \pm 7\%$ and $39\% \pm 7\%$, respectively, 10 and 15 years after transplantation in patients of group 1 compared with $46\% \pm 6\%$ and $36\% \pm 6\%$, respectively, in group 2 patients. The difference was not significant ($p = 0.96$).

TABLE 1. Characteristics of patients in Group 1, 2 and 3

Table 1. Demographic and clinical characteristics of the study sample				
Characteristic	Group; mean \pm SD or no. (%)			ρ value
	Group 1, \geq 20 yr survival ($n = 46$)	Group 2, $<$ 20 yr survival, ($n = 110$)	Group 3, 2010–2015, ($n = 54$)	
Recipient age, yr	38 \pm 11	48 \pm 8	52 \pm 12	0.001
Recipients, female sex	13 (28)	9 (8)	11 (20)	0.004
Donor age, yr	29 \pm 11	27 \pm 10	42 \pm 15	0.001
Donors, female sex	20 (43)	28 (25)	13 (24)	0.05
Ischemic time, min	141 \pm 43	136 \pm 47	137 \pm 54	0.86
Waiting time, d	119 \pm 179	101 \pm 110	99 \pm 140	0.73
Diagnosis pretransplant				0.001
Idiopathic	14 (30)	21 (19)	22 (41)	
Ischemic	19 (42)	71 (65)	10 (18)	
Other	13 (28)	18 (16)	22 (41)	
Status pretransplant				0.001
Work/home	37 (80)	99 (90)	28 (52)	
Hospital, IV drugs, VAD or TAH	9 (20)	11 (10)	26 (48)	
LVAD and TAH before transplantation	7 (15)	12 (11)	12 (22)	
No. of HLA-DR mismatches				0.86
0	1	1		
1	13	28		
2	25	54		
Immunosuppression	Cyclosporine-based	Cyclosporine-based	Tacrolimus-based	

HLA-DR = Human Leukocyte Antigen - antigen D Related; IV = intravenous; SD = standard deviation; TAH = total artificial heart; VAD = ventricular assist device.

Chapitre 3 – Assistance mécanique de longue durée

3.1. Introduction

L'IC continue d'être un problème de santé publique de plus en plus préoccupant auquel notre pays est confronté aujourd'hui. Le vieillissement continu de la population a contribué à l'augmentation de l'incidence et de la prévalence de l'insuffisance cardiaque. À l'heure actuelle, environ 5 millions de personnes sont touchées et plus de 500 000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année. Sur le plan économique, cela représente plus de 30 milliards de dollars en dépenses de santé chaque année.^{3, 7} En dépit des progrès dans la compréhension des changements neuro-hormonaux impliqués dans la progression de l'IC et des améliorations dans le traitement médical, l'histoire naturelle de la maladie dicte un pronostic sombre. Dans l'étude Framingham, l'IC congestive a entraîné une survie médiane de 1.7 ans chez les hommes et de 3.2 ans chez les femmes, avec des taux de survie à 5 ans de 25% et 38% respectivement¹⁴⁰. On estime que l'IC congestive est responsable d'environ 250 000 décès par an.¹⁴¹

La transplantation cardiaque est considérée comme le traitement de référence en matière d'IC. Cependant, les restrictions liées à la disponibilité des organes de donateurs ont fait de la greffe une option viable pour seulement un très petit pourcentage de cette population grandissante.¹⁴² Au cours de la dernière décennie, le nombre de transplantations effectuées chaque année est resté entre 3000 et 5000 de par le monde, avec une tendance à la légère baisse constatée ces dernières années¹³⁰.

Le support mécanique du système cardiopulmonaire a été introduit pour la première fois en clinique par John Gibbon en 1953, lorsqu'il a utilisé avec succès le pontage cardiopulmonaire pour la réparation d'une communication inter auriculaire¹⁴³. En 1963, DeBakey a implanté le premier dispositif d'assistance ventriculaire chez un patient en arrêt cardiaque suite au remplacement de la valve aortique. Le patient est décédé ultérieurement au quatrième jour postopératoire. En 1966, DeBakey publiait le premier sevrage réussi avec l'implantation d'un dispositif d'assistance ventriculaire pneumatique chez un patient souffrant de choc post-cardiotomie. Le patient a été pris en charge pendant 10 jours et a finalement survécu jusqu'à sa sortie.¹⁴⁴ Peu de temps après, Cooley annonçait le premier pont réussi vers la transplantation à l'aide d'un cœur artificiel implantable pneumatique.

Pendant ce temps, l'Institut national du Cœur, Poumons et du Sang a débuté le financement des développements de dispositifs d'assistance ventriculaire et d'un cœur artificiel total. DeVries et

ses collègues ont publié l'implantation réussie du cœur artificiel total Jarvik-7-100 en 1984.¹⁴⁵ Malgré les premiers succès remportés, une fréquence élevée de complications thromboemboliques et infectieuses avait conduit à un moratoire sur l'utilisation du cœur artificiel total en 1991. Au cours de cette période, cependant, les progrès continus dans le développement de dispositifs d'assistance ventriculaire gauche ont abouti à l'approbation, par la FDA (Food and Drug Administration), d'un dispositif d'assistance ventriculaire gauche comme pont vers la transplantation en 1994.

L'essai REMATCH de 2004 a validé la faisabilité du traitement de l'IC au stade terminal par assistance mécanique comparé au traitement médical seul¹⁴⁶. Dans le même temps, les limitations de la technologie actuelle des dispositifs ont été mises en évidence par l'incidence d'événements indésirables liés au support mécanique, tels qu'une infection, une défaillance du dispositif et des événements thromboemboliques. Des développements technologiques continus et des améliorations dans la conception des appareils sont nécessaires pour que l'assistance circulatoire mécanique devienne un moyen efficace de thérapie de destination à long terme.

3.2. Assistance bi ventriculaire

Les patients en choc cardiogénique présentant une défaillance bi ventriculaire irréversible peuvent être assistés par dispositifs d'assistance ventriculaire (BiVAD) ou cœur artificiel total (CAT)¹⁴⁷. Ce type d'assistance s'adresse aux patients candidats à la transplantation mais dont l'état hémodynamique les empêche d'attendre pour un donneur, ou les patients dont l'assistance ventriculaire gauche ne serait pas adéquate.

La défaillance cardiaque droite suivant l'implantation d'un LVAD est un facteur de risque majeur de morbi-mortalité pour ces patients.¹⁴⁸ Amsallem et al. ont démontré que la survie après implantation d'un LVAD était moins bonne en cas d'IC droite et encore moins bonne en cas de nécessité de RVAD (92% vs 70% vs 39% respectivement).^{149, 150} La survenue d'une défaillance cardiaque droite après LVAD varie entre 9-30% avec les pompes de nouvelles générations.¹⁵⁰ Chez ces patients avec FEVG diminué et IC droite modérée à sévère, les stratégies thérapeutiques incluent la transplantation, le CAT, un LVAD avec un RVAD temporaire (Centrimag, ECMO droite-droite), ou une assistance biventriculaire paracorporelle (BiVAD).¹⁵⁰⁻¹⁵³

Ces assistances mécaniques utilisent des pompes pneumatiques pulsatiles. En outre, l'implantation chirurgicale dans un contexte d'urgence, le saignement péri opératoire, les complications neurologiques ou infectieuses, et enfin la possibilité de retour à domicile du patient sont totalement dépendantes du type de support mécanique¹⁵⁴.

Actuellement, aucune étude randomisée ne compare ces dispositifs (BiVAD vs CAT vs LVAD+RVAD temporaire), bien que les bons résultats de ces assistances aient été publiés séparément. La décision est donc généralement basée sur les stratégies institutionnelles ou les préférences du chirurgien.

Comme l'a rapporté le « Groupe de Réflexion sur l'Assistance Mécanique »¹³², aucune différence en termes de mortalité postopératoire ni en termes de survie sous assistance et après transplantation cardiaque n'a été retrouvé chez les patients assistés par dispositifs ventriculaires para corporels (PVADs)¹⁵⁵, ventriculaires implantables (IVADs)^{156, 157} ou par cœur artificiel total (CAT)^{133, 134, 158, 159}. Néanmoins, cette étude présentait plusieurs limites :

(1) les données ont été extraites de la base multicentrique, française "Groupe de Réflexion sur l'Assistance Mécanique » (GRAM), qui englobe une population relativement homogène de patients ayant bénéficié en première intention d'une assistance bi ventriculaire.

Le registre national français était rempli sur le mode du volontariat de façon rétrospective et non exhaustive^{132,160}

(2) Les données préopératoires cliniques et biologiques étaient manquantes pour plus de 50% des patients.

(3) Par ailleurs, aucun contrôle n'a pu être réalisé concernant le choix spécifique des patients, la sélection du type d'assistance, le délai d'implantation ainsi que la gestion post-opératoire, chacun de ces paramètres pouvant affecter les résultats.

3.3. Description des appareils d'assistances

3.3.1. Thoratec (BiVAD)

Le Thoratec© BiVAD (Thoratec Corp, Pleasanton, CA) est un dispositif d'assistance ventriculaire para corporel (PVAD) permettant un support mécanique pour les patients de toute taille.

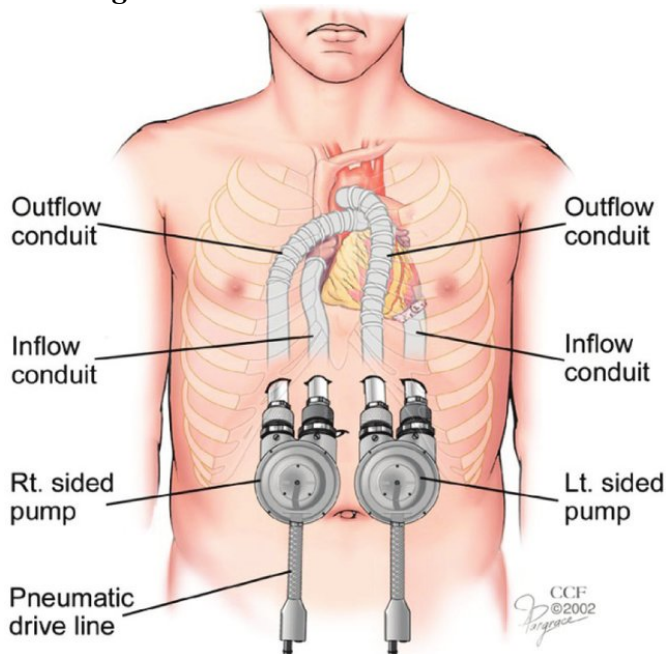
Celui-ci est constitué de 3 composants :

(1) une pompe sanguine, dont le volume d'éjection est de 65 ml et permettant de délivrer un flux pulsatile entre 1.3 et 7.1 L/min.

(2) deux canules, connectant la pompe au cœur et

(3) une console de contrôle délivrant l'énergie nécessaire à la pompe pneumatique. Le BiVAD est placé de façon para corporelle sur la partie antérieure de l'abdomen. La canulation du LVAD est réalisée entre l'apex du ventricule gauche (entrée) et l'aorte ascendante (sortie). Le RVAD est implanté via l'oreillette droite ou plus rarement le ventricule droit (entrée) et l'artère pulmonaire (sortie). Durant l'implantation, une échographie trans-oesophagienne permet de détecter un foramen ovale permanent éventuel et la bonne orientation des canules du BiVAD.

Figure 15. – Illustration du Thoratec PVAD (Abbott Laboratories, IL, USA)



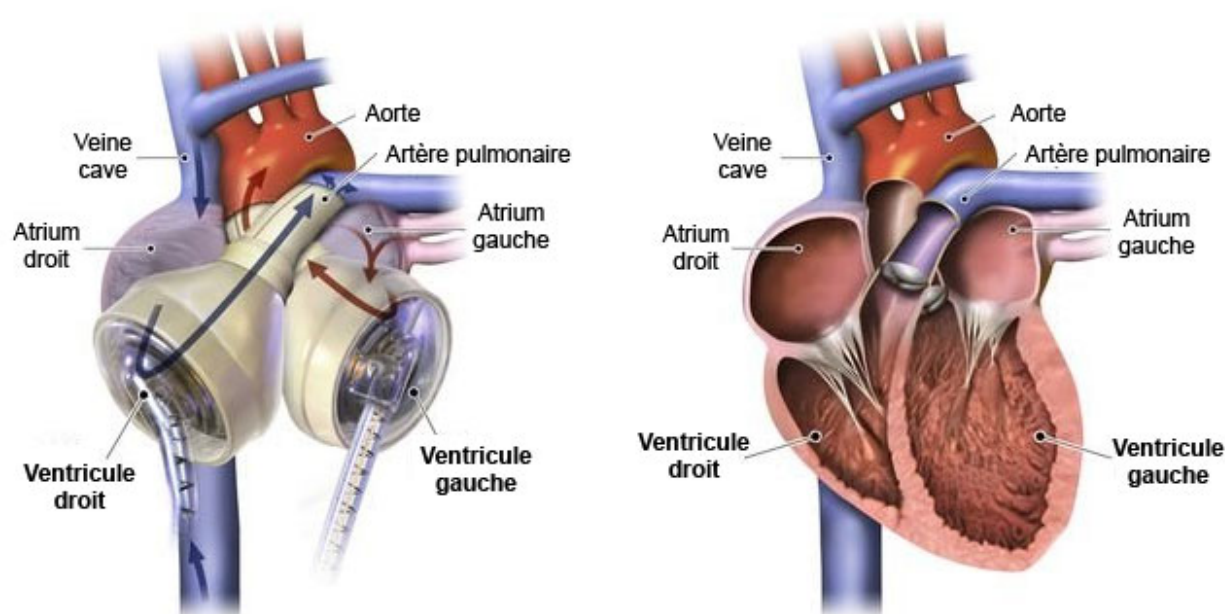
3.3.2. Cœur Artificiel Total Syncardia (CAT)

Le Cœur Artificiel Total Syncardia (SynCardia Systems Inc, Tucson, AZ) est un système d'assistance biventriculaire pulsatile, pneumatique, et totalement implantable de façon orthotopique. Les deux ventricules de polycarbonate sont indépendants et présentent un volume d'environ 750 ml. L'entrée et la sortie des valves Medtronic-Hall délivre un flux unidirectionnel.

Le diaphragme 4 couches en polyuréthane séparant l'air du sang est mobilisé d'avant en arrière au moyen d'un système pulsatile à air comprimé contrôlé par une console externe. Le volume d'éjection délivré par le CAT est de 70 ml. Au vu de la taille de ces ventricules, la cavité thoracique du patient receveur doit être suffisamment grande pour pouvoir accueillir le dispositif et permettre la fermeture du sternum. Les critères d'éligibilité sont une surface corporelle (BSA) $>1.5-1.7 \text{ m}^2$ et une distance de plus de 10cm entre le sternum et la vertèbre thoracique Th10. Une version de 50cc est désormais disponible afin de pouvoir étendre les indications aux enfants et adultes de petit gabarit dont le BSA est de $1.0-1.2 \text{ m}^2$. Après excision complète des deux ventricules ainsi que des valves natives, le CAT est implanté directement sur les oreillettes du receveur. Ainsi, aucune chance de récupération d'organe n'est possible avec ce dispositif. Enfin, la disponibilité d'un contrôleur portatif Freedom qui autorise potentiellement le retour à domicile est un avantage du CAT par rapport au BiVAD.¹⁶¹

Les indications claires du CAT demeurent les communications interventriculaires post-infarctus non réparables¹⁶², le rejet aigu ou chronique post-transplantation, l'infarctus massif du myocarde,¹⁶³ les tumeurs intracardiaques¹⁶⁴, les thromboses massives intracardiaques, les pathologies congénitales (échec de Fontan)¹⁶⁵, et les cardiomyopathies hypertrophiques sévères.

Figure 16. – Illustration du CAT Syncardia (Syncardia Systems, Tucson, AZ, USA)



3.3.3. Comparaison des deux dispositifs

Peu d'études ont comparé les deux dispositifs d'assistance lourde. Cette étude publiée par le groupe de la Pitié-Salpêtrière concluait¹⁶⁶ :

(1) Aucune différence significative en termes de survie sous assistance et jusqu'à 5 ans après la transplantation cardiaque n'a été trouvée chez les patients assistés par BiVAD ou CAT (76% vs 77% à 1 an ; 58% vs 70% à 5 ans, $p=0.6$)

(2) Les patients sous BiVAD sont exposés à un risque accru de complications neurologiques (24% vs 12%, $p=0.08$) comparé au CAT.

(3) Les infections de canules et les reprises chirurgicales pour hémorragie étaient similaires dans les deux groupes (BiVAD vs CAT : infections 3% vs 1% ; hémorragies 42% vs 23% respectivement)

(4) 16% des CAT ont pu regagner leur domicile.

Arabia et al. avait rapporté des résultats similaires selon le registre INTERMACS. Sur les 450 patients ayant reçu le CAT, en classe INTERMACS 1 ou 2, 59% ont pu être transplanté avec une survie globale à 1 an de 53%.¹⁶⁷

De même, ces résultats sont superposables à ceux publiés par Cheng et al. comparant la survie de 212 CAT vs 366 patients recevant un BivAD.¹⁶⁸ Bien qu'aucune information sur les caractéristiques cliniques des patients n'ait été renseigné, la survie sous assistance et post transplantation était similaire entre les deux groupes. Les auteurs concluaient que les deux stratégies étaient valables, le CAT étant préférable dans les patients avec arythmies ventriculaires et pathologies restrictives, alors que le BiVAD est préféré chez les patients de plus petit gabarit. L'étude de la Pitié-Salpêtrière s'est quant à elle focalisée sur les données de 2 centres universitaires travaillant dans la même zone géographique et a permis de colliger les données cliniques et biologiques préopératoires dans plus de 80% des patients. Cette analyse de ces deux populations était donc à la fois beaucoup plus précise et homogène.

Les patients sous BiVAD présentaient une cytolyse hépatique et un taux de leucocytes plus élevés, ainsi qu'une pression artérielle moyenne plus basse que les patients sous CAT. Ces patients sont arrivés dans des conditions beaucoup plus précaires et urgentes à l'hôpital Henri Mondor (Créteil, France). Le taux d'IAM était plus important dans le groupe BiVAD et il y avait une tendance à plus d'arrêt cardiorespiratoire les 24 heures avant implantation. En revanche, la

population ayant bénéficié du CAT présentait un taux de ré-opération plus important (23%), l'utilisation de l'hémofiltration (10%) et de l'ECMO préopératoire (22%) y étaient plus fréquent que dans le groupe BiVAD. L'histoire de la maladie cardiaque menant à l'IC terminale semblait donc plus chronique dans le groupe CAT avec la volonté de stabiliser le malade afin de l'amener dans les meilleures conditions pour l'implantation de l'assistance mécanique.

Le but initial de cette étude était de comparer l'influence du type d'assistance sur une même population, mais aux vues des résultats cliniques et biologiques préopératoires, il semblerait que les deux populations étudiées n'étaient pas strictement identiques. Il s'agit donc plus de comparaison de deux approches thérapeutiques sur deux populations sensiblement différentes. La stratégie thérapeutique de l'hôpital Mondor semble plus agressive au vu de la gravité des patients, puisque ceux-ci sont implantés par BiVAD directement. En revanche, l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière semble privilégier une approche en deux étapes. Dans un premier temps, le patient pouvant bénéficier d'une assistance bi ventriculaire sera, si possible, stabilisé par hémofiltration ou ECMO ; puis dans un second temps, être assisté par CAT. Le caractère réversible du Thoratec BiVAD par rapport au Cardiowest CAT permet en partie de comprendre cette stratégie. Par ailleurs, les deux assistances biventriculaires ont des fonctionnalités quelque peu différentes. En effet, Le BiVAD¹⁶⁹ est une assistance de moyen terme permettant de fournir un débit continu à des patients de toute taille, et est indiqué comme pont à la transplantation ou à la récupération post cardiectomie.

Le CAT^{158, 159, 167} quant à lui, est une assistance de plus longue durée dont l'avantage en termes de survie a été montré surtout après 90 jours d'assistance. Ceci pourrait être expliqué par un plus faible risque d'accidents thromboemboliques que le BiVAD.¹⁶⁷

Ce système d'assistance avait pour objectif de pouvoir remplacer, du moins en partie, la transplantation cardiaque due au manque de greffon en France. Rappelons que le CAT est le seul cœur artificiel à avoir reçu l'approbation de la « Food and Drug Administration » en tant que « thérapie définitive », capable de restaurer la circulation sanguine chez des patients extrêmement précaire et en IC terminale. Le problème de ne pas pouvoir transplanter des patients stables sous assistance mécanique circulatoire de longue durée contraint les équipes à attendre un événement défavorable comme l'infection ou l'accident thromboembolique, alors même qu'il existe un laps de temps optimal permettant la plus faible allo immunisation et le plus faible risque opératoire lors de la transplantation. Il serait intéressant de pouvoir modifier les critères d'éligibilité à la

greffe pour les patients sous assistance circulatoire et en relativement bonne condition physique et cela a déjà été modifié en Amérique du Nord.¹⁷⁰

Nous avons vu avec l'expérience de la Pitié Salpêtrière que l'ECMO permet de stabiliser le patient arrivant dans les situations critiques de défaillance cardiaque. Ce système d'assistance temporaire comme « pont à la décision » permet de mieux sélectionner les patients pouvant avoir accès à l'assistance bi ventriculaire de longue durée. Il faut noter cependant que les patients ayant bénéficié d'une ECMO veino-artérielle puis ayant développé un syndrome de détresse respiratoire aigu après implantation du CAT, ont une mortalité de près de 87% dans cette série. Ceci peut s'expliquer par le shunt quasi complet de la circulation pulmonaire sous ECMO et le fait de rétablir brutalement l'afflux de sang dans l'artère pulmonaire entrainerait un défaut d'adaptation du réseau pulmonaire avec microlésions au niveau des capillaires.

Par ailleurs, Smedira et al. a montré que les facteurs de risques de mortalité incluait une durée d'assistance mécanique plus longue, l'utilisation de plusieurs types d'assistance circulatoire, l'immuno-sensibilisation globale, et une fonction rénale diminuée.¹⁷¹ La conclusion de cette étude était que débiter l'assistance circulatoire mécanique de façon précoce avec un seul type de dispositif définitif pouvait améliorer la survie sous assistance et après transplantation cardiaque. Une transplantation précoce permettant d'éviter l'infection, l'immuno-sensibilisation et les complications neurologiques, améliorerait la survie sous assistance et après transplantation. L'étude du GRAM a d'ailleurs montré qu'il existait un délai optimal de transplantation sous machine entre 30 et 90 jours où les résultats post transplantation sont les meilleurs.

Avec plus de 80% de données cliniques préopératoires, cette étude a permis de mettre en évidence les approches différentes de deux centres travaillant dans la même zone géographique. Mais l'application de l'une ou l'autre stratégie n'influence pas les résultats en termes de survie des patients sous assistance, ni en termes de survie post transplantation.

Les deux stratégies sont donc chacune défendable et mènent à des résultats similaires. Cependant, il faut noter une diminution significative des événements thromboemboliques chez les patients CAT dans cette étude par rapport au BiVAD^{158, 172}. Cela s'explique par la conception même du dispositif et l'exérèse complète des deux ventricules et des valves natives. Par ailleurs, le diamètre ainsi que des plus courtes canules explique la diminution des accidents vasculaires cérébraux chez les patients recevant de la TAH et influencerait la survie à très long terme (> 90jours).

Le taux d'infection de canules ayant nécessité une reprise chirurgicale et le taux de médiastinite étaient similaires dans les deux groupes. L'infection de poche de pompe est une complication grave survenant généralement plus fréquemment lors des dissections des assistances implantables. Dans cette étude, les taux de reprise chirurgicale sous assistance pour hémorragie ou infection sont relativement bas comparés aux chiffres retrouvés dans la littérature (entre 15-30%)¹⁷³.

Cette étude montre des résultats superposables après transplantation comparés aux patients transplantés d'emblée¹⁷⁴. L'Agence de la Biomédecine a rapporté 5999 greffes de 1993 à 2004 avec des taux de survie à 1 an de 73.7% (IC à 95% (72.6-74.8)) et 70% à 5 ans (63.7-66.2). Dans cette étude, la survie sous assistance ou après transplantation n'est pas influencée par le type de dispositifs bi ventriculaire. Ceci est conforme avec l'étude du GRAM¹³² qui avait montré que le type de dispositif n'influence pas la survie post-transplantation. Ces données ont pu mettre en évidence les différences de stratégies entre les deux hôpitaux d'une même région conduisant finalement à une survie identique.

En conclusion, l'implantation du CAT ou BiVAD comme pont à la transplantation chez les patients en IC terminale pour lesquels un traitement inotrope optimal a échoué, est superposable avec les données de la littérature avec des taux de survie post transplantation d'environ 75% à 1 an. Le choix du dispositif n'influence en aucun cas la survie sous assistance ou après transplantation. Le résultat frappant est le taux extrêmement faible de complications neurologiques dans le groupe CAT par rapport au groupe BIVAD.

Chapitre 4 – Manuscrit #2

4.1. Avant-propos au Manuscrit #2

Avec près de 1700 implantation dans le monde, le Cœur Artificiel Total (CAT) Syncardia (Syncardia Systems, Tucson, AZ, Etats-Unis) représente 2% des dispositifs d'assistances circulatoires mécaniques de longue durée implantés dans le monde. On a cependant constaté une diminution de son utilisation ces dernières années. Ce type d'assistance permet notamment une récupération des organes hypo perfusés après un choc cardiogénique. Le CAT s'adresse essentiellement aux patients en attente de greffe avec insuffisance cardiaque bi ventriculaire irréversible avec risque de décès à court terme, pour lesquels aucun donneur compatible n'est disponible. Les patients candidats au CAT sont généralement extrêmement malades avec des classes INTERMACS 1 ou 2.

Dans ce manuscrit, le candidat au doctorat en sciences biomédicales vise à décrire l'utilisation, les indications et les résultats actuels avec le CAT à l'ICM, à partir de l'avènement des pompes à flux axial. Nous avons décidé de nous focaliser sur le Syncardia CAT temporaire car il demeure actuellement le seul CAT approuvé comme stratégie de transition vers la transplantation au Canada, aux États-Unis et en Europe.

Dans cette étude, plus de 70% des patients sous CAT subissent par la suite une transplantation cardiaque avec un taux de survie de 67% à 1 mois et 56% à 1 an. Les complications attendues au sein de cette population extrêmement précaire sont les hémorragies, les infections de canules, les accidents vasculaires cérébraux et l'insuffisance rénale aigüe.

L'avantage de pouvoir permettre un retour à domicile avec la console portative Freedom est un des avantages du CAT par rapport aux autres assistances bi ventriculaires.

Ces résultats nous permettront d'observer les avantages mais également les limites du CAT dans cette expérience unique au Canada chez les patients en insuffisance bi ventriculaire ou en présence de conditions anatomiques particulières. Ce manuscrit est accepté pour publication dans le « **Canadian Journal of Surgery** » (*Can J Surg. 2017 Dec;60(6):375-379. doi: 10.1503/cjs.003617*)

CANADIAN EXPERIENCE WITH THE SYNCARDIA TEMPORARY TOTAL ARTIFICIAL HEART AS BRIDGE TO TRANSPLANTATION

Anthony Nguyen, MD, MSc,^{a†} Nicola Vistarini, MD, MSc,^{a,b†} Michel Pellerin, MD,^a
Louis P Perrault, MD, PhD,^a Denis Bouchard, MD, PhD,^a Philippe Demers, MD, MSc,^a
Michel White, MD,^c Anique Ducharme, MD, MSc,^c Normand Racine, MD,^c Guy Pelletier,
MD,^c and Michel Carrier, MD, MBA^a

†These authors contributed equally to this work as first coauthors

^aDepartment of Cardiac Surgery, Montreal Heart Institute, University of Montreal, Canada;

^bDepartment of Clinical-Surgical, Diagnostic and Pediatric Sciences, Pavia University School of Medicine, Italy; ^cDepartment of medicine, Montreal Heart Institute, University of Montreal, Canada

SHORT TITLE: Canadian experience with SynCardia TAH

WORD COUNT: 2079

Address correspondence to Dr Michel Carrier, Department of Cardiac Surgery, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street, Montreal, Quebec, Canada H1T 1C8. Tel.: 514-376-3330 x3715. Fax: 514-593-2157. E-mail: michel.carrier@icm-mhi.org

ABSTRACT

OBJECTIVE: The SynCardia total artificial heart (TAH) provides complete circulatory support by replacing both native ventricles and all cardiac valves. Accepted indication includes bridge-to-transplantation therapy (BTT). We review the Montreal Heart Institute experience with TAH implantation.

METHODS: A retrospective analysis of demographics, clinical characteristics and survival of all BTT patients using TAH has been performed.

RESULTS: From September 2004 to March 2015, 12 patients (11 males, 45±13 years) received the TAH for refractory cardiogenic shock secondary to idiopathic (50%), ischemic (17%) cardiomyopathy or other causes (Failed Fontan, graft failure, hypertrophic and mitral valve replacement, 33%). Before implantation, mean EF was 14±4%, 6 (50%) patients had previous cardiac surgery, 4 (33%) were on mechanical ventilation, none were on ECMO. Two (16%) patients suffered chronic renal failure with dialysis. The mean duration of TAH support was 46±40 days. Two (16%) patients died while on support after a mean of 15 days. Actuarial survival on support was 80±12%, at 30 days after implantation. Complications on support included 1 (8%) stroke, 3 (25%) mediastinitis, 5 (41%) ARDS requiring prolonged intubation, 9 (75%) developed acute renal failure (ARF) requiring temporary dialysis. Ten (84%) patients survived to be transplanted after a mean duration of 52±42 days of support. Actuarial survival rates after transplant was 67±16% at 1 month and 56±17% at 1 year after transplantation.

CONCLUSION: The TAH provided reasonable survival as BTT, with low incidence of neurological events in extremely fragile patients. However, ARF requiring dialysis and device infections are worrying concerns after TAH implantation.

KEYWORDS: Heart failure, Circulatory assist devices, Heart transplantation, Cardiogenic Shock

INTRODUCTION

End-stage heart failure is a public health problem affecting an increasing number of patients each year. Although a variety of treatment options exist for its treatment, heart transplantation remains the gold standard.¹ Unfortunately, the lack of donors is now driving to the increased use of ventricular assist devices (VAD) as a bridge-to-transplant (BTT) or as destination-therapy (DT).^{2,3} Amongst advanced heart failure patients, those with biventricular failure have the worse prognosis and very few available options while waiting for a compatible donor. They are usually more fragile preoperatively with more comorbidities, including renal and hepatic dysfunction compared to patients receiving sole left ventricular support.^{1,2,4} Some may benefit from total artificial heart (TAH) implantation as an alternative to durable BiVAD support, but TAH are still usually implanted in extreme emergency situations (INTERMACS 1, “crash and burn profile”).⁵ Since 2004, at the Montreal Heart Institute, we used the SynCardia TAH (SynCardia System Inc, Tucson, AZ) as a biventricular assist device, mainly in critical patients. We herein report our experience in Canada with the TAH over the past ten years in patients with biventricular end-stage heart failure.

METHODS

Between January 2004 and December 2014, 51 durable circulatory assist devices have been implanted at our institution. Biventricular assistance was required in 12 (24%) patients, all receiving the SynCardia TAH as a bridge to transplantation. The decision to implant a TAH over a simpler LVAD was taken because of severe preoperative right ventricular dysfunction, assessed by right heart catheterization and echocardiography, often associated with multi-organ failure. Patients in functional class NYHA IV and a body mass index between 1.7 - 2.5 m² or with an anteroposterior diameter (measured at T10 from sternum to the anterior face of the vertebral body at chest CT scan) greater than 10 cm, were eligible for TAH implantation.

SynCardia TAH

TAH implantation consists of excision of both ventricles and the four native valves. The clinical experience with this device has been described previously elsewhere.⁶⁻⁹ Briefly, this is a pneumatic blood pump with two polyurethane ventricles and four monodisk mechanical prostheses (Medtronic-Hall, Medtronic Inc, MN, USA). Each ventricle has a volume of 70 mL and is comprised of a silicone diaphragm separating the blood from the pneumatic chamber. The pulsed injection of compressed air allows the movement of the diaphragm and thus the filling and evacuation of both ventricles. The two artificial ventricles are directly sutured to the patient's native atria and connected to an external console via two drivelines. Since 2006, the emergence of new handheld console, CE approved (20lb gold Excor™ and 14lb Freedom™), has made home discharge possible with TAH, but has only been approved recently in North American (2011 in Canada, 2014 in USA).⁵

Patient management

The TAH implantation technique is similar to a usual orthotopic transplant and has been described previously.¹⁰⁻¹³ All patients who received TAHs were systematically anticoagulated with aspirin (325 mg daily), warfarin (target international normalized ratio (INR) of 2.5 to 3.5) and dipyridamole.

Data collection

Clinical and laboratory data were collected retrospectively from our Transplantation and Heart Failure database. The Canadian Department of Health and Welfare (Ottawa, Canada) approved the implantation of the TAH for each patient. Informed consent for each patient was obtained and the Ethics Committee of our institution approved the study. All patients were followed prospectively at the Cardiac Transplantation and Ventricular Device Clinic at our institution.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) v20 (Chicago, IL, USA). Continuous data are presented as mean \pm standard deviation and categorical variables presented as frequency (%). Survival data were analyzed using Kaplan-Meier estimate. We calculated the estimated survival without including patients at the time of transplantation to assess overall survival after positioning the device.

RESULTS

Baseline characteristics

Between January 2004 and November 2014, 12 (24%) of all our 51 long-term mechanical circulatory support patients received a TAH. Patients' characteristics and heart failure etiology are shown in Table 1. They were predominantly male (11, 91%) with a mean age of 45 ± 12 years (range 21-68), a mean body mass index of 25.9 ± 2.9 kg/m² and an average body surface area of 1.93 ± 0.1 m². Three (25%) patients had prior cardiac surgery including one heart transplant, one mechanical mitral valve replacement and one congenital heart surgery (failed Fontan).

Patient status before implantation

Four patients (33%) were on mechanical respiratory support preoperatively for an average of 0.75 ± 1.3 days before implantation. Those four patients also had an intra-aortic balloon pump, but there was no one on ECMO or Impella support. Two patients (16%) also received preoperative renal replacement therapy, initiated 9 and 21 days before TAH respectively. Four (33%) patients had chronic renal failure before implantation (defined as either kidney damage or eGFR < 60 mL/min/1.73 m² for > 3 months)

Surgical technique

The mean clamping time and cardiopulmonary bypass time were 85 ± 25 min and 103 ± 27 min respectively. One (8%) patient had concomitant atrial septal defect closure.

Outcomes and complications on support

The patients were supported for a total of 121 patient-days, with a mean time of support of 46 ± 40 days per patient (range, 1-384). Two (16%) patients died on support after an average of 16 ± 0.7 days. The causes of death on TAH support were multiple organ failure (8%) and stroke (8%). The 30 day estimated actuarial survival on support was $80 \pm 12\%$.

Postoperative complications are listed in Table 2. Eight (66%) patients developed significant early postoperative bleeding requiring reoperation, and 9 (75%) patients developed acute renal failure requiring dialysis, with one patient remaining on chronic hemodialysis. Patients were weaned from mechanical ventilatory support after an average of 1.9 ± 1.6 days and intensive care unit length of stay was 38 ± 32 days. According to our institutional policy, patients were not allowed to be discharged home with a portable console when it became available in Canada in 2011 (Excor or Freedom™). While on support, one patient (8%) experienced a stroke (ischemic) and one had a transient ischemic attack (TIA) <24 hours (without sequelae). Six (50%) patients developed drivelines infection, one patient (8%) has been reoperated due to sternal dehiscence and six (50%) patients developed gastrointestinal bleeding.

Overall survival after implantation of the TAH

After a mean follow-up of 807 ± 1230 days, 7 patients (58.3%) had succumbed. The total estimated actuarial survival after device implantation (patients censored at the time of explant) was $80 \pm 12\%$ at 30 days.

Survival after transplantation

Ten (84%) patients were successfully transplanted after a mean of 51 ± 42 days of support.

Actuarial survival after transplantation was 67 ± 16 % at 1 month and 56 ± 17 % 1 year after transplantation.

DISCUSSION

Replacing the two native ventricles and the four cardiac valves, the TAH provides a flow rate of 7-9 L/min, improving systemic perfusion and decreasing filling pressures. Although the last INTERMACS registry³ reported only 301 TAH implantations from June 2006 to December 2014, TAH remains a valid option in cases of irreversible biventricular failure. TAH indications include extensive myocardial infarction, acute or chronic cardiac rejection, left ventricular insufficiency with previous mechanical valves in place, acquired inoperable left ventricular septal defect, multiple LV mural thrombi, intractable ventricular arrhythmia, failure of Fontan correction and end-staged hypertrophic cardiomyopathy.¹⁴

In this report, we reviewed our experience in bridge-to-transplant patients with the SynCardia TAH. Our results confirm that this device allows getting extremely sick patients (all patients were in INTERMACS I or II) with biventricular failure to transplantation, with an acceptable survival rate. The post-transplant survival of this population is expected to be lower compared to patients transplanted in first intention in Canada, but the scarcity of donors precludes this approach in the majority of unstable patients. The need for biventricular assistance in our program was 24% (n=12), which is higher than data reported by the 7th report INTERMACS (4%, n=697 of 15745 Long term support),³ possibly because of the limited availability of this technology, compared to the widespread use of more traditional VAD such as Heartware and Heartmate 2.

Reported survivals to transplantation worldwide vary greatly, ranging between 26% and 79% as reported by the CardioWest Total Artificial Heart Investigators.^{11,14} Interestingly, in this prospective multicenter study, the selection criteria were extremely strict and compassionate meaning use was forbidden. In addition, patients with preoperative acute renal failure or on short-term circulatory support were excluded, whereas they constitute 11 % of the studied population. Moreover, in its most recent report of more than 100 TAH, Copeland

et al reported 68% survival to transplantation and post-transplant survival of 77%, for a global survival from implant of 52%.⁵ La Pitié-Salpêtrière Hospital reported a similar success rate of bridge to transplantation of 61% after a mean assistance duration of 97±97 days.¹⁵ At our institution, the TAH is the preferred device for durable biventricular support in eligible patients. The bridge-to-transplantation rate compares favorably with those reported in the literature.¹⁰⁻¹² Those results are mainly due to rigorous patient selection and decision to proceed to temporary circulatory support as bridge to decision thus avoiding TAH compassionate use. Kirsch et al identified older age and preoperative mechanical ventilation as major risk factors while on support.¹⁵ Others have also reported preoperative mechanical ventilation as a risk factor of death while on support.¹⁶ Indeed, the need for preoperative mechanical ventilation reflects the magnitude of cardiogenic shock and the patient's critical preoperative condition. On the other hand, Copeland and al found no significant correlation between duration of mechanical ventilation and death on support.⁵ In our series, 33% of patients were intubated before the operation for an average of 2.2 days.

One (8%) patient developed stroke while on support. This incidence of neurological events was similar than those reported around the world.¹¹⁻¹⁵ However, most of these studies are retrospective by nature and could have underestimated the incidence of stroke, since all patients did not benefit from a systematic brain imaging. In our study, we performed brain imaging in a clinical basis only. Furthermore, the TAH compares favorably in terms of early/mid-term survival or stroke with BiVAD devices.^{4,17,18} This is likely due to the complete removal of both ventricles, the absence of residual thrombi, and the use of shorter drivelines with large diameter cannula. Also, local antithrombotic management could be related to those low neurological events rate. Post-transplant survival in this study is similar to data reported by other authors.¹²⁻¹⁵ Our institutional policy is to keep the TAH recipients in the hospital until transplantation. However, the recent emergence of mobile consoles allows home

discharge.^{9,19} Only a few centers have reported their experience with these portable drivers. Demondion et al described 12 patients (44%) discharged home over a four-year period, with an average of 88 days postoperatively.¹⁹ Hence, the high costs associated with ICU stay and economic burden on the hospital could be limited, with an earlier home discharge in these patients. Furthermore, the authorization by the FDA for implantation TAH as destination-therapy in 2013, as well as the new arrival of 50 mL pump for small adults or children (<40 kg) could possibly extend the indications TAH beyond bridge-to-transplant strategy.

CONCLUSION

Although the increasing dominance of continuous-flow (CF) pumps are evident (>90% of all implantation with intracorporeal CF device)^{3,20} and the willingness to stabilize INTERMACS I patients by temporary assistance devices (ECMO or Impella) to facilitate organs rehabilitation,¹⁷⁻²³ the TAH remains a viable choice in our BTT strategy for patients with biventricular failure.²⁴ It provides acceptable early and mid-term results for survival on support and after transplantation. This device offers an effective means of bridging critically ill patients to heart transplantation by replacing all native ventricles. However, acute renal failure requiring temporary dialysis and device infections remain significant concerns after TAH implantation.

CONFLICT OF INTEREST

None

FUNDING

None

REFERENCES

1. Cleveland JC, Naftel DC, Reece TB, et al. Survival after biventricular assist device implantation: An analysis of the interagency registry for mechanically assisted circulatory support database. *J Heart Lung Transplant* 2011;30:862-9.
2. Kirsch M, Mazzucotelli JP, Roussel JC, et al. Survival after biventricular mechanical circulatory support: does the type of device matter? *J Heart Lung Transpl* 2012;31:501-8.
3. Kirklin JK, Naftel DC, Pagani FD, et al. Seventh INTERMACS annual report: 15,000 patients and counting. *J Heart Lung Transplant* 2015. pii: S1053-2498(15)01450-3. doi: 10.1016/j.healun.2015.10.003
4. Mazzucotelli JP, Leprince P, Litzler PY, et al. Results of mechanical circulatory support in France. *Eur J Cardiothorac Surg* 2011;40:e112-7.
5. Copeland JG, Copeland H, Gustafson M, et al. Experience with more than 100 total artificial heart implants. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012;143:727-34.
6. Cabrol C, Gandjbakhch I, Pavie A, et al. Total artificial heart as a bridge for transplantation: La Pitie 1986 to 1987. *J Heart Transplant* 1988;7:12 7.
7. Leprince P, Bonnet N, Rama A, et al. Bridge to transplantation with the Jarvik 7 (CardioWest) total artificial heart: A single center 15 year experience. *J Heart Lung Transplant* 2003;22:1296-303.
8. Gray NA, Selzman CH. Current status of the total artificial heart. *Am Heart J* 2006;152:410.
9. Copeland J. Out of hospital total artificial heart patients. *Texas Heart Inst J* 2010;37:654-5.
10. Arabia FA, Copeland JG, Pavie A, Smith RG. Implantation technique for the CardioWest total artificial heart. *Ann Thorac Surg* 1999;68:698-704.

11. El Banayosy A, Arusoglu L, Morshuis M, et al. CardioWest total artificial heart: Bad Oeynhausen experience. *Ann Thorac Surg* 2005;80:548-52.
12. Roussel JC, Senage T, Baron O, et al. CardioWest (Jarvik) total artificial heart: a single center experience with 42 patients. *Ann Thorac Surg* 2009;87:124-9.
13. Korfer R, El Banayosy A, Morshuis M, Tenderich G, Reiss N, Arusoglu L. Total artificial heart implantation technique using the CardioWest or the Thoratec system. *Multimedia Manual of Cardio Thoracic Surgery*. Available at mmcts.2006 doi:10.1510/mmcts.2006.002485. Accessed on March 26, 2013.
14. Copeland JG, Smith RG, Arabia FA, et al. Cardiac replacement with a total artificial heart as a bridge to transplantation. *New Engl J Med* 2004;351:859-67.
15. Kirsch M, Nguyen A, Mastroianni C, et al. SynCardia temporary total artificial heart as bridge to transplantation: current results at la Pitié Hospital. *Ann Thorac Surg* 2013;95:1640-6. doi: 10.1016
16. Klotz S, Vahlhaus C, Riehl C, Reitz C, Sindermann JR, Scheld HH. Preoperative prediction of post vad implants mortality using easily accessible clinical parameters. *J Heart Lung Transplant* 2010;29:45-52.
17. Kirklin JK, Naftel DC, Kormos RL, et al. The fourth INTERMACS annual report: 4,000 implants and counting. *J Heart Lung Transplant* 2012;31:117-26.
18. Nguyen A, Pozzi M, Mastroianni C, et al. Bridge to transplantation using paracorporeal biventricular assist devices or the syncardia temporary total artificial heart: is there a difference? *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 2015;56:493-502.
19. Demondion P, Fournel L, Niculescu M, Pavie A, Leprince P. The challenge of home discharge with a total artificial heart: the La Pitie Salpetriere experience. *Eur J Cardiothorac Surg* 2013;44:843-8. doi: 10.1093/ejcts/ezt146. Epub 2013 Mar 28.

20. Smedira NG, Hoercher KJ, Yoon DY, et al. Bridge to transplant experience: factors influencing survival to and after cardiac transplant. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010;139:1295-305.
21. Holman WL, Kormos RL, Naftel DC, et al. Predictors of death and transplant in patients with mechanical circulatory support device: a multi institutional study. *J Heart Lung Transplant* 2009;28:44-50.
22. Rao V, Oz MC, Flannery MA, Catanese KA, Argenziano M, Naka Y. Revised screening scale to predict survival after insertion of a left ventricular assist device. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;125:855-62.
23. El Banayosy A, Arusoglu L, Kizner L, et al. Predictors of survival in patients bridged to transplantation with the Thoratec VAD device: A single center retrospective study on more than 100 patients. *J Heart Lung Transplant* 2000;19:964-8.
24. Copeland JG, Smith RG, Bose RK, Tsau PH, Nolan PE, Slepian MJ. Risk factor analysis for bridge to transplantation with the cardiowest total artificial heart. *Ann Thorac Surg* 2008;85:1639-45

TABLE 1 : Preoperative patient characteristics

Table 1. Preoperative patient characteristics	
Characteristic	Mean \pm SD or no. (%) [*]
Age at implantation, yr	45 \pm 12
Sex, male:female	12:1
BSA	1.93 \pm 0.1
BMI	25.9 \pm 2.9
Preoperative support	4 (33)
Mechanical ventilation	4 (33)
IABP	11 (91)
Inotropes	14.6 \pm 2.9
Preoperative LVEF	4 (33)
Previous cardiac surgery	4 (33)
Preoperative ARF [†]	2 (16)
Preoperative dialysis	5 (33)
INTERMACS status 1 or 2	8 (67)
Etiology	
DCM (noncompaction of the left heart, uncontrolled VT, multiple LV mural thrombi)	6 (50)
ICM (acute anteroapical myocardial infarction)	2 (17)
Other (primary graft failure, mechanical MVR, Failed Fontan, hypertrophic cardiomyopathy)	5 (33)
Preoperative laboratory data	
Sodium, mmol/L	134 \pm 7
Creatinine, μ mol/L	156 \pm 79
eGFR-MDRD, mL/min/1.73 m ²	70.6 \pm 35.3
BUN, mmol/L	10.5 \pm 0.6
Bilirubin, μ mol/L	50.5 \pm 9.2
Lactate, mmol/L	2.6 \pm 1.8
<p>ARF = acute renal failure; BMI = body mass index; BSA = body surface area; BUN = blood urea nitrogen; DCM = dilated cardiomyopathy; eGFR = estimated glomerular filtration rate; IABP = intra-aortic balloon pump; ICM = ischemic cardiomyopathy; INTERMACS = Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support; LVEF = left ventricle ejection fraction; MDRD = Modification of Diet in Renal Disease; SD = standard deviation.</p> <p>[*]Unless indicated otherwise.</p> <p>[†]Delta creatinine > 100 μmol/L or > 50% baseline.</p>	

TABLE 2 : Outcomes of TAH support

Table 2. Outcomes of total artificial heart support	
Outcome	Mean \pm SD or no. (%)
Duration of support, d	46 \pm 40
Outcome	
Ongoing	0 (0)
Died on support	3 (23)
Transplanted	10 (77)
Neurologic events	
TIA (< 24 hr)	1 (8)
Stroke	1 (8)
Bleeding requiring reoperation	5 (38)
Infection	6 (46)
ARF requiring dialysis*	7 (54)
ARF = acute renal failure; SD = standard deviation; TIA = transient ischemic attack. *Delta creatinine > 100 μ mol/L or > 50%.	

Chapitre 5 – Physiopathologie de la coronaropathie du greffon

5.1. Définition et statistiques récentes

Depuis la première transplantation cardiaque réalisée par l'équipe de Christian Barnard en 1967,¹⁷⁵ le nombre de greffes n'a cessé d'augmenter jusqu'à atteindre plus de 5000 procédures par an à l'heure actuelle.⁹ Cependant, malgré les progrès majeurs dans le domaine de l'immunosuppression, la maladie coronaire du greffon (MCG) demeure toujours une cause majeure de décès au-delà de la première année post-transplantation. Selon le registre de l'International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT), l'incidence de la MCG reste élevée avec une régression minime ses 20 dernières années, passant de 32% à 29% et 46% à 40% de survie à 5 et 8 ans post-transplantation respectivement.⁹ La survie à 5 ans pour MCG détectée endéans les 3 premières années post-greffe a légèrement augmentée de 71% à 76%, mais toujours inférieure aux 82% de survie des patients sans MCG.⁹ La MCG est, avec les tumeurs malignes et les syndromes lympho-prolifératifs, la première cause de décès à long terme responsable d'un décès sur 8 au-delà de la première année post-transplant.⁹ L'amélioration des prises en charges cliniques et l'utilisation des statines et des inhibiteurs de la rapamycine chez les mammifères (mTOR) ont modifié l'évolution naturelle de la maladie.¹⁷⁶ Par ailleurs, la reconnaissance de la MCG débutante comme facteur de mauvais pronostic a mis l'accent sur la détection précoce de cette pathologie. Par ailleurs, près de la moitié des patients greffés vont développer une MCG angiographiquement significative à 5 ans.¹⁷⁷ Malheureusement, le diagnostic précoce par des techniques d'imagerie non invasive de cette pathologie silencieuse demeure difficile. La première description d'une vasculopathie spécifique des artères greffées a été rapportée en 1910 par Alexis Carrel. A 3 mois post-greffe de carotide chez le chien, il avait décrit un épaissement intimal caractérisé par la dégénérescence des cellules musculaires de la média venant envahir l'intima et entraînant une oblitération de la lumière.¹⁷⁸ Sur les 12 premières greffes de l'expérience de Stanford, un épaissement intimal oblitérant la lumière des artères coronaires apparaissait sur la majorité des greffons. Cette maladie coronaire était alors décrite comme la principale manifestation histologique du rejet cardiaque chronique après TC.¹⁷⁹ Les connaissances actuelles de la physiopathologie ainsi que les moyens diagnostiques et l'approche thérapeutique de la MCG seront successivement exposées dans cette revue. Les perspectives de la recherche fondamentale et leurs potentielles applications cliniques seront évoquées.

5.2. Physiopathologie de la maladie coronaire du greffon

5.2.1. Pathogenèse et caractéristiques histologiques

La MCG est une forme accélérée de lésions myéloprolifératives affectant le réseau vasculaire du cœur transplanté. La prolifération des cellules musculaires lisses (CML), l'accumulation des cellules inflammatoires et les dépôts lipidiques entraînent un épaissement intimal circonférentiel.¹⁸⁰ Deux types de lésions peuvent être observées dans cette pathologie. Les lésions dénudées sont d'une part, provoquées par la séquence ischémie-reperfusion du greffon lors de la transplantation. Les lésions endothéliales non dénudées surviennent plus tardivement et aboutissent au remplacement des cellules intimaux par un néo-endothélium non fonctionnel qui serait composé de progéniteurs circulants¹⁸¹. Contrairement à la maladie athérosclérotique dont les lésions sont focales, excentriques et éplicardiques, la MCG est diffuse, concentrique et touche les vaisseaux éplicardiques et intramyocardiques. Les études sur l'imagerie intracoronaire démontrent que la maladie apparaît dès la première année après transplantation selon une réponse en deux temps : d'abord un épaissement intimal circonférentiel avec expansion à la lame élastique externe, suivi d'un remodelage constrictif et un rétrécissement luminal.¹⁸² La composition de la plaque varie d'une hyperplasie fibreuse précoce jusqu'à une nécrose athéromateuse avec calcification tardive¹⁸³. Seuls les capillaires sont indemnes de MCG car ils sont dépourvus de CML dans leur paroi (Figure 17).

Figure 17. – Maladie coronaire du greffon cardiaque

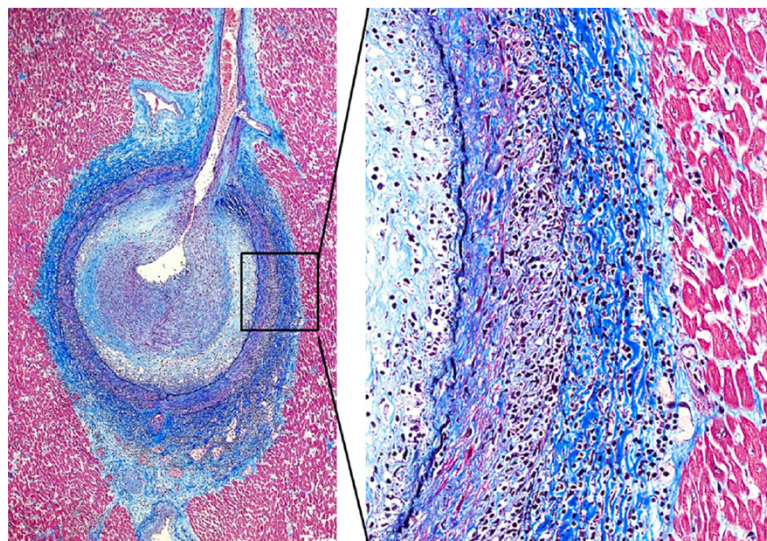


Marquage Hematoxyline-Eosine de l'artère interventriculaire antérieure (Left anterior descending, LAD) et d'une branche diagonale (Diagonal) démontrant l'hyperplasie intimale. (Figure reproduite à partir de : Lee et al. Catheter Cardiovasc Interv. 2018 Dec.)

5.2.2. Atteinte endothéliale

Le développement de la MCG implique des facteurs complexes immuns et non-immuns, ceux-ci causant une inflammation vasculaire qui déclenche au final une atteinte endothéliale et une réponse cellulaire fibroproliférative.¹⁸⁴ L'endothélium maintient l'homéostasie vasculaire à travers la régulation du tonus vasculaire, l'adhésion leucocytaire et la prolifération de CML. Dans la MCG, l'atteinte initiale de l'endothélium déclenche une cascade de phénomènes de réparations tissulaires excessifs impliquant la prolifération de cellules vasculaires, la fibrose et le remodelage.

Figure 18. – Vasculite dans la MCG.

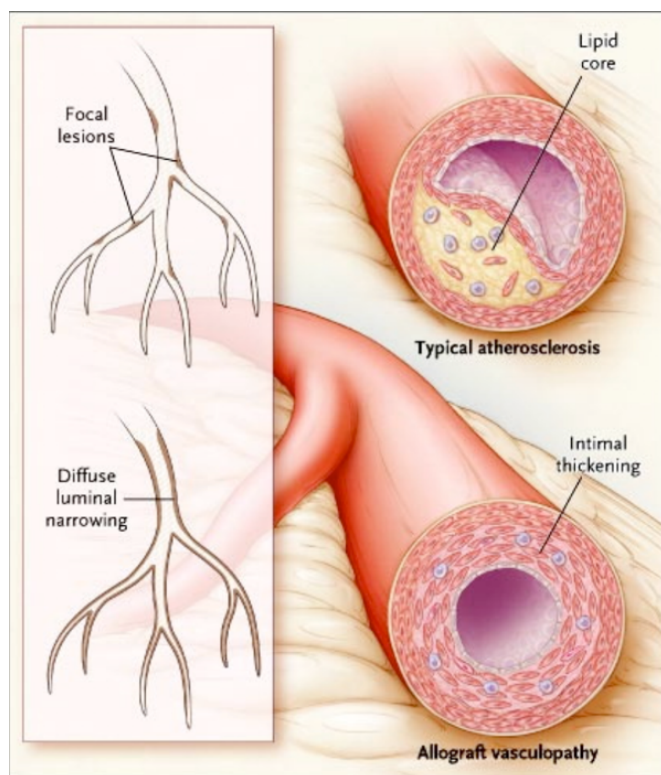


Coloration Trichrome de Masson (collagène en bleu et fibres musculaires en rouge) Figure reproduite à partir de : Lee et al. Catheter Cardiovasc Interv. 2018 Dec.)

Les patients porteurs d'une MCG progressive présentent des niveaux élevés de protéine C-réactive comparés à ceux qui non pas la maladie.¹⁸⁵ Les cellules endothéliales jouent un rôle majeur dans la pathogenèse de la MCG en exprimant à leur surface les molécules de Human Leukocyte Antigen (HLA) de classe I et II, conduisant à une réponse cellule induite.¹⁸⁶ L'atteinte endothéliale mène à une modification de la perméabilité vasculaire. Le résultat étant une activation des CML, la prolifération, et migration de ces cellules de la media vers l'intima, contribuant à la sécrétion de cytokines et de protéines de la MEC, causant une réduction de calibre de la lumière vasculaire et une diminution de la fonction du vaisseau.¹⁸⁷ Ceci se traduit par une hyperplasie fibromusculaire intimale progressive atteignant les artères épicaudiques ou intra-myocardiques. Des études sur les explorations endocoronaires (IVUS) couplées à une sonde de radiofréquence décrivent la composition in vivo des lésions intimales initiales^{188, 189}. Après la phase initiale d'épaississement fibro-inflammatoire, des agrégats lipidiques vont s'accumuler dans l'intima à un stade avancé de la MCG. Des lésions athéromateuses chargées en cholestérol peuvent alors se former dans les vaisseaux coronaires des greffons cardiaques¹⁹⁰. Elles sont favorisées par la rupture de la membrane basale entraînant l'accumulation de lipides dans le sous-endothélium¹⁹¹. Cependant, ces dépôts lipidiques sont cependant nettement moins abondants que ceux observés dans la coronaropathie athéromateuse native. Le monoxyde d'azote pourrait jouer un rôle vasodilatateur préventif de la dysfonction endothéliale en limitant la progression de la

MCG par suppression de l'inflammation et de l'athérogenèse.¹⁹² Les cellules Natural Killer (NK) participent à la formation de la MCG via le recrutement des lymphocytes T non-répondant aux alloantigènes du donneur.¹⁹³ De même, l'activation des facteurs nucléaires-kB (NFkB) par les alloanticorps et le dépôt de complément au niveau des cellules endothéliales pourraient initier la séquence pro-inflammatoire permettant le développement de la MCG.¹⁹⁴ Ce type de lésions est composé de lymphocytes B, de cellules plasmiques, et occasionnellement de cellules dendritiques CD21+.¹⁹⁵ Ces lésions sont parfois limités à l'endocarde ou pourraient s'étendre au myocarde sous-jacent entraînant une atteinte des myocytes.¹⁹⁶ Les différences d'ordre histologiques de la MCG et de l'athérosclérose coronaires sont résumées dans le [Tableau 4](#).

Figure 19. – Représentation schématique de la MCG vs athérosclérose typique du patient non transplanté

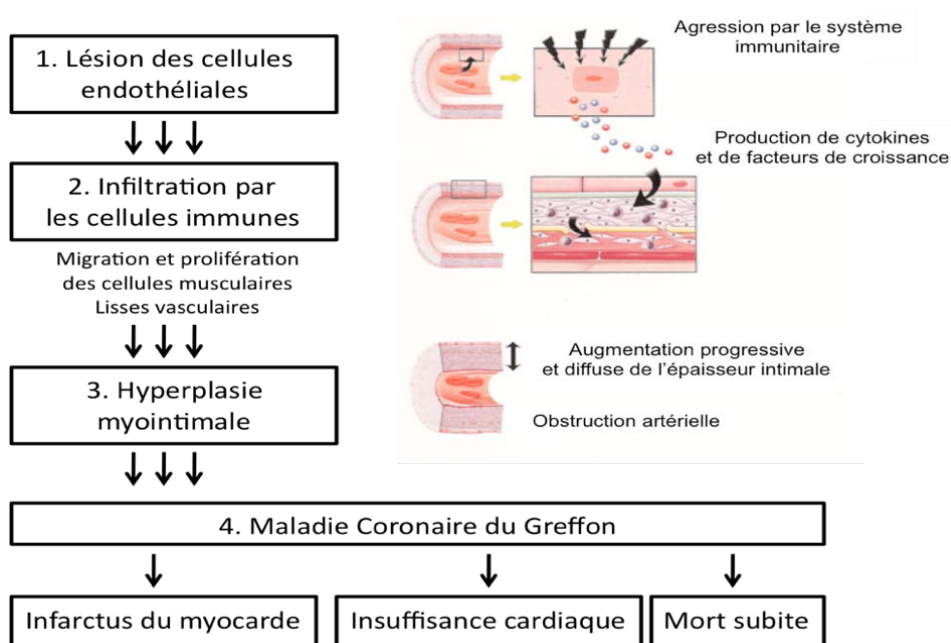


(Tiré de : Robin K. Avery, M.D. *Cardiac-Allograft Vasculopathy*. *N Engl J Med* 2003; 349:829-830)

Tableau 4. – Différence histologique entre MCG et athérosclérose

	Vasculopathie du greffon	Athérosclérose coronaire native
Topographie des lésions	Artères et veines coronaires, épiscopardiques et intramyocardiques	Artères coronaires proximales, principalement épiscopardiques
Extension	Diffuse et concentrique	Focale et excentrique
Infiltrat lymphocytaire	Important	Modéré
Limitante élastique interne	Intacte	Rompue
Dépôts de calcium	Rares	Fréquents
Rétention lipidique	Faible	Importante

Figure 20. – Mécanismes impliqués dans la pathogenèse des lésions vasculaires du greffon



5.2.3. Facteurs lésionnels à l'origine de la MCG

La physiopathologie de la MCG est complexe, impliquant une grande hétérogénéité de facteurs lésionnels, à la fois immunologiques et non immunologiques (Figure 21 et 22).

Figure 21. – Mécanismes immuns et non-immuns impliqués dans la MCG

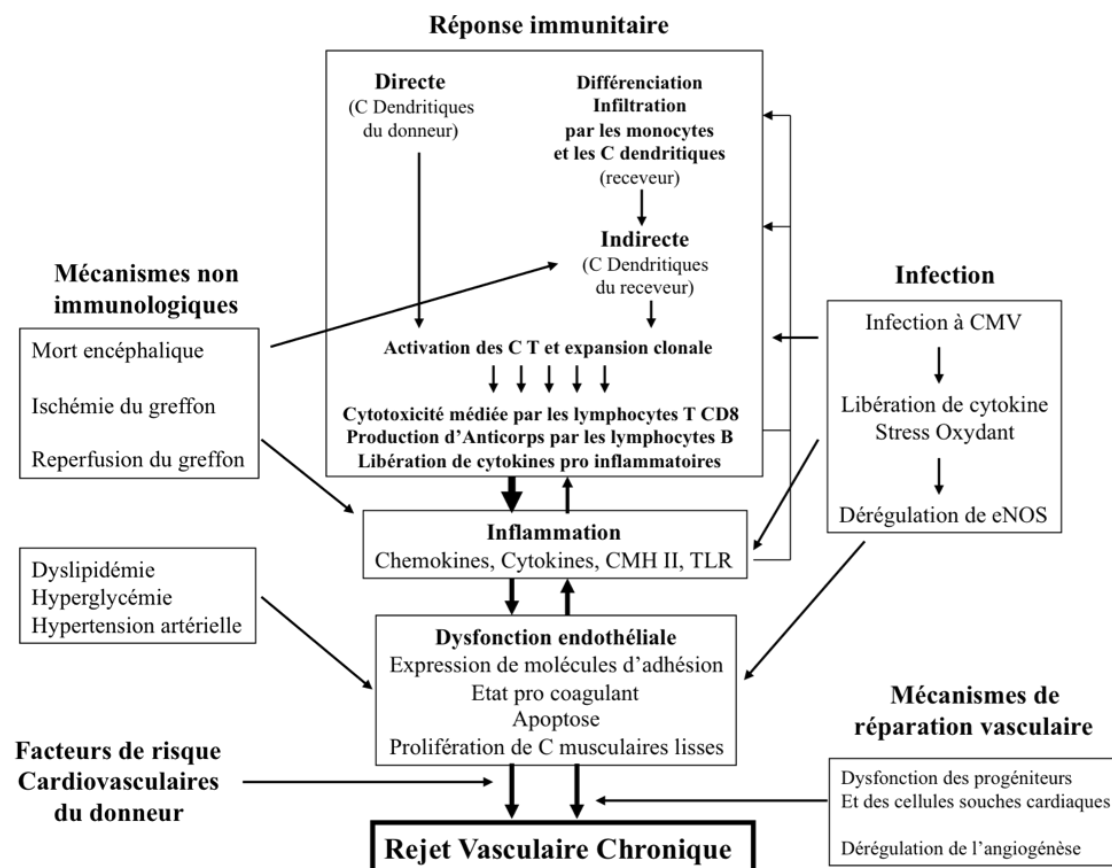
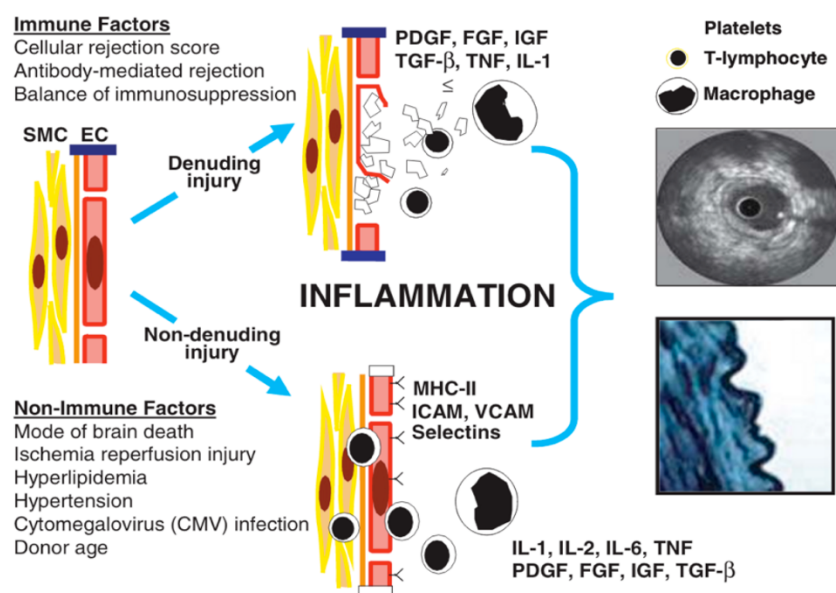


Figure 22. – Représentation des facteurs immuns et non immuns à l'origine des lésions de MCG



(Tiré de: Mehra M.R. *Contemporary Concepts in Prevention and Treatment of Cardiac Allograft Vasculopathy*. *Am J Transplantation* 2006)

5.2.3.1. Facteurs immuns

L'incidence de la MCG est très élevée chez les patients ayant développé des épisodes de rejets aigus du greffon, ce qui est lié au développement de la formation d'anticorps anti-HLA.¹⁹⁷ Un tiers des patients avec rejet humoral à 3 ans ont des lésions de MCG à la coronarographie comparé à 3% des patients contrôles.¹⁹⁷ La liaison des molécules HLA de classe I avec les anticorps anti-HLA aboutit à une phosphorylation des protéines intracellulaires ainsi que de l'activation de l'expression des facteurs de croissances fibroblastiques sur les CML et l'endothélium, entraînant une modification pro-inflammatoire du milieu.¹⁹⁸ Ceci supporte les données de la littérature sur le rôle central des anticorps anti-HLA dans la transduction des

signaux de prolifération, menant au rejet du greffon chronique via l'hyperplasie intimale des artères coronaires.¹⁹⁹

Les cellules endothéliales de l'allogreffe expriment des antigènes leucocytaires humains (HLA) qui sont reconnus par les lymphocytes T. Les lymphocytes-T activés sécrètent des cytokines (interleukines IL2, 4, 5 et 6; interféron IFN-gamma ; facteur de nécrose tumorale TNF-alpha) stimulant la prolifération des lymphocytes-T et activent les molécules d'adhésion endothéliale (intercellular and vascular cell adhesion molecule-1, ICAM-1; P sélectine), et résultent en l'activation et recrutement des cellules inflammatoires.²⁰⁰ Ainsi, les macrophages recrutés dans l'intima vont sécréter des cytokines (interleukine-1 et -6, le facteur de nécrose tumorale TNF-alpha) et des facteurs de croissance (facteur de croissance dérivé des plaquettes PDGF, insuline-like growth factor IGF, facteur de croissance transformant TGF α et β) qui vont promouvoir la migration des CML vers l'intima, leur prolifération et leur dépôt au sein de la MEC. Le rôle principal de la réponse humorale des anticorps HLA de classe I est la stimulation de l'endothélium et la prolifération de CML par l'activation de la cible de la rapamycine chez les mammifères (mTOR)/S6 kinase/voie S6RP, ainsi que la redistribution des récepteurs des facteurs de croissance des fibroblastes intracellulaires vers la membrane plasmique.^{201, 202} Les anticorps HLA circulants sont associés à un risque augmenté de rejet et le développement de la MCG.²⁰³ La MCG épargne les artères natives du receveur tandis que les cellules endothéliales du greffon constituent la première interface entre l'organe transplanté et les cellules immunocompétentes du receveur. Les artères coronaires vont donc être le siège d'une réponse allo-immune progressive, innée puis adaptative, aboutissant à une dysfonction endothéliale, puis secondairement à des altérations morphologiques sténosantes¹⁸⁶. Les incompatibilités concernant le système HLA, en particulier HLA-DR, ainsi que la fréquence, la durée et la sévérité des épisodes de rejets cardiaques aigus sont reconnues comme des facteurs de risque de développement accéléré de la MCG²⁰⁴. Près de 40 % des transplantés cardiaques développant une MCG ont fait au moins 2 épisodes de rejets aigus dans leur histoire¹⁸⁰. Peu d'études font cependant la distinction entre rejets cellulaires et humoraux. En l'absence de spécificités histologiques et morphologiques, le rejet humoral du greffon a longtemps été méconnu et sous-estimé. Il survient pourtant chez 10 à 20 % des transplantés cardiaques et doit être suspecté devant toute dysfonction du greffon sans argument histologique pour un rejet cellulaire²⁰⁵. La détection d'anticorps circulants anti donneur en présence d'une dysfonction du greffon est ainsi fortement évocatrice de rejet humoral. La mise

en évidence sur les biopsies myocardiques des fragments activés du complément C3d et C4d a été reconnue comme facteur de gravité du rejet humoral. En cas de 2 biopsies endo-myocardiques positives pour le marquage du C4d durant la première année post-greffe, ces patients seraient à plus haut risque de développer une MCG à 1 an²⁰⁶. Les dépôts de C3d et C4d peuvent cependant être observés au cours des 2 premières années post transplantation, même en l'absence de signes histologiques de rejet à médiation humorale. Les conséquences tardives du rejet humoral sont également méconnues²⁰⁵. L'intégrité fonctionnelle et structurale du greffon est ainsi souvent observée malgré la présence d'anticorps dirigés contre les antigènes du donneur. Ce phénomène « d'accommodation » pourrait correspondre à une période de tolérance immunitaire médiée par les lymphocytes B²⁰⁷. Plus de 10 % des patients actuellement en attente de TC sont sensibilisés contre des allo-antigènes²⁰⁸. Une sensibilisation secondaire contre les antigènes HLA du greffon peut, en outre, survenir à distance de la transplantation. Il s'agit le plus souvent d'anticorps circulants anti-HLA de classe II. Leur présence favoriserait le développement de la MCG²⁰⁹. Dès 1992, Yacoub et al. ont mis en évidence la présence d'anticorps anti cellules endothéliales chez les patients atteints de MCG²¹⁰. En plus de présenter les antigènes du système HLA, les cellules endothéliales coronaires lésées vont exprimer la vimentine, habituellement absente de la surface de l'endothélium sain. Ces antigènes de surface seraient la première cible de la réponse immunitaire cellulaire et humorale après TC. Les anticorps circulants anti-vimentine seraient ainsi retrouvés chez près d'un tiers des transplantés¹⁷⁶. Cependant le rôle exact de ces autoanticorps dans la genèse de la MCG ainsi que leur impact pronostique restent à définir^{211, 212}.

5.2.3.2. *Facteurs non-immuns*

Des facteurs non-immuns pouvant prédisposer à la MCG incluent les facteurs de risques vasculaires (chez le donneur et le receveur : l'âge, le sexe masculin, l'obésité, l'hyperglycémie, l'hyperlipidémie), les pathologies cardiaques ischémiques, la mort encéphalique, la préservation d'organe, et l'ischémie-reperfusion. Toutes ces causes ont en commun une atteinte inflammatoire entraînant une dysfonction endothéliale.²¹³ L'hyperlipidémie est le plus souvent induite par les traitements immunosuppresseurs, notamment par les anticalcineurines, et peut conduire à

l'altération de la vasorelaxation endothéliale¹⁸³. L'incidence de l'hyperlipidémie est de 74% la première année et 91% à 5 ans post transplantation cardiaque.¹⁷⁷ Certaines cellules inflammatoires comme les monocytes (en particulier CD11b(+), CD115(+), Ly-6C(hi)) ont été retrouvés préférentiellement dans la néointima et contribuent à l'accumulation macrophagique et la progression de la MCG.²¹⁴ Le diabète et l'hypertension artérielle cortico-induits, facteurs reconnus de coronaropathie, sont retrouvés chez plus d'un tiers des transplantés²¹⁵.

L'hypertension artérielle post transplantation est associée à une augmentation de l'incidence de MCG, avec 92.6% d'HTA dans le groupe avec MCG versus 76.3% dans le groupe sans MCG.²¹⁶ De même, l'hyperhomocystéinémie qui provoque une dysfonction endothéliale par diminution de la production de NO et a été identifiée comme facteur de risque de coronaropathie native, mais son impact sur le développement de la MCG est controversé²¹⁷. L'administration d'acide folique et de vitamine B12 peut réduire significativement les taux d'homocystéine chez les transplantés cardiaques sans pour autant influencer la sévérité ni la prévalence de la MCG¹⁸⁰. Les facteurs de risques cardiovasculaires du donneur pourraient également influencer le délai d'installation et la sévérité de la MCG. Ils seraient davantage responsables des lésions coronaires transmises avec le greffon. En effet, l'incidence de la MCG était plus élevée à 3 ans après la transplantation, chez les patients dont les donneurs présentaient des lésions, comparés à ceux qui n'en avaient pas (25% vs 4%, $p < 0.001$).²¹⁸ D'après le registre de l'ISHLT, l'incompatibilité de taille entre donneur et receveur ainsi qu'un IMC élevé chez le receveur sont des facteurs de risque de MCG à 5 ans.²¹⁹

5.2.4. Autres facteurs impliqués dans la MCG

5.2.3.1. La mort encéphalique

La mort encéphalique « explosive » du donneur (traumatismes crâniens par arme à feu, commotions cérébrales graves, pendaison, hémorragies cérébrales) exposerait le receveur à un risque plus élevé de MCG. L'augmentation brutale de la pression intracrânienne provoquerait des modifications génotypiques et phénotypiques à l'échelle de l'endothélium coronaire. La surexpression des molécules HLA induirait ainsi une réaction inflammatoire accélérée au niveau

de la circulation coronaire²²⁰. L'hypertension intracrânienne aiguë augmenterait par ailleurs la concentration plasmatique de métalloprotéinases aboutissant à un remodelage vasculaire coronaire par migration des CML de la média vers l'intima²²¹.

5.2.3.2. *L'âge du donneur*

L'âge moyen des donneurs de greffon cardiaque est passé de 27 ans en 1990 à 31 ans au début des années 2000, les donneurs de plus de 60 ans représentant 1.5 % des TC¹⁷⁷. Si l'âge du donneur supérieur à 40 ans a été démontré comme facteur de surmortalité en TC, il est à mettre en balance avec la mortalité spontanée des patients insuffisants cardiaques inscrits sur liste d'attente. Le taux de survie des transplantés cardiaques ayant reçu un greffon de plus de 40 ans est ainsi plus élevé que celui des patients en attente de greffe²²². En revanche, les patients transplantés avec un greffon de plus de 40 ans développeraient plus précocement une MCG. Cette progression rapide de la MCG ne semble pas pour autant avoir d'incidence sur la survie à long terme de ces patients²²³. En effet, plus de 70 % des greffons de plus de 40 ans présenteraient de l'athérosclérose coronaire pouvant favoriser la dysfonction endothéliale précoce du greffon²²⁴. Le taux de sténose coronaire significative est plus élevé à 1 mois parmi les greffons de plus de 40 ans sans qu'il y ait de différence de survie à 1 an ni à 5 ans²²⁵. L'âge du donneur entre 40 et 65 ans ne limite pas la survie du greffon cardiaque à moyen terme en l'absence de dysfonction ventriculaire gauche préalable, bien qu'étant un facteur de risque de MCG²¹⁹. La durée d'attente sur liste du receveur de même que la durée d'ischémie attendue du greffon doivent être prises en compte avant de refuser un greffon d'un donneur marginal.

5.2.3.3. *L'ischémie-reperfusion du greffon*

Si la durée d'ischémie n'est pas un facteur de risque isolé de développement précoce de la MCG d'après le registre de l'ISHLT, de nombreux arguments expérimentaux supportent un effet délétère de la séquence ischémie-reperfusion sur l'endothélium coronaire²¹⁹. La qualité de la préservation serait également déterminante, même si aucune étude n'a jusqu'à présent comparé l'impact de différentes solutions de préservation sur le risque de développement à moyen terme de la MCG. L'hypoxie provoque la perte du relargage du NO par l'endothélium, associée à une perturbation des échanges ioniques membranaires calcium-sodium dans les minutes suivant la reperfusion¹⁸⁶. La séquence ischémie-reperfusion augmente également l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales favorisant l'accumulation locale des

leucocytes. Les cytokines relarguées par ces effecteurs de l'immunité vont favoriser l'activation, la prolifération et la migration des CML vasculaires. L'ischémie-reperfusion s'accompagnerait enfin de dépôts de fragments activés du complément sur l'endothélium. Combinée aux lésions athéromateuses transmises chez les greffons âgés, elle contribue à augmenter le risque de MCG à moyen terme²¹⁹.

5.2.3.4. *Le cytomegalovirus*

Les infections à cytomegalovirus (CMV) sont associées au développement de la MCG avec une incidence comprise entre 9 % et 35 % après TC selon les séries^{226, 227} Le CMV génère un milieu proathérogène par la production de cytokines inflammatoires, l'expression de molécules d'adhésion, l'activation mononucléaire et la prolifération des CML.²²⁸ Les receveurs non immunisés contre le CMV sont davantage à risque de MCG. Le CMV présente un tropisme vasculaire et provoque une réaction inflammatoire locale responsable de lésions endothéliales¹⁸⁰. L'augmentation d'expression des glycoprotéines virales du CMV à la surface des cellules endothéliales infectées favorise l'adhérence des lymphocytes T cytotoxiques qui vont majorer les dommages cellulaires endothéliaux préexistants¹⁸³. Le CMV altère la vasodilatation coronaire médiée par l'oxyde nitrique endothélial en augmentant la synthèse de l'inhibiteur de la diméthylarginine synthase de NO^{204, 229}. Il existerait également l'induction d'une atteinte endothéliale par mimétisme moléculaire du CMV.²³⁰

5.3. **Prise en charge de la MCG : diagnostic et traitement**

5.3.1. **Diagnostic de la MCG**

La surveillance systématique est essentielle pour le diagnostic précoce de la MCG, puisque les patients sont la plupart du temps asymptomatiques. En effet, les symptômes classiques de l'ischémie cardiaque sont généralement absents à cause de la dénervation du greffon cardiaque. En conséquence, les patients présentent souvent des symptômes atypiques ou tardifs lors du développement de la dysfonction du greffon, insuffisance cardiaque, arythmies, ou mort subite. La détection précoce de la MCG par IVUS périodique demeure particulièrement difficile. Seuls

10 à 30 % des transplantés retrouveraient une innervation partielle de l'allogreffe à long terme, expliquant le retard diagnostique de la MCG et la nécessité d'un dépistage systématique afin de prévenir les complications de l'ischémie myocardique.

5.3.1.1. Imagerie invasive

La coronarographie est la technique de référence pour le diagnostic de la MCG et la précision de la topographie des lésions.²³¹ Les études multicentriques démontrent que 19% des patients pourraient développer une forme sévère de MCG à partir du moment où les lésions sont visibles à l'angiographie.²²³ Les formes sévères de MCG (>70% de sténose du tronc commun, >2 vaisseaux coronaires atteints) sont associées à une probabilité de décès ou de retransplantation de 50% à 5 ans.²²³ De nouvelles techniques permettent de mesurer l'épaisseur de la paroi vasculaire, les caractéristiques de la plaque et l'évaluation du réseau micro ou macro vasculaire. Une augmentation relative du diamètre coronaire compense la dysfonction endothéliale précoce au cours de la première année post-greffe. Un remodelage constrictif survient ensuite par diminution de la vasodilatation, voire par vasoconstriction paradoxale en l'absence de toute anomalie angio-coronarographique. Des lésions d'athérosclérose peuvent se surajouter dans un troisième temps. La nomenclature diagnostique pour la MCG définie par l'ISHLT couple les données de l'angio-coronarographie avec les signes cliniques et écho cardiographiques.

Les 4 stades de gravité croissante, cotés de 0 à 3, sont détaillés dans le [Tableau 5](#).

Tableau 5. – Classification lésionnelle de MCG selon ISHLT

MCG Stade 0 (non significative)	Aucune lésion détectable à l'angiographie
MCG Stade 1 (débutante)	Sténose du tronc commun <50% ou sténose d'un vaisseau primaire <70% ou sténose <70% de tout autre branche en absence de dysfonction du greffon
MCG Stade 2 (modérée)	Sténose du tronc commun <50%, sténose d'un vaisseau primaire >70% ou sténose d'une branche dans 2 réseaux en l'absence de dysfonction du greffon

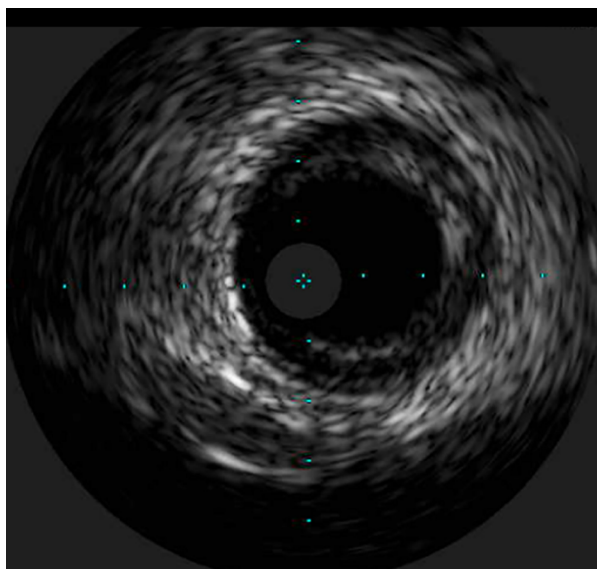
MCG Stade 3 (sévère)	Sténose du tronc commun >50% ou au moins 2 sténoses >70% de vaisseaux primaires, ou sténoses de branches dans les 3 vaisseaux, ou MCG stade 1 ou 2 avec dysfonction du greffon, ou évidence d'une physiologie restrictive
-----------------------------	---

Malgré son utilité pronostic dans la détection de la MCG, la coronarographie demeure peu sensible notamment lors de la visualisation au-delà de la paroi du vaisseau. Ainsi, les atteintes longitudinales, concentriques et diffuses de la MCG, ainsi que le remodelage vasculaire; aboutissent à une obstruction progressive de la lumière du vaisseau. En opacifiant la lumière vasculaire perméable, la coronarographie sous-estime la sévérité de la MCG. La quantification relative des lésions sténosantes suppose que le segment coronaire d'amont soit sain, ce qui est rarement le cas dans la MCG dont les lésions sont diffuses. Confrontée aux données histologiques post-mortem, l'angio-coronarographie concède une perte significative de sensibilité pour les lésions sténosantes précoces de MCG aussi bien distales que proximales. Les segments coronaires angiographiquement normaux présentent dans la majorité des cas des signes histologiques de MCG correspondant à un épaissement fibreux intimal¹⁹⁰.

L'ultrasonographie intravasculaire (USIV) est utile en supplément de la coronarographie. Elle quantifie l'épaississement intimal et renseigne également sur sa composition. La limitante élastique externe de la média peut ainsi être visualisée : elle est intacte dans la MCG, alors qu'elle est le plus souvent rompue dans la coronaropathie athéroscléreuse²³². L'USIV est l'examen possédant la meilleure valeur prédictive négative pour le diagnostic de MCG. Les patients avec une épaisseur intimale maximale de >0.3mm à 1 an post-TC ont un risque 3 fois plus élevé de développer la MCG et une réduction de survie à 4 ans (73% vs 96%)^{176, 233}. Dans une autre étude publiée par Mehra et al. un épaissement intimal sévère (0.9 ± 0.3mm) était associé à un risque d'événements cardiovasculaires 10 fois plus important.²³⁴ Par ailleurs, une augmentation de l'épaisseur intimale >0.5mm endéans la 1^{ère} année post-transplant était associée à la survenue de la MCG à l'angiographie (65% vs 33%) ainsi qu'un risque de perte du greffon (21% vs 6%) et d'événements cardiovasculaires à 5 ans.²³⁵ Enfin, Raichlin et al. ont démontré l'association entre le rejet et la composante inflammatoire de la plaque (présence de noyau nécrotique et densité de calcium >30%) et la progression de la MCG.¹⁸⁹ L'USIV reste cependant

une technique interventionnelle invasive qui requiert une expertise technique opérateur-dépendante. Son coût est également supérieur à celui de la coronarographie et son temps d'acquisition est plus long.

Figure 23. – Image d'USIV dans l'IVA d'un patient greffé avec atteinte endothéliale MCG

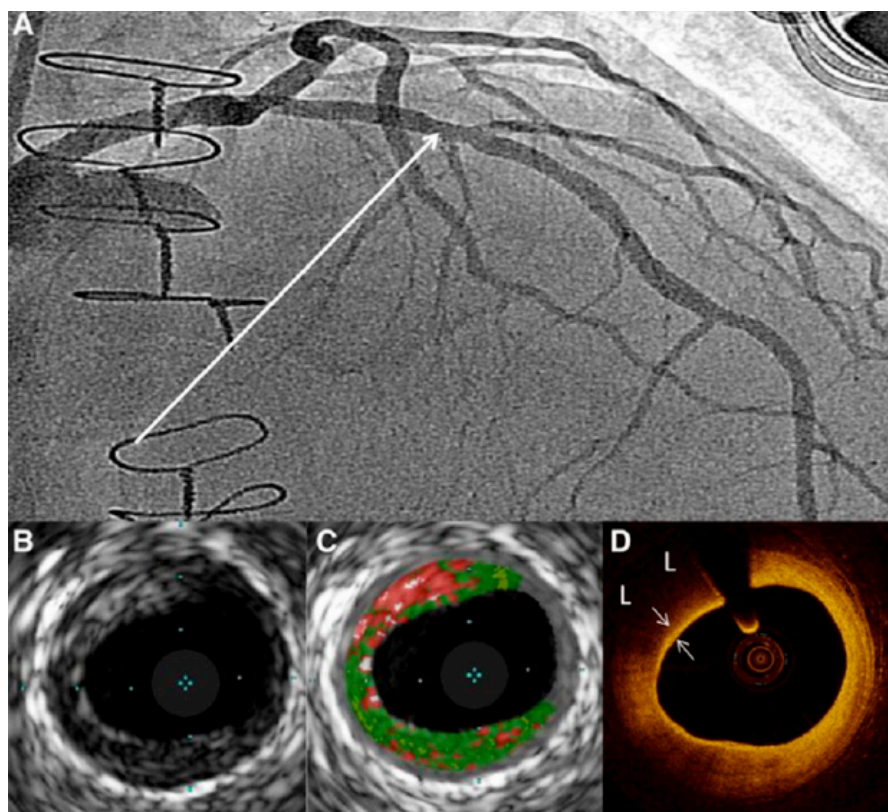


La tomographie par cohérence optique (TCO) permet l'acquisition d'images de grande résolution (10 fois supérieure à USIV) de l'intima mais également de la morphologie de la plaque. Des caractéristiques de plaque vulnérable CTont été observé par TCO après transplantation.²³⁶ Suggérant un potentiel effet de la néovascularisation dans la MCG, Ichibori et al. ont rapporté une augmentation des microcanaux chez les patients à plus d'un an de la transplantation et l'ont corrélé au volume intimal et au risque d'atteinte coronaire.²³⁷ De même, un rejet cellulaire de haut grade est associé à un épaissement intimal et une infiltration de macrophages.²³⁸ Les limitations du TCO demeurent le coût, la nécessité de produit de contraste, et une pénétration tissulaire limitée.

L'étude du flux coronaire invasif via des guides spécifiques permet la mesure de la réserve de flux fonctionnel (FFR) et l'index de résistance microvasculaire (IMR). Le flux à travers la macro

et micro-vascularisation est mesuré via le flux de réserve coronaire (CFR). Une discordance entre une FFR normal et une CFR réduite a été rapporté après transplantation cardiaque, et signe une MCG diffuse des micro vaisseaux.²³⁹

Figure 24. – Coronographie et couplage avec USIV



A. Angiographie conventionnelle ne décelant pas de rétrécissement luminal (la flèche blanche montre le site où les images d'USIV (B et C) et d'OCT (D) ont été enregistrées. B. USIV montrant un épaississement intimal. C. USIV avec histologie virtuelle décelant une zone fibreuse (en rouge) dans l'athérome intimal. D. Athérome fibreux par OCT. « L » représente une zone riche en lipide. (Tiré de : Guddeti RR, et al. Circ Cardiovasc Imaging. 2015 Jan ;8(1))

5.3.1.2. Imagerie non invasive

Des explorations alternatives non invasives ont été appliquées ces dernières années au dépistage de la MCG. Les avantages et limites de ces méthodes comparées à la coronarographie sont présentés dans le Tableau 6.

Tableau 6. – Exploration non invasive de la MCG

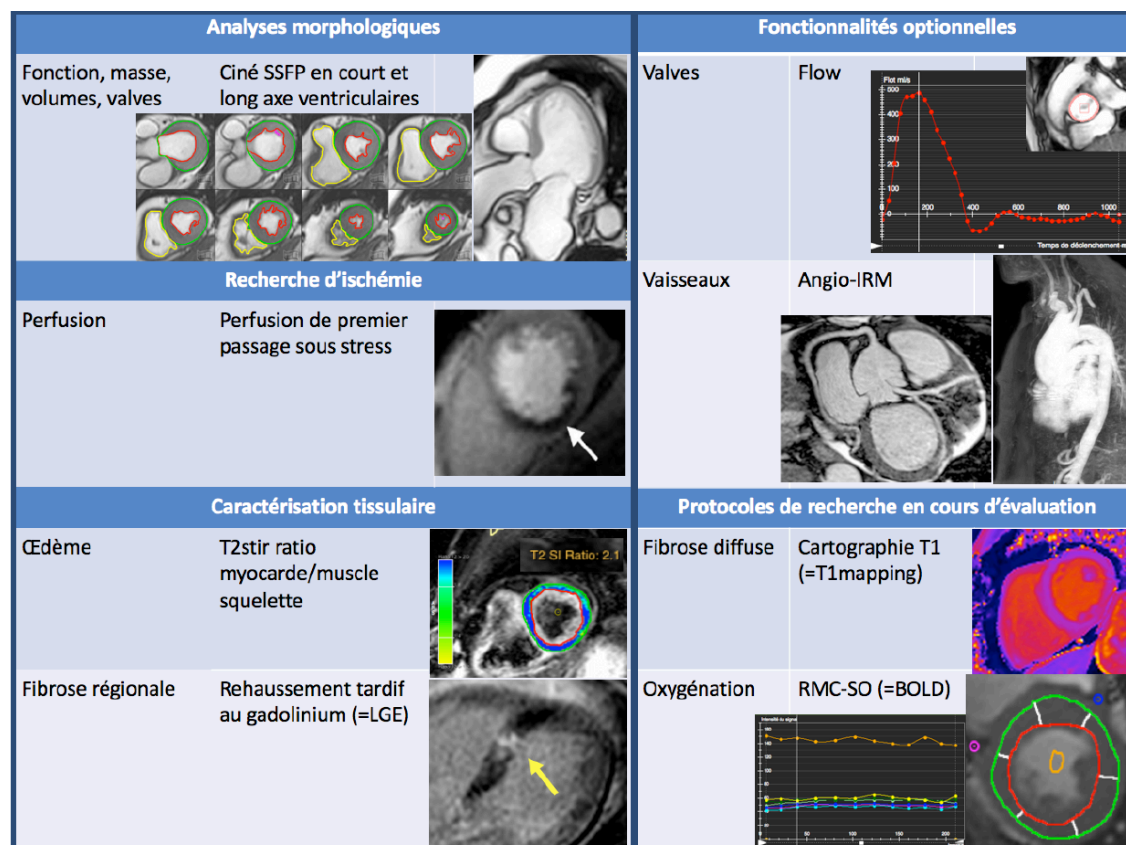
Examen	Sensibilité	Spécificité	Avantages	Limites
CT scanner coronaire	88%	97%	Disponibilité Reproductibilité	Irradiation Résolution temporelle Microcirculation Néphrotoxicité Tachycardie
IRM cardiaque	80%	70%	Reproductibilité Microcirculation Retentissement fonctionnel	Disponibilité Dispositifs implantables ferromagnétiques Hypertrophie du VG
Scintigraphie myocardique au technétium	92%	86%	Retentissement fonctionnel	Irradiation Disponibilité Coût Résolution spatiale
Échographie de stress	72%	88%	Disponibilité Coût	Systématisation Reproductibilité
Échographie de contraste	58%	67%	Etude du flux coronaire	Systématisation Reproductibilité

Le coroscanner (CTA) serait plus sensible que la coronarographie pour l'exploration des petits vaisseaux <1mm ainsi que pour quantifier les lésions de bifurcation²⁴⁰. Cet examen non-invasif permet la description de la lumière du vaisseau ainsi que de sa paroi.²⁴¹ Quelques études ont comparé le coroscanner à USIV chez les patients transplantés.²⁴²⁻²⁴⁴ La sensibilité et la spécificité

pour ces études varient de 70 à 96% et 84% à 92%, respectivement. La haute valeur prédictive négative du CTA comparé à l'angiographie coronaire montre que cet examen pourrait être utilisé dans le diagnostic de la MCG (<50% de sténose). Comparant le CTA à la coronarographie, la sensibilité et spécificité varient entre 71-90% et 80-98% respectivement.²⁴⁵⁻²⁴⁷ Sachant que l'insuffisance rénale chez les greffés est fréquente, le risque de néphrotoxicité lié au produit de contraste limite son application clinique dans le suivi de la MCG. L'ensemble des explorations de la MCG sous-estiment par ailleurs la dysfonction endothéliale de l'allogreffe, indépendante des variations morphologiques coronaires. L'altération précoce de la microcirculation coronaire un an après la TC prédirait la dysfonction chronique du greffon et majorerait le risque de MCG à 5 ans²⁴⁸. Le développement de techniques hybrides telles que la superposition du coroscanner à la scintigraphie pourrait permettre d'objectiver l'ischémie myocardique en regard des vaisseaux coronaires lésés. La cinétique de la progression de la MCG est également à évaluer. Il n'existe pas de consensus sur le rythme des examens de surveillance, la plupart des centres explorant le réseau coronaire tous les 2 ans et annuellement en présence d'une MCG authentique.

La résonance magnétique nucléaire cardiaque (RMC) permet de détecter une perfusion myocardique anormale en déterminant le ratio de perfusion épi et endomyocardique qui diminue dans la MCG.²⁴⁹ Cet examen permet également la mesure de la dysfonction diastolique associée à la MCG avant l'apparition de la dysfonction ventriculaire gauche.²⁵⁰ La détection par la RMC couplée au gadolinium de lésions de fibrose myocardique liés à la MCG permet d'établir un diagnostic précoce de la survenue de la MCG.²⁵¹ Ses avantages majeurs sont la bonne résolution d'image quel que soit le gabarit du patient et la caractérisation de la composition tissulaire du myocarde (degré de fibrose, hémodynamique...). La limitation principale pour son application clinique est son coût relativement élevé, les interférences possibles avec le port de pacemaker implantable, sa disponibilité, la fréquence cardiaque élevée des greffés au repos liée à la dénervation cardiaque (ce qui pose des problèmes d'acquisition d'images) et le risque de fibrose rénale systémique avec IRC.

Figure 25. – Analyse multi-fonctionnelle de la RMC



Les biomarqueurs géniques et protéiques ne sont pas recommandés pour définir la sévérité de la MCG. Hognestad et al. ont démontré que la protéine C Réactive était augmentée dans la MCG²⁵². Plus qu'un marqueur d'inflammation systémique, elle pourrait également avoir un rôle dans l'installation et la progression des lésions endothéliales coronaires après transplantation. L'augmentation du Brain Natriuretic Peptide (BNP) prédit avec une sensibilité de l'ordre de 89 % la survenue d'événements cardiaques à long terme chez les transplantés cardiaques souffrant de MCG évoluée. Sa spécificité est faible compte tenu des importantes variations de concentration plasmatique en cas d'obésité ou d'insuffisance rénale¹⁷⁶.

5.3.2. Traitement de la MCG

Malgré les progrès dans la prévention et le traitement des rejets aigus, l'incidence de la MCG n'a pas sensiblement diminuée. Seule la re-transplantation cardiaque orthotopique permet un traitement définitif à la MCG. Cependant face à la pénurie de greffons, les stratégies préventives ont été privilégiées ces dernières années pour contrôler le développement de la MCG.

5.3.2.1. Pharmacothérapie

La prévention des lésions endothéliales débute par l'optimisation de la protection myocardique lors du prélèvement et de l'implantation de l'allogreffe cardiaque. La prise en charge optimale des infections à CMV chez les transplantés reste controversée. Deux attitudes s'opposent : l'approche prophylactique et l'approche préemptive. La situation la plus à risque d'infection à CMV, est l'incompatibilité sérologique « donneur CMV séropositif/receveur CMV séronégatif ». L'ISHLT recommande la prévention primaire des infections à CMV pendant 3 à 6 mois par du valganciclovir afin de réduire le risque ultérieur de MCG.²³¹ L'allo-immunisation prégreffe est associée à un risque doublé de développer une MCG précoce lorsque le test de réactivité aux alloantigènes est >10%²⁵³. Les résultats de la désensibilisation par traitement immunomodulateur (immunoglobulines, plasmaphérèses, thymoglobulines polyclonales, cyclophosphamide, inhibiteur du protéosome, mycophénolate mofétil et azathioprine) sont controversés dans la prévention de la MCG²⁰⁷. La plupart des études publiées excluent les patients avec un panel réactif trop élevé²⁰⁸.

Les statines sont un pilier majeur du traitement des patients greffés eu vue de leur propriété hypocholestérolémiante.²⁵⁴ In vitro les statines inhibent l'activité cytotoxique des lymphocytes T en synergie avec la ciclosporine. Elles bloquent également le chimiotactisme des monocytes et inhibent la prolifération des CML^{181, 183, 255}. La pravastatine réduit l'incidence de rejet cardiaque et diminue l'incidence de MCG²⁵⁶. Ce bénéfice sur la survie serait indépendant de son effet hypocholestérolémiant mais relèverait davantage de ses propriétés anti-inflammatoires. Les statines sont ainsi recommandées dès la deuxième semaine après TC, quel que soit le niveau de cholestérolémie. La simvastatine atténue la progression de la MCG avec une amélioration de l'activité cytokine cardio-spécifique, la fonction endothéliale et l'amélioration de la survie.^{257, 258}

Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion-angiotensine (IEC) et les bloqueurs du récepteur de l'angiotensine (BRA) réduisent l'incidence de la MCG en diminuant le pool de mononucléaires périphériques et ainsi inhibe la cascade d'événements menant à la MCG.²⁵⁹ Ils améliorent également la vasomotricité coronaire²⁶⁰. Une augmentation de l'ARNm du récepteur à l'angiotensine II (AII) pourrait être responsable de la pathogenèse de la MCG en agissant sur l'inflammation, le remodelage de la MEC, l'apoptose et la fibrose.²⁶¹ Fearon et al. ont démontré que le traitement par ramipril durant la première année après transplantation était efficace à diminuer la pression artériel sans supprimer le développement de la plaque.²⁶² De façon intéressante, le ramipril a montré une amélioration de la microvascularisation à 1 an à l'IRM, ce qui serait associé à une meilleure survie.

Une supplémentation en **vitamines anti-oxydantes C et E** retarderait également la progression de la MCG en agissant sur le remodelage des lésions sténosantes plutôt que sur la fonction endothéliale²⁶³.

Enfin, **l'aspirine (ASA)** est associée à une diminution des taux de MCG au stade modéré à sévère à 5 ans, ainsi qu'une survie libre d'événements supérieure comparée aux patients ne prenant pas l'aspirine.²⁶⁴.

5.3.2.2. *Immunosuppression*

Aucun traitement pharmacologique ne permet actuellement d'inverser durablement le processus fibroprolifératif observé dans la MCG. Peu de données sont cependant disponibles sur l'amélioration du pronostic à long terme après TC.

Les **agents immunosuppresseurs** permettent de diminuer le risque de rejet aigu et la prolifération de CML, et ainsi réduire la fréquence et la sévérité de la MCG. En diminuant l'incidence et la fréquence des rejets aigus post-transplantation, le **tacrolimus (TAC)** préviendrait indirectement le développement de la MCG. Le traitement standard immunosuppresseur après transplantation consiste en un inhibiteur de la calcineurine associé aux corticoïdes et au **mycophenolate mofetil (MMF)** ou **l'azathioprine (AZT)**.²³¹ Ces dernières années ont vu le changement de traitement en faveur de TAC sur la **cyclosporine (CsA)**, et de MMF sur AZT. En effet, le MMF réduirait significativement l'incidence de la MCG comparativement à l'AZT en diminuant la production d'anticorps anti donneur et en bloquant la prolifération des CML et des fibroblastes^{260, 265}. Bien que la survie à 5 ans soit similaire entre TAC et CsA, la diminution de l'incidence de l'hypertension et de l'hypercholestérolémie avec le traitement par TAC pourrait contribuer aux bénéfices de cette molécule.²⁶⁶ Guethoff et al. ont comparé à 10 ans les résultats de survie entre TAC et MMF vs CsA et MMF et ont montré une incidence de MCG inférieure avec l'association TAC/MMF et une meilleure survie à long terme.²⁶⁷

Les inhibiteurs des signaux de prolifération tels que les **inhibiteurs de mTOR (sirolimus, évérolimus)** sembleraient également efficaces en diminuant le nombre de rejets aigus et le taux d'infections à CMV. Leur bénéfice sur la prévention primaire de la MCG résulterait aussi de leurs actions protectrices sur l'endothélium coronaire : modification de la migration des CML, augmentation de la production locale de NO, la régulation de la MEC et du tissu fibreux intimal et le blocage de la prolifération des cellules de l'immunité^{211, 268}. L'essai randomisé de phase 3 comparant l'évérolimus à l'AZT chez 634 greffés a montré un ralentissement de la progression de la MCG et un moindre taux de retransplantation à 1 et 2 ans dans le groupe évérolimus²⁶⁹. Keogh et al. ont rapporté un ralentissement de la progression de la MCG à 2 ans chez les

transplantés cardiaques traités précocément par sirolimus²⁷⁰. De même, Eisen et al. ont récemment montré une moindre prolifération intimale à 12 mois post-greffe avec l'évérolimus comparé au mycophénolate mofétil au sein d'une population globale de 721 patients greffés de novo²⁷¹. L'ISHLT recommande de remplacer le MMF ou l'AZT par un inhibiteur de mTOR dès lors que le diagnostic de MCG est posé. Malgré un effet bénéfique sur le remodelage vasculaire coronaire, aucune étude n'a cependant démontré avec un recul suffisant l'impact positif des inhibiteurs de mTOR sur la survie des transplantés cardiaques. La combinaison optimale des différents immunosuppresseurs reste également à définir²⁷².

5.3.2.3. *Traitement interventionnel*

Malgré un taux de succès initial élevé (91-100%), l'angioplastie est considérée comme une technique palliative aux vues des lésions très distales de la micro-vascularisation coronaire dans la MCG.²⁷³⁻²⁷⁵ Le stenting dans la MCG est associé à des taux de resténose intra-stent, d'IDM et de mortalité supérieurs au stenting des artères coronaires natives.^{224, 276, 277} L'étiologie probable serait un environnement lympho-prolifératif résultant d'une dysfonction endothéliale de tout le réseau coronaire, avec une progression de la maladie dans les zones non stentées.²²⁴ Parmi les transplantés traités par angioplastie, 57 % auront besoin d'un nouveau stenting, soit pour resténose soit pour nouvelle lésion²⁷⁸. Les patients présentant une resténose intrastent ont par ailleurs une progression plus rapide de leur MCG sur les autres segments coronaires non stentés, phénomène non observé dans la maladie athéromateuse native²²⁴. L'ISHLT recommande un contrôle angiographique à 6 mois après toute procédure d'angioplastie coronaire pour MCG¹⁷⁷. Les données concernant l'utilisation des endoprothèses à élution de médicaments (DES) comparés aux stents métalliques nus (BMS) sont controversés dans cette indication. Les DES réduiraient le taux de resténose intrastent ainsi que la perte tardive de lumière du vaisseau comparés aux BMS.^{275, 276} Ils constitueraient une option thérapeutique palliative raisonnable pour la MCG, avec un taux de resténose de 12 %²⁷⁸. Aucune différence significative n'a été rapportée entre les stents activés par le sirolimus et les stents au paclitaxel²¹¹. Les traitements interventionnels de la MCG n'ont pour l'instant pas fait la preuve de leur efficacité sur la réduction du taux d'évènements cardiaques. Par ailleurs, la plupart des données concernent les DES de première génération dans des études monocentriques non randomisées et ne prennent pas en compte l'utilisation de stents de dernière génération.

5.3.2.4. *Traitement chirurgical*

La **revascularisation coronaire chirurgicale** est peu applicable à la MCG en raison du caractère diffus des lésions sténosantes. Les taux de mortalité sont élevés (40%) avec des occlusions distales possibles et un risque d'infection ou de retard de cicatrisation liés aux thérapies immunosuppressives.²⁷⁹ L'équipe de Pittsburgh rapporte une expérience de 13 patients ayant bénéficié de pontages coronaires après un délai moyen de 147 mois post-transplantation. Le taux de survie global était de 77 % après un suivi de 39 mois²⁸⁰. Le faible nombre de patients rapportés dans les rares séries rétrospectives publiées laisse penser que les résultats de ce traitement palliatif sont décevants, probablement liés à une surmortalité opératoire et à une absence d'amélioration du pronostic à long terme. Le type de patients pouvant le mieux bénéficier de ce type de revascularisation chirurgicale serait ceux porteurs d'atteintes tritronculaires, avec des taux plus faibles de perte de greffon et une meilleure survie que les mono ou bitronculaires.²⁷⁹

La TC itérative demeure le seul traitement définitif à la MCG. Elle représente 3 % des indications de TC et est associée à un taux de mortalité supérieur à 40 % à 1 an, avec un taux de rejet aigu et d'infection identiques à ceux de la TC de novo¹⁷⁷. Copeland et al. ont rapporté un taux de survie à 10 ans de 58 % après retransplantation cardiaque, similaire à celui observé après transplantation de novo²⁸¹. La MCG constitue la cause la plus fréquente de retransplantation. Elle s'envisage devant une dysfonction du greffon survenant plus de 6 mois après la transplantation initiale. Les indications retenues sont la MCG avec insuffisance cardiaque congestive et la MCG asymptomatique avec dysfonction FEVG sévère. Il n'existe pas de consensus sur le degré de sévérité iconographique ni sur la durée d'évolution de la MCG justifiant l'inscription sur liste d'attente pour une retransplantation. Dans la série rétrospective de Costanzo-Nordin et al. le taux de survie à 5 ans sans traitement définitif était de 85 % et 54 %, respectivement pour MCG modérée (grade 2) et MCG sévère (grade 3)²⁸². La retransplantation pour MCG est actuellement proposée en cas d'échec ou d'impossibilité de revascularisation coronaire transluminale ou chirurgicale. Elle peut parfois s'imposer en première intention devant une MCG sévère à prédominance distale, ou en cas d'altération non réversible de la fonction ventriculaire gauche. L'absence de vasopresseurs préopératoire et de défaillance multi organe

associée à un niveau d'immunisation bas chez un patient jeune, greffé depuis plus de 2 ans, seraient des facteurs de bon pronostic pour une retransplantation^{181, 183}. Cependant, le manque d'organes disponibles et le dilemme éthique limitent son application à plus large échelle à tous les patients porteurs de MCG.^{283, 284}

5.3.2.5. *Recherche translationnelle et théories émergentes*

Le transfert de gènes codant pour des molécules immunomodulatrices et cytoprotectrices pour prévenir la MCG est toujours au stade de l'expérimentation. Le principal écueil, propre à la thérapie génique, est de trouver le vecteur idéal pour le transfert génique spécifiquement au niveau de l'endothélium coronaire pour y potentialiser, par exemple, les voies de l'apoptose²⁸⁵. **La perfusion hétérologue par le sang du donneur et l'administration d'antagonistes de l'endothéline-1** améliorerait la récupération fonctionnelle du myocarde. Elle préserverait l'intégrité de l'endothélium coronaire, prévenant ainsi indirectement le développement de la MCG²⁸⁶. Ces méthodes expérimentales n'ont pas été appliquées en clinique humaine à ce jour. L'inhibition sélective de l'activation lymphocytaire par les **inhibiteurs de Janus kinase** permet expérimentalement de réduire significativement le taux de rejet cardiaque aigu²⁸⁷. Le concept d'induction d'une tolérance immunitaire vis-à-vis de l'endothélium coronaire reposerait sur la neutralisation des cellules dendritiques, cellules présentatrices d'antigène jouant un rôle majeur dans l'orientation ciblée de la réaction immunitaire contre les antigènes du donneur. Aucune stratégie n'est actuellement validée pour permettre la tolérance immunitaire en transplantation d'organe chez l'homme. Expérimentalement, **l'administration de cellules T régulatrices** pourrait inhiber le développement de la MCG²⁸⁸. Certaines équipes travaillent également à établir un profil génétique et protéomique de résistance à la MCG ouvrant la perspective de l'individualisation de l'immunosuppression en fonction du « profil immunitaire » du patient²⁸⁹. Les changements d'expression de marqueurs génomiques de rejet chronique pourraient également permettre le diagnostic précoce de la MCG et son suivi thérapeutique²⁹⁰⁻²⁹². **L'angiopeptine, la photophérèse et les antimétabolites** ont été employés chez les patients présentant une MCG modérée à sévère¹⁹¹. Les **inhibiteurs de prénylation** pourraient également

prévenir le développement de lésions coronaires en atténuant l'intensité de la réponse immunitaire acquise après TC ²⁵⁵.

5.4. Conclusion sur la MCG

La MCG est la première cause de dysfonction chronique du greffon après TC. Les rejets aigus et l'allo-immunisation chronique associés aux troubles métaboliques favoriseraient le remodelage obstructif des vaisseaux coronaires. Le dépistage de cette complication silencieuse est nécessaire afin de prévenir les complications de l'ischémie myocardique chronique. Les explorations non invasives sont une alternative sensible pour le suivi des lésions coronaires après TC. Des investigations en imagerie non-invasive sont en cours d'évaluation et pourraient être d'une grande utilité dans le suivi à moyen et long terme en diminuant le recours à l'imagerie invasive. Aucun traitement ne permet actuellement d'inverser l'évolution de la MCG. Les inhibiteurs des signaux de prolifération sont recommandés en cas de MCG angiographiquement significative mais leur utilisation optimale doit être établie dans de futures études randomisées. L'immunomodulation adaptée au profil génétique pourrait améliorer le pronostic à long terme des transplantés.

Chapitre 6 – Thérapie cellulaire et greffe cardiaque

6.1.État des connaissances actuelles et validité de l'étude

7.1.1. Charge clinique de la maladie cardiaque ischémique

La maladie cardiaque ischémique (MCI) demeure l'une des principales causes de mortalité et de morbidité dans le monde^{1, 2, 293}. En Amérique du Nord, l'infarctus aigu du myocarde (IAM) représente plus de 50% des décès liés aux pathologies cardiovasculaires. Chaque année, environ un million de patients souffrent d'un IAM, qui porte un taux de mortalité d'environ 25% sur 3 ans. Parmi les patients qui survivent à un infarctus du myocarde avec surélévation ST, une certaine proportion présentera une atteinte coronarienne avec une restauration anormale des flux épicaudiques⁴ et une reperfusion microvasculaire inadéquate⁵. La perte subséquente de myocytes viables endommage de façon irréversible le myocarde. Avec un plus grand nombre de patients survivants à l'IAM ainsi que d'un vieillissement de la population, l'insuffisance cardiaque congestive post-infarctus (ICP) est devenu un problème de santé publique majeur avec une augmentation de l'impact social et du fardeau économique et porte un pronostic défavorable pour les patients symptomatiques (jusqu'à 50% de mortalité à 5 ans)²⁹⁴.

7.1.2. Limitations des stratégies thérapeutiques actuelles

Malgré les progrès récents accomplis à la fois dans les stratégies de reperfusion aigue dans IAM et les thérapies préventives chroniques post-infarctus, les méthodes de traitements actuelles sont limitées comme en témoignent les statistiques susmentionnées. Les stratégies thérapeutiques actuelles visent à améliorer la reperfusion myocardique pendant IAM et de limiter les effets délétères de l'activation des systèmes sympathique / neuroendocrines dans l'espoir de stopper la progression de l'insuffisance cardiaque⁷. La transplantation demeure le traitement de choix de l'insuffisance cardiaque et ce malgré les récents progrès des techniques de support d'assistance mécanique. Une amélioration considérable de la prévention et du traitement du rejet aigü a été réalisée ces 20 dernières années. Une meilleure connaissance de l'immunologie de greffe

associée à une utilisation de plus en plus efficace et ciblée des traitements immunosuppresseurs a permis une amélioration de la survie à court terme des patients transplantés. Cependant, le succès à long terme des transplantations d'organes a été peu modifié : il est toujours compromis par la survenue d'une dysfonction chronique du greffon. Les facteurs déterminants la survenue d'une dysfonction chronique du greffon sont multiples, immunologiques ou non immunologiques. La maladie vasculaire du greffon reste un des facteurs déterminants de l'évolution des greffes cardiaques pouvant aboutir à une défaillance chronique du greffon. C'est la principale cause de perte de greffon après 1 an. Ainsi, le registre de la Société Internationale de Transplantation Cardiaque et Pulmonaire (ISHLT) montre des taux de survie des greffés cardiaques à 5 et 10 ans de 60 et 45% respectivement. Ce registre indique également que des lésions vasculaires chroniques sont mises en évidence par l'angiographie chez 8% des survivants à un an, 32% des survivants à cinq ans et 43% des survivants à huit ans. Par ailleurs, des travaux récents ont suggéré que l'impact de la maladie vasculaire du greffon serait sous-estimé en transplantation hépatique ou rénale. À l'heure actuelle, la transplantation cardiaque orthotopique reste le seul traitement curatif pour les dommages graves et irréversibles post-infarctus. Pourtant, la pénurie chronique de greffons cardiaque a limité l'accès à la transplantation cardiaque. Cet écart entre l'offre et la demande souligne la dure réalité actuelle : cette avenue thérapeutique ne remplit plus les exigences d'un besoin clinique croissant. En conséquence, de nombreuses nouvelles thérapies alternatives ont été explorées¹⁰ dont moléculaires, pharmacologiques et assistances mécaniques¹¹. Parmi ces stratégies, la thérapie à base de cellules souches pour la régénération cardiaque a capté l'attention des cliniciens et des scientifiques et a émergé comme une thérapie controversée, mais prometteuse, et potentiellement curative¹².

7.2. Approche thérapeutique basée sur les SC

7.2.1. Base biologique

Une croyance scientifique de longue date était que le cœur est un organe post mitotique avec une différenciation terminale avec une incapacité de régénération. Au cours des dernières années, un nombre croissant de preuves a contesté cet axiome, soutenant l'idée que le cœur de mammifère adulte peut en effet subir une réparation par la régénération des cardiomyocytes, à partir de deux sources endogènes et en circulation. Des rapports documentant l'existence de cardiomyocytes immatures capables de réintégrer le cycle cellulaire²⁹⁵ ou de la réparation cardiaque par des cellules souches non cardiaque a encore renforcé l'hypothèse du potentiel régénératif du cœur²⁹⁶. Une grande partie de l'engouement récent et l'intérêt suscité par le domaine de la médecine cardiovasculaire régénérative tourne autour de la notion de la plasticité des cellules souches adultes (SC)²⁹⁷⁻²⁹⁹. Les SC sont des cellules indifférenciées qui sont définies par leur auto-renouvellement, leur clonogénicité et leur potentialité. Résidant au sein de « niches », ces SC sont activées dans des conditions telles que la lésion tissulaire³⁰⁰.

7.2.2. Source potentielle de CS du donneur pour la régénération cardiaque

Au cours des 30 dernières années, les CS ont ouvert une nouvelle voie potentiellement thérapeutique pour le traitement des patients insuffisants cardiaques dont le but ultime serait la régénération myocardique. Les CS jouent un rôle majeur dans la préservation de l'homéostasie et du développement pendant toute la vie.^{301, 302} L'utilisation du type de CS appropriée dans la régénération tissulaire est d'une importance majeure³⁰³⁻³⁰⁸ Ce pool de CS très diversifié peut être divisé en CS adultes/progénitrices (ASPCs) et CS pluripotentes (PSCs, iPSCs). Dans le cadre de la régénération cardiaque, différents types de PSCs comme les CS embryonnaires (ESCs) et les PSCs induites (iPSCs)^{309, 310} de même que les ASPCs de type CS mésenchymateuses (CSMs)³¹¹,

³¹², les cellules mononucléaires CD34+ (BMNSCs)^{313, 314} ainsi que les cellules cardiaques progénitrices (CSPCs)^{315, 316} ont été utilisées dans nombreuses études cliniques et précliniques.³¹⁷ En théorie, les CS agissent d'abord en sécrétant un des facteurs paracrines/autocrines au sein du microenvironnement cardiaque atteint, puis par stimulation de l'activation et de la prolifération des CSPCs endogènes natives autour de la zone infarctée et finalement en potentialisant les nouvelles lignées cardiaques. Tous ces mécanismes aboutissent à des effets cardioprotecteurs et régénératifs au sein du myocarde atteint.³¹⁸⁻³²¹ Une amélioration significative de la fonction cardiaque chez l'homme et les modèles animaux a pu être observée.^{319, 320} Cependant, bien que l'administration des PSCs et ASPCs ont démontré leur capacité de régénération du myocarde, un effet tératogène potentiel des PSCs ont rendu leur utilisation en clinique difficile.³²² Une description exhaustive de tous les types de CS utilisées en transplantation cellulaire dépasse de loin les objectifs de cette thèse. Nous nous focaliserons sur les principales CS utilisées en réparation cardiaque.

7.2.2.1. *CS embryonnaire*

Elles sont obtenues à partir de la masse interne d'embryons au stade de blastocyste. Elles sont hautement prolifératives (peuvent se répliquer indéfiniment *in vitro*) et sont considérées comme pluripotentes c'est-à-dire capables de se différencier en cellules de toutes les lignées germinales. Néanmoins, l'utilisation de cellules souches embryonnaires humaines est confrontée à plusieurs obstacles tels que les questions éthiques, la nécessité d'immunosuppression, des conditions de culture non résolues et le potentiel oncogène.

7.2.2.2. *CS adulte exogène cardiaque*

Les CS squelettiques progénitrices sont dérivées du muscle : les myoblastes squelettiques se trouvent dans un état de repos dans la membrane basale des muscles squelettiques. Facilement isolés à partir d'une biopsie musculaire et considéré comme plus résistant à l'ischémie que les cardiomyocytes, ils peuvent être accrus *ex vivo* puis transplantés de façon autologue. Cependant, leur taux de survie est faible (moins de 50% à 48 heures) après transplantation dans le myocarde ischémique.

7.2.2.3. CS dérivés de la moelle osseuse

Les CS sont définies par (1) leur capacité d'auto-renouvellement ou leur capacité à générer au moins une cellule-fille avec les caractéristiques similaires à la cellule initiale ; (2) leur capacité de différenciation à partir d'une cellule unique ; et (3) leur capacité de régénération *in vivo* d'un tissu cible.³²³ La plasticité des CS est un terme permettant de décrire le grand potentiel qui persisterait dans les CS post-natales. Les critères minimaux permettant de décrire la grande plasticité d'une CS seraient (1) la capacité d'auto-renouvellement ; (2) la capacité de différenciation d'une seule cellule en cellules du tissu d'origine ou en un type de cellule différent du tissu d'origine ; et (3) la capacité de différenciation *in vivo* en cellules du tissu d'origine et au moins un type de cellule différent du tissu originel.³²³ Concrètement, la plasticité des CS est décrite comme la capacité d'une CS de la moelle osseuse (MO), du muscle ou du cerveau à se différencier en CS autre que celui d'origine comme par exemple en CS endothéliale, du muscle squelettique, du muscle cardiaque ou en hépatocytes. Les sources de CS sont multiples, mais la moelle osseuse et le sang sont les deux sources principales explorées au cours des 20 dernières années.³²⁴ Notamment, Krause et al. ont démontré que les CS originaires de la MO peuvent s'intégrer et se différencier en multiples lignées au sein d'organes comme le foie, les poumons, le tractus digestif ou la peau.³²⁴

Pour la compréhension de cette thèse, nous développerons deux lignées de CS provenant de la MO : les CS mésenchymateuses (CSM) et les CS hématopoïétiques. (CSH).

7.2.2.4. CS hématopoïétiques (CSH)

Les CS hématopoïétiques (CSH) sont les CS les plus étudiées dans le monde à l'heure actuelle. En effet, 80% des études rapportant les effets de plasticité des CS adultes ont été réalisées sur les CSH d'origine de la MO ou du sang périphérique enrichi. Leur capacité *in vivo* d'auto renouvellement, de différenciation en tous les éléments matures sanguins, et de repopulation du système hématopoïétique chez l'homme ou l'animal ont été bien décrits.³²⁵⁻³²⁷

Ces CS ont démontré leur capacité de différenciation non seulement en cellules hématopoïétiques mais également en cellules du muscle squelettique^{328, 329}, en cellules cardiaques^{296, 330}, en cellules endothéliales³³¹ ou cellules endodermiques^{324, 332, 333} incluant les hépatocytes, l'épithélium gastro-intestinal et pulmonaire. Krause et al. ont transféré des CSH CD34⁺ Scal⁺, et ont démontré leur différenciation en cellules hématopoïétiques et épithéliales.³²⁴ Orlic et al. ont été les premiers à démontrer dans un modèle d'ischémie myocardique murin, que le transfert de CSH enrichies dans la zone infarctée mène à la greffe de cellules dérivées de la MO qui vont acquérir les caractéristiques immatures des cardioblastes.^{296, 334} Par ailleurs, une amélioration significative de la fonction cardiaque a été observée.

7.2.2.5. CS mésenchymateuses (CSM)

Aux côtés des CSH, la moelle osseuse contient également les CSM. Ces cellules peuvent être cultivées *ex vivo* à travers plusieurs passages et se différencier en une lignée cellulaire mésodermique, incluant les ostéoblastes, les chondroblastes, les adipocytes, les fibroblastes et les myoblastes squelettiques.³³⁵⁻³³⁸ Jiang et al. ont démontré que ces CSM ont la capacité de différenciation en plusieurs lignées cellulaires, suggérant ainsi une capacité d'auto-renouvellement *in vitro*.³³⁹ Reyes et al. ont démontré que les cellules progénitrices multipotentes (MAPCs) peuvent se différencier, en présence de facteurs de croissance endothéliale, en cellules dont le morphotype endothélial est similaire aux cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo*.³⁴⁰ De même, Schwartz et al. ont montré que les MAPCs, induites afin de se différencier en hépatocytes en présence de facteur de croissance fibroblastique 4 et de facteur de croissance des hépatocytes, sécrètent de l'albumine et de l'urée, ainsi qu'une activité phénobarbital induite du cytochrome P450, toutes les fonctions d'un hépatocyte.³⁴¹ Enfin, Hakuno et al. ont démontré que les CSM-MO peuvent se différencier en cardiomyocytes *in vitro* après traitement par 5-azacytidine,³⁴² mais que ces cellules expriment également des récepteurs adrénergiques et muscariniques après différenciation.³⁴³ Ainsi, Pittenger et al. ont caractérisé les CSM par leurs marqueurs membranaires caractéristiques SH2, SH3, CD29, CD44, CD71, CD90, CD106, CD120a, CD124 ainsi que de nombreuses autres protéines de surface.³⁴⁴ Au contraire des CSH, les CSM n'expriment pas le récepteur lipopolysaccharide CD14, CD34 et l'antigène leucocytaire CD45.³⁴⁴ Chen et al. ont réalisé l'injection de 9-10 x 10⁹ (cellules/mL) CSM-MO en intra-coronaire

dans l'infarctus du myocarde et ont observé une amélioration significative de la FEVG quelques mois après l'injection de CS.³⁴⁵

L'injection intracoronaire des cellules souches mononucléaires de la moelle osseuse (BMNSCs) a démontré une réponse thérapeutique et sécuritaire chez les patients présentant un IMA.³⁴⁶⁻³⁴⁸ Il semblerait que la régénération tissulaire serait principalement liée à une réponse angiogénique et une revascularisation des tissus endommagés *via* l'implantation et la stimulations des CS.³⁴⁹ Cependant, de nombreuses études cliniques utilisant les CSM ou BMNSCs n'ont pas démontré d'effet à long terme sur l'amélioration de la fonction cardiaque du patient.³⁵⁰

7.2.2.6. CS d'origine adipeuse (ASCs)

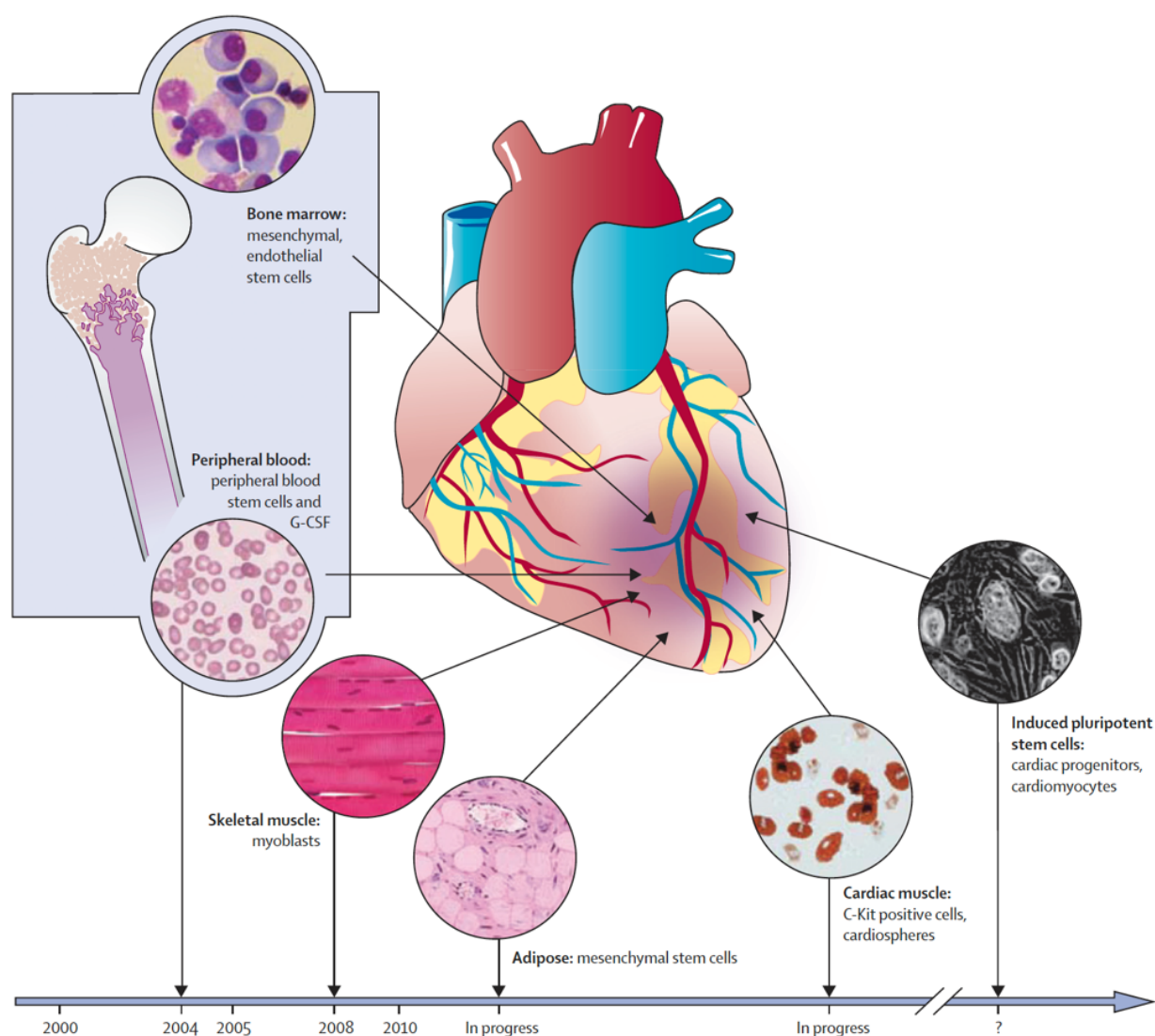
Les CSM sont traditionnellement isolées à partir de la MO. Cependant, ces cellules ont été retrouvées dans d'autres tissus adultes comme le foie, le sang de cordon ombilical, le placenta, la pulpe dentaire ou le tissu adipeux.³⁵¹ Les diverses cellules stromales possèdent certaines caractéristiques communes, au niveau morphologique et immuno-phénotypique.³⁵¹ En effet, les CS dérivées de la MO (CSM-MO) et celles dérivées du tissu adipeux (ASCs) sont les mieux connues à l'heure actuelle.^{352, 353 354, 355} Ces deux types de cellules jouent un rôle prédominant dans la régénération de tissu des patients.³⁵⁵ Les ASCs possèdent l'avantage un moindre risque et une méthode d'isolation des CS beaucoup plus simple par rapport aux CSM-MO. De plus, le tissu adipeux permet de fournir une plus grande quantité de CS que la moelle osseuse.³⁵⁵ De plus, les ASCs possèdent des propriétés de régulation immunologique supérieures aux CSM-MO, ce qui fait les rend plus applicables en clinique.³⁵⁵ Les ASCs sont reconnues comme des sources importantes de CSM dans la réparation et la réparation tissulaire, grâce à leur capacité de prolifération rapide et leur potentiel de différenciation.^{352, 353 354, 355} Leurs propriétés immunomodulatrices et la sécrétion d'une grande variété de facteurs de croissance et cytokines leur permettraient d'avoir un potentiel anti-apoptotique et anti-inflammatoire.³⁵⁵ *In vitro*, les ASCs sont caractérisées par leur adhérence au plastique, leur capacité à former des colonies, leur prolifération rapide, et l'absence de complexe majeur d'histocompatibilité classe II (CMH-II).^{356, 357} Dans un grand nombre de pathologies diverses, les ASCs ont démontré un potentiel de réparation tissulaire et d'immuno-modulation *in vivo*.³⁵⁵

Les ASCs provenant de donneurs sains sont une source attractive de CS pour la régénération d'organes.³⁵⁸ Ces cellules peuvent être obtenues et cultivées *in vitro* en nombre suffisant pour ensuite être délivrées au tissu endommagé pour régénération.³⁵⁹ Les ASCs peuvent se développer en culture durant de longues périodes tout en conservant leur capacité de différenciation.³⁶⁰ Ces cellules peuvent survivre à des températures de congélation avec une perte limitée de la viabilité, de leur capacité de prolifération et de différenciation.³⁶⁰ L'avantage majeur des ASCs est leur capacité d'immunosuppression leur permettant d'être transplantées sans tenir compte du système HLA entre le donneur et le receveur.³⁶¹ *In vitro*, les ASCs n'expriment pas les marqueurs de surface CD14, CD34 et CD45.³⁶² Par contre, ces cellules expriment CD10, CD13, CD29, CD34, CD44, CD71, CD73, CD90, CD105, CD166 et CD271, ainsi que d'autres facteurs trophiques, comme les facteurs modulant la prolifération et la croissance cellulaire, l'immunosuppression, la fibrose et l'angiogenèse.³⁶³⁻³⁶⁸ Par ailleurs, l'activité anti-apoptotique, anti-oxydante, anti-inflammatoire des ASCs font partis des caractéristiques expliquant leur potentiel de régénération,³⁶⁹⁻³⁷¹ et le nombre de facteurs de croissance sécrétés augmenterait en condition d'hypoxie.³⁷² Le traitement par ASCs est désormais communément utilisé dans les stratégies thérapeutiques de la médecine régénérative grâce notamment à ses propriétés immunomodulatrices, sa facilité de prélèvement et le grand nombre de cellules obtenues après isolement.³⁷³ La sécurité de ces ASCs a été démontrée dans de nombreux essais cliniques et précliniques, et ces cellules ont pu être utilisées dans un nombre varié de méthodes thérapeutiques de pathologies diverses.³⁷⁴⁻³⁷⁷

Strem et al. ont été les premiers à démontrer dans un modèle de cryolésion chez le murin que l'injection d'ASCs dans la cavité ventriculaire gauche améliorerait la fonction globale cardiaque et augmentait la densité capillaire dans la zone atteinte comparé aux contrôles.³⁷⁸ Depuis lors, de nombreuses études ont porté sur la capacité de différenciation des ASCs en cardiomyocytes ou en cellules vasculaires.³⁷⁹⁻³⁸² Notamment, il existe une controverse concernant l'efficacité des ASCs. Certaines études ont pu démontrer la capacité de prise de greffe de ces cellules exprimant de façon spécifique les marqueurs cardiaques (troponine I ou myosine)³⁸³⁻³⁸⁵, facteur de von Willebrandt et/ou actine des muscles lisses. D'autres études, au contraire, n'ont pas su démontrer le potentiel de différenciation des ASCs.^{383, 386} Ces différences pourraient être expliquées par les sources diverses d'ASCs, le processus d'isolation et de recrutement des ASCs, les modèles animaux ou les voies d'administration. Ces observations ont mené au questionnement selon

lequel l'efficacité des ASCs serait moins liée à un processus de différenciation directe qu'à la sécrétion de facteurs paracrines.^{330, 387, 388} Une autre fonction importante des ASCs découle de leur potentiel angiogénique.^{383, 389} La sécrétion de nombreuses cytokines proangiogéniques et de facteurs cytoprotecteurs rendent ces ASCs une source idéale de CS pour le traitement angiogénique et l'inhibition de l'apoptose.³⁹⁰

Figure 26. – Evolution de l'utilisation des cellules souches au cours du temps



(Tiré de Ptaszek et al. Lancet 2012;379:933-42)

7.2.3. Voies d'administrations des CS

Malgré de nombreuses études cliniques et précliniques,^{370, 391-393} et la comparaison des différents modes d'administration des CSM, il n'existe pas de consensus à l'heure actuelle sur la méthode optimale d'administration. Nous résumerons ici les principaux modes d'administrations : l'application topique et l'injection locale, l'injection intra-musculaire (IM), ou directe (ID) dans le tissu/organe, la diffusion intra-veineuse (IV) et intra-artérielle (IA) en mettant en avant leurs avantages et inconvénients respectifs.

7.2.3.1. Application topique et Injection locale

Cette méthode d'**administration locale** dans un tissu spécifique ou autour d'une zone ischémique, s'est montré très efficace quant à la précision de la diffusion des CSM et l'augmentation³⁹⁴ du pourcentage des cellules greffées à un site spécifique.^{391, 395} Ce type de stratégie est fréquemment utilisé en complément d'un tissu de remplacement ou un support paracrine direct, afin d'encourager les actions thérapeutiques endogènes via des biomatériaux.^{396, 397} L'application topique des CSM est la méthode la moins invasive et a démontré un grand potentiel dans le domaine des soins de plaies et brûlures, notamment en améliorant la survie des greffe de peau chez les grands brûlés, chez les diabétiques et dans les maladies chroniques.^{398, 399}

L'injection intramusculaire (IM) de CSM représente une méthode simple et sécuritaire d'administration des cellules comparées aux autres voies comme la voie IV, intra-péritonéale (IP) ou sous-cutanée.⁴⁰⁰ Dans cette étude, Braid et al. ont démontré que la voie IM chez un modèle de souris permettait la survie à 5 mois post injection de CSM humaines. De plus, les fibres musculaires squelettiques offrent un environnement hyper vascularisé permettant la diffusion des facteurs trophiques et un support aux actions paracrines des CSM.³⁹⁵ Dans un modèle d'ischémie de membre, les CSM ont démontré des effets de réparation via une promotion de l'angiogenèse et de la revascularisation des tissus ischémiés.^{401, 402} Dans une analyse de la base de données Cochrane sur le traitement de cellules autologues, aucune différence n'a été retrouvée entre la voie IA ou IM dans un modèle d'ischémie de membre.⁴⁰¹ De plus, Soria et al. ont retrouvé une

supériorité de la voie IM sur IA concernant les propriétés prothrombotiques des CSM dérivées du tissu adipeux (ASC).⁴⁰³

L'injection directe (ID) des CSM à l'organe ou au tissu cible est également une méthode efficace d'administration des cellules. Les études précliniques en neurologie ont démontré un bénéfice des CSM dans leur capacité à s'implanter et à se différencier au sein des neurones.³⁹⁴ Ce type d'application a été largement utilisé dans le domaine cardiologique que cela soit dans l'infarctus aigu du myocarde (IAM) ou en insuffisance cardiaque (IC). A noter que la notion de différenciation des CSM en cardiomyocytes ou leur stimulation et prolifération des cellules souches cardiaques a été largement abandonnée au cours des 10 dernières années. Par ailleurs, l'existence de CS résidentes adultes a été récemment remis en question et semble peu probable.

404, 405

L'étude PROMETEUS investiguait l'utilisation de l'injection IM de CSM dans des zones ischémiques non revascularisées chez les patients bénéficiant de pontages coronariens en IC, avec une amélioration de la fonction globale du myocarde et de la FEVG.⁴⁰⁶ Leur hypothèse était que les CSM exerçaient leurs effets via le relargage de métalloprotéases et la stimulation de la néovascularisation. Par ailleurs, les auteurs ont démontré que l'effet des CSM variait en fonction de la distance du site d'injection. Yau et al. ont récemment démontré que l'injection de cellules précurseurs mésenchymateuses chez des patients en IC avancée et recevant un LVAD n'améliorait pas la survie sous LVAD à 6 mois. Ils avançaient également que l'injection trans-épiscardique pourrait mener à la perte de nombreuses cellules et expliquer le manque d'efficacité du traitement.⁴⁰⁷ Kanelidis et al. ont montré dans une méta-analyse d'études cliniques et précliniques d'IAM que l'injection trans-endocardique de CSM présentait de meilleurs résultats que l'injection directe (intra-myocardique).⁴⁰⁶

7.2.3.2. *Injection intra-artérielle*

Il existe des preuves que les CSM exercent leur fonction via un contact direct cellule-cellule et un effet paracrine local, plutôt que via une greffe et différenciation cellulaire à l'organe cible.^{408, 409} La voie intra-artérielle (IA) pourrait potentiellement être la méthode la plus efficace afin d'administrer le plus grand nombre de cellules à l'organe cible en évitant les écueils liés à la voie IV, notamment la séquestration des cellules au niveau du filtre pulmonaire.^{409, 410} Cependant,

cette voie d'administration des CSM en neurochirurgie a montré que le risque d'embolies et de micro-infarctus était réel.⁴¹¹ La taille des cellules, l'accès vasculaire, le dosage des cellules, et la vitesse d'administration doivent être pris en compte lors d'injection des CSM en intra-coronaire ou au niveau des vaisseaux cérébraux.^{412, 413}

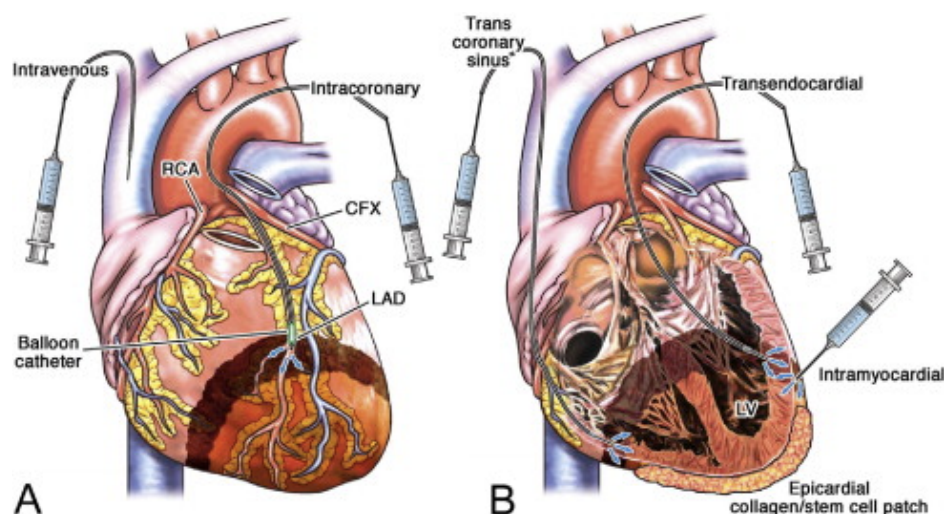
Dans les études cliniques d'IAM, l'injection intra-coronaire de CSM a montré une amélioration de la fonction ventriculaire gauche.^{345, 414, 415} La voie IA permet ici d'éviter les procédures plus invasives et assure une délivrance focale des CSM au tissu ischémique et hypoxique. L'étude SafeCell Heart a démontré d'importantes améliorations de la FEVG après injection de CSM intrac coronaire.⁴¹⁶

Ce mode de délivrance IA a également été montré efficace en intra-carotidien dans les AVC, en intra-rénal dans le cas d'insuffisance rénale chronique, et intra-hépatique dans le cas de cirrhose.⁴¹⁷⁻⁴¹⁹

7.2.3.3. *Injection intra veineuse*

Il s'agit du mode d'administration le plus répandu au vu de sa facilité de réalisation et des risques limités.³⁹¹ Ainsi, il a été démontré qu'une grande quantité de CSM s'accumulait au niveau des poumons mais également au niveau de la rate, des reins et autres organes périphériques après 24-48h.⁴²⁰⁻⁴²² L'approche thérapeutique consiste à l'activation du système immunitaire afin de diminuer la réaction inflammatoire secondaire à l'ischémie, moduler l'inflammation et restaurer l'homéostasie. Les risques d'embolies ou de thromboses sont limités grâce au filtre pulmonaire. Cependant, cette voie de d'administration se solde par moins de cellules survivantes, une dilution des facteurs paracrines aux tissus cibles et un nombre limité de cellules atteignant l'organe cible.

Figure 27. – Représentation des diverses voies d'administrations des CS



7.2.4. Application clinique de la thérapie cardio-vasculaire à base de CS

Au cours des dix dernières années, les essais cliniques sur la base des premières études animales ont rapidement exploité l'hypothèse que le repeuplement des myocards lésés est réalisable par des substituts cellulaires fournis de manière exogène. Cet intérêt récent de la communauté scientifique pour la régénération d'organes n'est pas sans fondement et ces essais ont montré des améliorations à la fois structurelle et fonctionnelle suivant l'implantation de SC. Parmi les différents types de cellules, les myoblastes squelettiques^{424, 425} et CS dérivés de la moelle osseuse⁴²⁶⁻⁴²⁸ ont été le plus largement étudié. La transition rapide vers l'application clinique de l'approche à base de cellules pour la réparation cardiaque a été alimentée en partie par la facilité de la collecte et de la culture de ces deux populations cellulaires. L'essentiel des preuves d'essais cliniques à ce jour n'a documenté que la sécurité et la faisabilité chez 2 populations de patients : ceux qui ont développé un IAM ou dans l'insuffisance cardiaque post IAM.^{429, 430} Cependant, dans de petites cohortes de patients, l'utilisation de critères de substitution et des données négatives à long terme ont limité la capacité de tirer des conclusions définitives quant à l'efficacité clinique de cette thérapie^{430, 431}. Plusieurs problèmes non résolus doivent être abordés

avant que la thérapie à base de cellules puisse aboutir à une utilisation clinique plus répandue⁴³²⁻⁴³⁴. Le lecteur est renvoyé aux publications sur ce topique^{12, 424, 425}

7.2.5. Les controverses actuelles et limitations concernant l'approche à base de cellules pour la régénération cardiaque

Le débat en cours sur le rôle de la thérapie à base de cellules dans la maladie cardiaque ischémique a mis en évidence les controverses actuelles et limitations^{308, 435-440}:

- 1) Le type de cellule le plus approprié reste à définir et, très probablement, peut varier en fonction du temps ainsi que selon le type de lésion myocardique.
- 2) Le taux de survie ainsi que le taux de rétention du myocarde (de la prise de greffe) des cellules livrées peuvent être faible, indépendamment du type de cellule, avec des explications possibles allant de la dépendance cellulaire (niveau de la différenciation, la résistance à l'ischémie, apoptose) à des facteurs cellulaires-indépendants (temps de traitement de la cellule, le mode de livraison, l'interaction avec d'autres méthodes de traitement).
- 3) Il n'y a pas de certitude claire sur les mécanismes qui sous-tendent les avantages cliniques positifs de la thérapie à base de CS. Elles joueraient un rôle pivot dans le processus de régénération / réparation cardiaque : la formation des cardiomyocytes, un effet pro-angiogénique, des effets paracrines sur les cardiomyocytes restants, un remodelage ventriculaire altéré, le recrutement et / ou l'activation des CS pro génitrices cardiaques résidentes.
- 4) L'absence de données à long terme dans la vaste majorité des études illustre le fait que ce domaine en est à ses balbutiements en termes d'application clinique. L'évolution de cette stratégie thérapeutique potentielle devra aller de pair avec celle des modalités d'imagerie appropriées (moléculaires) pour suivre le devenir des CS, une fois délivrées au cœur.
- 5) Des résultats contradictoires sur les avantages fonctionnels de CS transférées ont mis en lumière le manque d'uniformité méthodologique dans le domaine.

Malgré ces questions non résolues, le besoin clinique urgent a incité une transition rapide de la recherche fondamentale aux essais cliniques. Pour ces raisons, il existe désormais un consensus croissant selon lequel une meilleure compréhension des mécanismes fondamentaux impliqués

dans la réparation du myocarde sera nécessaire pour pousser ce domaine prometteur de l'avant afin d'exploiter son plein potentiel⁴³⁴.

7.3.Revue de la littérature : CSM et maladie ischémique

Les cellules souches ont la capacité de se renouveler et d'acquérir divers phénotypes par différenciation. Les cellules souches embryonnaires représentent les seules cellules ayant la capacité de régénérer tout type de tissus ou organes du corps humain. Elles ont toutefois été abandonnées en recherche dû à plusieurs enjeux, notamment au niveau éthique par rapport à leur isolation du blastocyste⁴⁴¹. Des cellules pluripotentes créées à partir de fibroblastes grâce à l'induction de gènes foetaux a apporté un grand espoir à la médecine régénérative cardiaque. Il s'agit d'une reprogrammation en cellules souches embryonnaires sans confrontation aux enjeux éthiques de celles-ci. Il existe toutefois encore certaines problématiques reliées à la tumorigenèse et à l'arythmogénécité de ces cellules qu'il faut solutionner avant la translation vers la clinique⁴⁴². L'intérêt est désormais orienté vers les cellules souches adultes, c'est à dire dérivées d'organes différenciés, qui sont quant à elles multipotentes. Elles possèdent encore un potentiel de différenciation appréciable. Parmi ces cellules, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont les plus exploitées en recherche et en clinique. Elles peuvent être isolées de plusieurs sources incluant la moelle osseuse³³⁰, le cordon ombilical⁴⁴³, le placenta⁴⁴⁴ et le tissu adipeux⁴⁴⁵. Elles ont un rôle dans le contrôle de l'intégrité des niches cellulaires, particulièrement pour les cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse³³⁰. Il s'agit d'une population prometteuse pour la thérapie cellulaire cardiaque grâce à leur capacité de différenciation en cellules cardiaques et vasculaires et à sécréter un vaste spectre de facteurs paracrines.⁴⁴⁴ Elles ont aussi l'avantage d'exprimer faiblement l'antigène majeur d'histocompatibilité de classe I (MHCC) avec absence du MHCC de classe II, ce qui permet une tolérance de l'organisme à une transplantation allogénique^{446, 447}. Les CSM sont définies par leur adhérence au plastique en culture in vitro, avec un phénotype non-hématopoïétique exprimant les marqueurs de surface CD90, CD105 et CD73 en absence des marqueurs CD14, CD34 et CD45.⁴⁴⁸ Elles ont également la capacité de se différencier en adipocytes, ostéocytes et chondrocytes in vitro en présence d'agents spécifiques⁴⁴⁹. La transplantation de ces cellules a été explorée dans plusieurs modèles d'ischémie, au niveau d'organes tels que le rein et le cœur⁴⁵⁰⁻⁴⁵². Une injection de CSM 5 jours après infarctus chez le porc résulte en une augmentation de la fraction d'éjection, accompagnée

d'une diminution de la taille de l'infarctus observée par résonance magnétique⁴⁵³. Les études précliniques ne démontrent toutefois qu'une faible persistance des CSM dans le myocarde^{454, 455}. Ainsi, seul 0,44% des CSM humaines injectées dans des souris immunodéficientes ont été identifiées dans le myocarde, ayant adopté la morphologie des cardiomyocytes de l'hôte. L'immunofluorescence a par ailleurs montré une co-localisation de CSM avec des marqueurs de cardiomyocytes tels la desmine et la troponine cardiaque I⁴⁵⁶. L'imagerie confocale a confirmé que les CSM se retrouvaient principalement dans les poumons, rarement dans le myocarde infarcté porcine⁴⁵⁷. Il est alors important de souligner que la fréquence de domiciliation des CSM dans le cœur reste faible pour lui attribuer le rétablissement fonctionnel observé. L'hypothèse d'un effet paracrine est ainsi favorisée dans l'explication de l'efficacité des CSM contre la pathologie⁴⁴¹. Le dogme actuel stipule que les CSM interviendraient par des effets paracrines sur le microenvironnement du myocarde endommagé, à travers la sécrétion de différents facteurs trophiques plutôt que par différenciation directe^{458, 459}. Les facteurs trophiques incluant les cytokines, chimiokines et facteurs de croissance sécrétés par les CSM constituent le sécrétome très varié de ces cellules. En ischémie, les CSM induisent la néo-vascularisation via une signalisation paracrine^{460, 461} avec des effets anti-apoptotiques, anti-inflammatoires et antifibrotiques sur les cardiomyocytes et les cellules endothéliales^{462, 463}. Aussi, l'injection du milieu de conditionnement des CSM dans des cœurs de rats infarctés a montré une réduction de la taille de l'infarctus et une amélioration de la fonction ventriculaire⁴⁶⁴. L'administration du milieu seul ne peut toutefois pas avoir le même impact que l'injection de cellules due à une pharmacocinétique limitante caractérisant l'administration de protéines dans l'organisme³³⁰. Les premiers essais cliniques ont déjà démontré la sécurité et une efficacité provisoire de la transplantation des CSM humaines en infarctus aigu du myocarde⁴⁶⁵. Plusieurs essais cliniques ont d'ailleurs expliqué les bénéfices de la transplantation de CSM par des effets trophiques³³⁰. Il est toutefois important de préciser que le potentiel paracrine des CSM n'est pas encore optimisé dans les études précliniques pour maximiser son effet thérapeutique en clinique. La caractérisation du sécrétome et sa régulation doit pouvoir augmenter notre compréhension du potentiel thérapeutique des CSM. Malgré une capacité d'expansion *in vitro*, les CSM se retrouvent en très faible proportion dans la moelle osseuse par rapport aux autres cellules mononucléaires (0,001%-0,01%)⁴⁶⁶. Alors que les CSM originaire de la moelle osseuse ont été largement étudiées, la disponibilité, la difficulté d'accès et les procédures invasives nécessaires

pour leur isolation favorisent l'usage de CSM issues d'une autre niche, particulièrement le tissu adipeux. Ainsi, l'accessibilité est facilitée avec un moindre inconfort pour le patient grâce à une procédure de liposuction comparée à la ponction osseuse, avec un rendement cinq fois plus important^{467, 468}. Plusieurs études ont déjà démontré l'efficacité des cellules souches adipeuses (CSA) dans le rétablissement cardiaque post infarctus. Hamdi et al. ont transplanté une monocouche de CSA sur la surface du myocarde dans un modèle de cardiomyopathie dilatée murin. Ils ont observé une proportion des CSA dans le myocarde avec un rétablissement de la fonction cardiaque et une réduction de la fibrose⁴⁶⁹. Plusieurs auteurs ont également montré l'amélioration du flux sanguin dans des modèles d'ischémie localisée à un membre suite à une transplantation de CSA, sans toutefois clarifier par quel mécanisme cet effet bénéfique survient^{466, 467, 470}. Une sécrétion de multiples facteurs angiogéniques incluant VEGF et HGF avec un potentiel à induire la croissance et la migration endothéliale, sont des hypothèses pouvant expliquer les bénéfices de la transplantation de CSA^{471, 472}. Beitnes et al. ont montré une amélioration de la fraction d'éjection du ventricule gauche et une réduction de la taille de l'infarctus accompagnée d'une augmentation de la vascularisation suite à l'injection de CSA humaines dans des rats. Également, l'absence de CSA post-injection dans le cœur suppose un effet paracrine⁴⁷³. Il s'agirait alors d'une population cellulaire très prometteuse et avantageuse en ce qui a trait au rétablissement cardiaque. En plus de l'effet que peuvent avoir les cellules souches sur la néo vascularisation, elles peuvent également moduler l'inflammation du myocarde ischémique. L'inflammation est un processus vital pour la guérison à la suite d'une ischémie. La réparation cardiaque est donc dépendante de la mobilisation de cellules immunitaires servant à libérer la zone infarctée des cellules mortes et des débris de la matrice. Enfin, de nombreux médiateurs nécessaires à l'angiogenèse et la croissance des fibroblastes sont produits. Toutefois, l'activation immunitaire n'a pas que des effets bénéfiques car les cellules inflammatoires cytotoxiques infiltrant le myocarde peuvent exacerber l'ischémie et augmenter la perte des cardiomyocytes⁴⁷⁴. À cet effet, plusieurs fonctions immunomodulatrices ont été décrites dans la littérature pour les CSM. Celles-ci peuvent moduler l'immunité innée en agissant sur les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques⁴⁷⁵ et peuvent également agir sur l'immunité adaptative, principalement par inhibition de la prolifération des cellules T⁴⁷⁶. Les CSA pourraient avoir un potentiel immuno modulateur beaucoup plus important que les CSM de la moelle osseuse⁴⁷⁷. Ainsi, le sécrétome des CSA est beaucoup plus riche en cytokines et

facteurs anti-inflammatoires que les CSM dans les expérimentations *in vitro*^{478, 479}. Plusieurs types de préconditionnement ont été explorés pour enrichir le sécrétome des CSM et des CSA. Ainsi, l'hypoxie, le prétraitement avec des cytokines tels le TNF- α ou l'IFN γ ont tous démontré une efficacité à augmenter la sécrétion de VEGF, IGF-1, HGF et plusieurs modulateurs trophiques par les cellules⁴⁸⁰. L'administration de CSM prétraitées par hypoxie dans un modèle de rat avec cardiomyopathie diabétique a démontré une protection des cardiomyocytes par augmentation de la metalloproteinase-2 (MMP-2), avec inhibition de TGF- β et caspase 3, accompagnée d'une augmentation du ratio Bcl2/Bax³⁴⁴. En plus de l'inflammation qui caractérise le myocarde après un épisode ischémique, il y existe une réorganisation importante au niveau de la matrice extracellulaire. Le remodelage cardiaque est d'abord adaptatif suite à un infarctus du myocarde. Toutefois, à cause de l'augmentation de la précharge due à une perte importante de muscle cardiaque, un remodelage pathologique s'ensuit impliquant la zone de l'infarctus ainsi que la zone avoisinante⁴⁸¹. Le remodelage du ventricule gauche implique une prolifération excessive des fibroblastes, remplaçant les cardiomyocytes apoptotiques et nécrotiques. La matrice extracellulaire perd la régulation dynamique de l'équilibre entre les enzymes de dégradation, les métalloprotéinases (MMPs) et les inhibiteurs endogènes des métalloprotéinases (TIMPs). Les CSM ont été efficaces à réduire la fibrose dans des modèles de cardiopathies ischémiques et non ischémiques⁴⁸². Plusieurs groupes ont également prouvé un effet antifibrotique des CSA⁴⁸³. Une injection de CSA dans la zone péri-infarctus a diminué la fibrose tout en augmentant l'angiogenèse après analyse des cœurs post-mortem^{383, 484}. Le mécanisme expliquant ces effets reste toutefois ambigu mais les hypothèses se concentrent sur un effet paracrine du HGF et IGF connus pour avoir des effets antifibrotiques^{484, 485}. Ainsi, pouvoir augmenter le relargage de ces facteurs augmenterait l'efficacité des cellules à contrer l'inflammation et le remodelage. En plus des préconditionnements décrits plus haut, que ce soit par hypoxie ou par immunostimulation, il existe une autre méthode qui est la culture des cellules en trois dimensions (3D). Les agrégats cellulaires nommés sphéroïdes (SB) sont utilisés en génie tissulaire et en médecine régénérative. Étant des structures tridimensionnelles, ces sphéroïdes préviennent l'apoptose et promeuvent la stabilisation cellulaire⁴⁸⁶. Ainsi la culture en 3D permet de rétablir les paramètres limitants rencontrés en culture sous forme de monocouche à savoir l'architecture tissulaire, la mécanique et la biochimie des contacts cellulaires directs⁴⁸⁷. Il s'agit donc d'une méthode qui augmente la prédictibilité des résultats *in vitro* puisqu'il y existe une

maintenance d'une matrice extracellulaire organisée que le traitement enzymatique requis pour récolter les cellules en monocouche détruit. Plusieurs études ont démontré l'augmentation du potentiel thérapeutique en cultivant les cellules souches en 3D, que ce soient les CSM de la moelle osseuse ou les CSA. Par exemple, Bartosh et al ont montré que les CSM sous forme de sphéroïdes de 25000 cellules exprimaient plus fortement les protéines anti-inflammatoires et anti-apoptotiques⁴⁸⁸. Puisque le centre des sphéroïdes est exposé à une hypoxie modérée, il y a une similitude à un préconditionnement ischémique qui améliorerait leur survie et enrichirait leur sécrétome. Pour cette raison, il est important d'évaluer la différence dans la capacité thérapeutique des CSA et des CSM sous les deux formes de culture. La thérapie cellulaire cardiaque recherche également un impact sur la régénération cardiaque endogène. Pendant de longues années, le cœur a été présenté comme un organe avec une très faible capacité à se renouveler, la plupart des cardiomyocytes ne pouvant être échangé durant une vie. Toutefois des preuves expérimentales démontrent l'existence de cellules progénitrices cardiaques (CPC) résidentes pouvant se différencier en cellules musculaires lisses, en cellules endothéliales et en cardiomyocytes⁴⁸⁹. Les plus exploités sont la population de cellules exprimant le récepteur tyrosine kinase c-kit, un marqueur de cellules souches, ainsi que la population de cardiosphères cardiaques. Elles n'expriment pas de marqueurs hématopoïétiques et ont démontré une multipotentialité, une clonalité et une capacité d'auto-régénération⁴⁹⁰. Les premières études ont montré que la transplantation de CPC humaines dans des souris immunodéficientes aboutissait à une domiciliation et différenciation de ces cellules en trois types de cellules décrites ci haut, avec amélioration de la fonction cardiaque⁴⁹¹. Toutefois, ces cellules n'ont pas la capacité de remplacer toutes les cellules mortes suite à un infarctus du myocarde. De plus, plusieurs problèmes quant à leur isolation et expansion avant transplantation ont été relevés, ce qui compliquent leur utilisation en clinique³²⁰. Une nouvelle stratégie thérapeutique mise sur l'activation de CPC par des facteurs ou encore à l'aide d'autres cellules. D'ailleurs, la protéine recombinante HGF augmente la migration et la survie des cellules souches endogènes (CSE)⁴⁹². Des hypothèses ont alors émergé suggérant que les CSM pourraient activer ces CSE puisqu'elles ont un sécrétome riche et varié contenant le HGF. Des analyses immunohistochimiques seulement 10 jours après injection de CSM dans des cœurs infarcis porcins ont suggéré la présence de nouveaux cardiomyocytes avec un marquage c-kit⁴⁹³. Un autre groupe a montré une augmentation du renouvellement de cardiomyocytes par stimulation des CPC suite à une

injection intra myocardique de CSM de la moelle osseuse dans des cœurs infarctés⁴⁹⁴. Les CSM ont donc le potentiel d'agir sur les cellules souches endogènes afin d'augmenter la guérison à travers la différenciation de ces dernières.

7.4.Revue de la littérature : CSM et transplantation cardiaque

La transplantation cardiaque est une thérapie établie pour les patients souffrant d'insuffisance cardiaque au stade terminal (IC) .⁴⁹⁵ De 3500 à 5000 transplantations cardiaques sont réalisées chaque année dans le monde selon le rapport de la Société internationale de transplantation cardiaque et pulmonaire (ISHLT), mais le nombre n'a pas augmenté au cours des 2 dernières décennies en raison de la pénurie de donneurs, malgré l'augmentation du nombre de patients souffrant d'IC.⁴⁹⁶ Bien que les taux de survie à 1 et 5 ans de 85% et 75%, respectivement, semblent favorables, dans 5% à 10% la greffe cardiaque échoue précocement après transplantation.⁴⁹⁷ La dysfonction primaire du greffon et le rejet aigu du greffon après transplantation cardiaque reste mal compris.⁴⁹⁸ Il est évident qu'en plus des facteurs immunologiques, des mécanismes non-immunologiques, tels que les lésions d'ischémie/reperfusion (I/R) jouent un rôle important dans la dysfonction primaire du greffon. Les lésions d'I/R sont connues pour favoriser divers processus de la maladie, y compris l'inflammation, l'apoptose et l'accélération de la réparation des tissus lésés. Des rapports récents ont démontré l'innocuité et l'efficacité des CSM de la moelle osseuse dérivés (BM-CSM) à améliorer la dysfonction d'organe liée à l'ischémie post transplantation.^{499, 500} Ces études ont montré que des BM-CSM amélioraient les reins, le foie⁵⁰¹, les intestins⁵⁰² et les poumons⁵⁰³ ainsi que la récupération fonctionnelle dans la phase aiguë après lésions d'I/R.⁵⁰⁴ Cependant, peu de données sont disponibles concernant le potentiel effet thérapeutique des BM-CSM pour les lésions I/R associées à la transplantation cardiaque ou le rejet chronique.⁵⁰⁵ Les modèles de transplantation cardiaque hétérotopique (TCH) sont largement utilisés en immunologie, en recherche sur la pathologie de greffe ou la protection d'organes.⁵⁰⁶ La TCH combine la sécurité d'une greffe non supportive avec les bénéfices d'un modèle de cœur éjectant. La TCH abdominale a été introduite par Ono et Lindsey en 1969 et leur technique est actuellement utilisée avec différentes modifications des techniques par plusieurs investigateurs.⁵⁰⁷ Bien que l'ischémie elle-même soit une pathologie grave, la reperfusion des tissus ischémiques confère paradoxalement

une nouvelle atteinte tissulaire, en particulier après ischémie prolongée (>4h). De fait, la restauration du flux sanguin et la réoxygénation brutale sont associées à une aggravation des lésions tissulaires et une profonde réponse inflammatoire suite à l'I/R.⁵⁰⁸ En transplantation cardiaque, les lésions d'I/R après conservation dans une solution glacée induit une réponse non immunologique antigène-indépendante. Celle-ci influence le résultat à long terme de la greffe, et déclenche des réponses immunitaires innées et adaptatives⁵⁰⁹ : une restauration rapide d'un pH physiologique au moment de la reperfusion, le stress oxydatif, la surcharge de Ca²⁺ intracellulaire et l'inflammation. En raison de leur activité anti-inflammatoire, immunomodulatrice et leurs caractéristiques de réparation tissulaire, les BM-CSM ont été testés dans différents modèles animaux expérimentaux de lésion I/R et également dans des essais cliniques de transplantation d'organes.⁵¹⁰ Récemment, Montanari et al. ont démontré dans un modèle de TCH syngénique de rat une amélioration de la fonction cardiaque et une amélioration du remodelage cardiaque, une réduction de la fibrose cardiaque ainsi qu'une augmentation de la néovascularisation et une diminution de l'apoptose des cardiomyocytes après l'injection intraveineuse de BM-CSM.⁵¹¹ Cependant, les améliorations observées à 8 jours post TCH ne se retrouvaient pas à 28 jours. Leur hypothèse était que les bénéfices initiaux étaient dus à des microvésicules dérivées des CSM (MV-CSM) qui ont montré leur efficacité à réguler les dommages I/R en transférant le RNA et en apportant de l'adénosine triphosphate (ATP) à travers un transfert mitochondrial aux cellules ischémiques.⁵¹¹ Le transfert d'énergie réalisé par les MV-CSM serait selon les auteurs l'explication du bénéfice des CSM observé à la phase initiale de l'atteinte I/R. De fait, la restauration des stocks d'ATP dans les cellules endommagées serait une étape clé du processus de réparation dans la phase aigüe⁵¹¹, mais ne serait pas suffisant pour améliorer globalement la fonction cardiaque. Les MV-CSM ont également démontré une capacité à induire des gènes pro-survie et de diminuer l'expression de gènes pro-apoptotiques,⁵¹² ce qui pourrait fournir une explication aux effets bénéfiques observés avec les CSM en diminuant le nombre de cellules apoptotiques dans le greffon. Des études récentes ont prouvé que les BM-CSM ont la capacité de migrer activement vers le tissu inflammatoire et devenir partiellement intégré à la couche endothéliale.⁵¹³ Les auteurs suggèrent que l'effet observé contre les lésions d'I/R en transplantation cardiaque pourrait être médié largement par les effets paracrines des facteurs de croissance cytoprotecteurs et les cytokines produites par les cellules injectées. Les BM-CSM ont la capacité d'activer les processus de réparation cellulaire endogènes, incluant la stimulation de

l'angiogenèse, ce qui a été observé chez des cœurs transplantés 28 jours après l'injection de cellules. Une fois distribuées dans un milieu inflammatoire, les BM-CSM peuvent moduler et altérer les réponses inflammatoires en relarguant différents médiateurs afin de générer une réponse locale anti-inflammatoire, et un processus de réparation cellulaire.⁵¹⁴ Des publications récentes de plusieurs groupes ont également montré que le traitement par BM-CSM après une lésion ischémique favorise le passage des macrophages à un phénotype M2 anti-inflammatoire.⁵¹⁴ En plus des actions immunomodulatrices susmentionnées, les BM-CSM peuvent également favoriser la régulation des lymphocytes T qui pourrait réduire le rejet d'allogreffe ce qui fournit une justification supplémentaire à l'utilisation des BM-CSM dans le traitement des lésions I/R.⁵¹⁵ Il serait utile de confirmer si les BM-CSM peuvent améliorer le rejet aigu ou chronique par la réduction de l'infiltration des lymphocytes T en greffe cardiaque. Par ailleurs, l'utilisation d'un modèle de TCH syngénique est intéressant pour l'étude des lésions d'I/R mais l'utilisation d'un modèle allogénique entre deux souches de rats histoincompatibles (CMH mismatch) se rapproche plus de la réalité clinique, et permet d'appréhender de façon plus précise l'étude de la maladie coronaire du greffon.

7.5. Potentialisation de l'effet des CS par culture en 3D

Le résultat des études concernant l'utilisation des CSM est souvent peu probant en partie expliqué par l'hostilité du tissu ciblé comme l'hypoxie, le peu de nutriments disponible ainsi que l'inflammation locale.⁵¹⁶ Ceci démontre la nécessité d'optimiser les thérapies à base de CS incluant le processus de fabrication ou les pré-conditionnements avant transfert de ces cellules. Récemment, une méthode de potentialisation de l'effet thérapeutique des CSM a été démontré par l'application de CS sous forme de sphéroïdes.⁵¹⁷

In vitro, l'organisation des CS en 3D permet des interactions cellules-cellules et permet d'imiter le microenvironnement naturel d'un tissu, comparé à la culture traditionnelle en monocouche (2D). Les différences entre la culture 2D et 3D démontrées dans de multiples études se situent au niveau de l'adhésion cellulaire essentiellement.^{518, 519} Par ailleurs, cette approche en 3D est associée à une augmentation des effets anti-inflammatoires et angiogéniques des CSM^{520, 521}, augmente l'enracinement^{522, 523} et favorise la différenciation des lignées cellulaires cardiaques ainsi que la survie des CS après transfert.⁵²¹

L'expression de facteurs de croissance et cytokines comme l'angiogénine (ANG), le facteur de croissance fibroblastique-2 (FGF-2), l'angiopoietine-2 (ANGPT-2), VEGF et le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) est augmenté dans les CSM cultivées sous forme de sphéroïdes^{520, 524}. Murphy et al. ont montré que les CSM sous forme de sphéroïdes au sein d'un gel de fibrine sécrétaient 100 fois plus de VEGF comparé à la culture en 2D.⁵²⁵ De même, les sphéroïdes CSM sont associés à une augmentation de l'expression de CXCR4, augmentant ainsi l'adhésion des CSM aux cellules endothéliales, ce qui serait un déclencheur majeur de l'appel des cellules après transfert.⁵²⁰ Cheng et al. ont également rapporté 2 fois plus d'expression du récepteur CXCR4 avec les ASCs sous forme sphéroïdes comparées aux cultures conventionnelles.⁵²² Lee et al. ont démontré que l'injection de CSM en intraveineux s'accompagne de micro embolies au niveau pulmonaire et d'une activation de la sécrétion du facteur anti-inflammatoire TSG-6 (TNF α -stimulated gene/protein 6).⁴²² Dans les modèles animaux, la sécrétion de TSG-6 diminue la réaction inflammatoire dans les cœurs ischémiques. Il est démontré que les CSM sous forme sphéroïdes stimulent l'expression de TSG-6 et de stanniocalcine-1 (STC-1), deux protéines anti-inflammatoires.^{518, 526} Les CSM sous forme de sphéroïdes activent la prostaglandine-2 (PGE-2) et TSG-6, connus pour supprimer la sécrétion de cytokines inflammatoires par les macrophages.^{518, 526, 527} Ces CSM sous forme 3D ont démontré une activité immuno-modulatrice supérieure aux cultures monocouches par la sécrétion de plus grandes quantités de TFG- β 1 et IL-6.⁵²⁸ Cependant, aucune différence significative entre les deux méthodes de cultures n'a été retrouvée dans l'expression de la 2,3 indoléamine-pyrrole dioxygénase (IDO), une des enzymes clés du mécanisme d'immunosuppression.⁵²⁸

En plus de leur capacité angiogénique, immuno-modulatrice et anti-inflammatoire, les CSM sphéroïdes agissent sur l'expansion et l'activité de formation des colonies cellulaires⁵²² via la surexpression de gènes *Nanog*, *Sox2* et *Oct4* comparés au culture monocouche.⁵²³

La faible survie des CS transplantées est une des principales limitations de la thérapie cellulaire. Les conditions hypoxiques du milieu tissulaire peuvent entraîner des lésions ischémiques irréversibles envers les CS transplantées. Bhang et al. ont démontré une meilleure survie des CSM sous forme sphéroïdes dans des conditions ischémiques, comparé aux cultures en 2D.⁵²¹ De même, les CSM sphéroïdes ont démontré exprimer des niveaux élevés de facteur 1 hypoxie-induit et de manganèse superoxyde dismutase, tous deux liés à une amélioration de la résistance à l'apoptose induite par le stress oxydatif.⁵²⁹ Aussi, la surexpression de molécules anti-

apoptotiques BCL-2, et la régulation négative de molécules pro apoptotiques Bax par les CSM sphéroïdes ont confirmé les propriétés de survie cellulaire de ces CS.^{517, 521}

La culture 3D des CSM s'accompagnent d'une modification des interactions cellules-cellules et cellule-matrice. La modification de polarisation, l'organisation du cytosquelette, la morphologie cellulaire et le réarrangement des forces physiques au sein de chaque cellule en 3D influencent les propriétés paracrines des CSM.^{530, 531} Les CSM sous forme de sphéroïdes ont montré une amélioration de la fonction cardiaque dans un modèle murin après injection intra myocardique dans la zone péri-infarctus comparé à la culture en 2D.⁵³² De même, l'injection intra myocardique d'ASCs sphéroïdes d'origine humaine dans un modèle d'infarctus porcine améliore la FEVG chez 88.8% des animaux, sans événements arythmogènes, emboliques ou problèmes neurologiques.⁵³³

7.6. Principales études cliniques dans la réparation myocardique

- ***Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodelling in Acute Myocardial Infarction (REPAIR-AMI, 2006)*** : Etude randomisée de 204 patients et ont montré que l'injection intracoronaire de BM-CSM autologue améliore la FEVG à 4 mois et réduit les événements cliniques comparés au placebo chez les patients en infarctus aigu du myocarde.⁵³⁴
- ***Etude LateTIME (2011)*** : Etude en double aveugle avec contrôle placebo sur l'injection intra coronaire de CSM-MO autologues 2-3 semaines après reperfusion percutanée chez les patients présentant un STEMI. Cette étude n'a pas démontré d'amélioration de la FEVG chez les patients traités par CSM.⁵³⁵
- ***First Bone Marrow Mononuclear Cell United States Study in Heart Failure (FOCUS-HF, 2011)*** : Etude prospective sur l'efficacité des cellules mononuclées de la moelle osseuse (ABMNNC) par voie transendocardique chez des patients en insuffisance cardiaque. Celle-ci montre une amélioration de l'angine sans améliorer la fonction cardiaque chez les patients traités par ABMNNC. De même, les scores de qualité de vie étaient améliorés dans le groupe traité par rapport au groupe contrôle.⁵³⁶
- ***Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI 2011)***: Première étude randomisée étudiant les effets de l'administration intracoronaire de CPCs ou CSM-MO chez 59 patients avec revascularisation

coronaire. A 5 ans de follow-up, les niveaux de NT-proBNP sont demeuré réduits indiquant l'absence d'IC. Chez 31 patients, à l'IRM on constate la persistance de l'amélioration de la FEVG ainsi qu'une réduction de la taille de l'IDM. Aucune calcification intracardiaque ou tumeurs n'a été démontré à 5 ans.⁴¹⁵

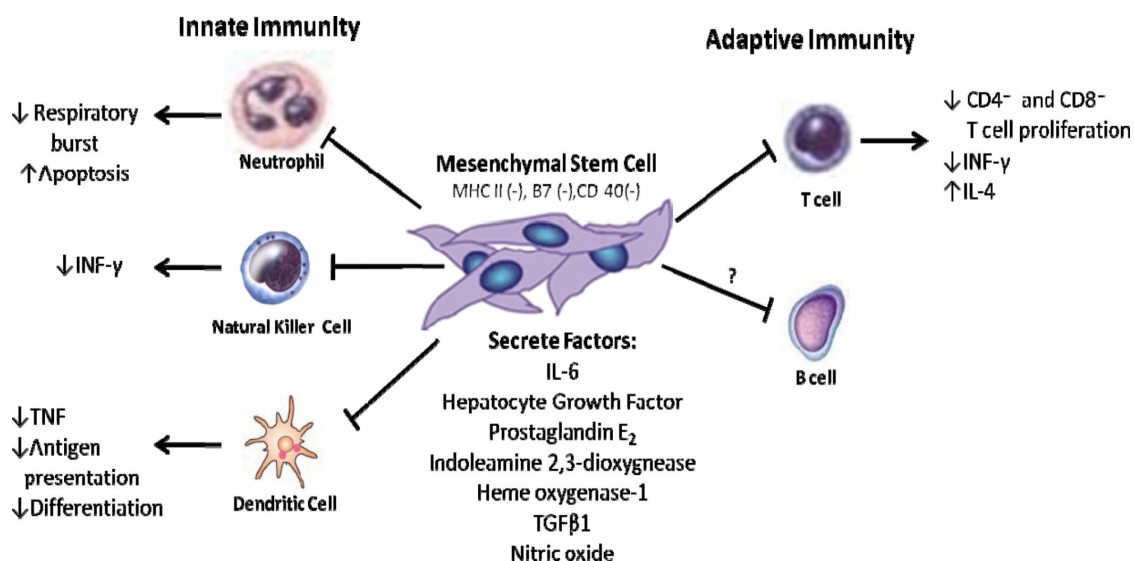
- ***First Mononuclear Cells injected in the United States conducted by the Cardiovascular cell Therapy Research Network (FOCUS-CCTR, 2012)*** : Etude sur l'injection transendocardique de 100 millions de CS autologues n'a pas montré d'amélioration du volume télésystolique du ventricule gauche, de la consommation maximale en oxygène, ou de la taille du défaut au PET Scan chez des patients présentant une cardiomyopathie ischémique non revascularisable. Une sous-analyse a cependant démontré une amélioration significative de la FEVG attribuable aux CSM.⁵³⁷
- ***Swiss Multicenter Intracoronary Stem Cells Study in Acute Myocardial Infarction (SWISS-AMI, 2013)*** : Etude sur 200 patients où l'injection intracoronaire de BM-CSM après STEMI n'a pas montré d'amélioration de la FEVG à 4 mois. Ils comparaient l'injection de CSM précoce (5-7j) et tardive (3-4 semaines) après le STEMI et n'ont pas montré de différences en termes de survie entre les groupes.⁵³⁸
- ***Cardiopoietic stem Cell therapy in heart failURE trial (C-CURE, 2013)*** : Etude prospective, multicentrique, randomisée, menée chez des patients présentant une insuffisance cardiaque d'origine ischémique qui ont reçu le traitement standard ou un ajout de CSM. Celles-ci ont été délivré par injections endomyocardiques au ventricule gauche guidées par cartographie électromécanique. La FEVG était améliorée dans le groupe CSM et associée à une diminution du volume télésystolique du VG. Le test de marche de 6 minutes était également amélioré dans le groupe thérapie cellulaire.⁵³⁹
- ***Intracoronary autologous bone marrow cell transfer after myocardial infarction (BOOST-2, 2017)***: Etude randomisée multicentrique, contrôlée par placebo, en double aveugle, concernant les effets thérapeutiques de l'injection intracoronaire de CSM-MO irradiés chez 153 patients avec STEMI. Les CSM-MO irradiés n'ont eu aucun effet thérapeutique significatif sur la FEVG chez ces patients.

Chapitre 7 – Cellules souches et immunomodulation

7.1. Introduction

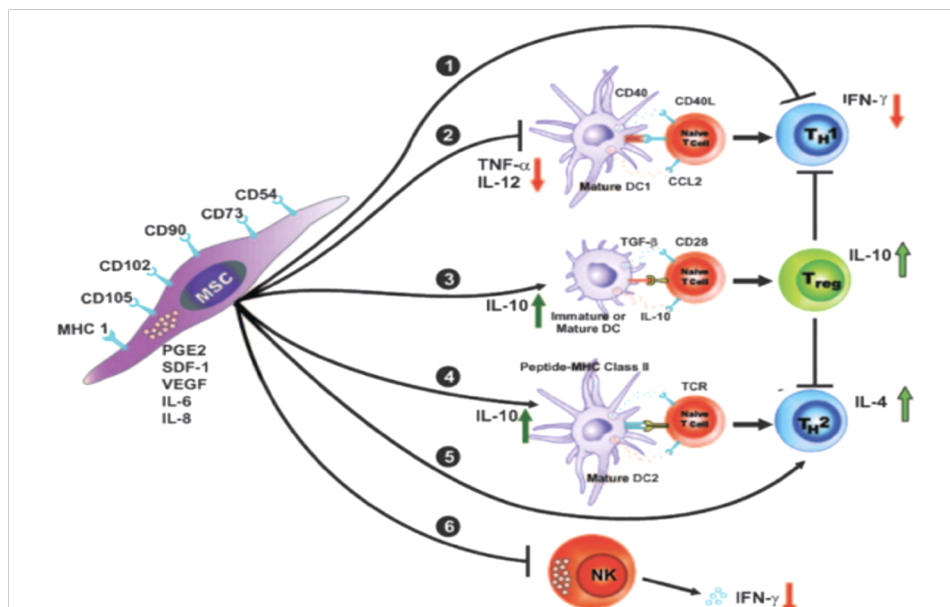
Les CSM humaines expriment des niveaux modérés d'antigène leucocytaire humain (HLA) lié au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I, une absence d'expression du CMH de classe II et n'expriment pas les molécules de co-stimulation B7 et CD40 ligand.^{446, 447, 540} La tolérance des CSM comme transplantation allogénique est due à cet immuno-phénotypage unique, associée à une puissante activité immunosuppressive par contact direct cellule-cellule avec des cellules-cibles immunes et la sécrétion de facteurs solubles tels que le NO, l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO), et l'hème oxygénase-1.⁵⁴¹⁻⁵⁴³ Les CSM produisent un effet immuno-modulateur en interagissant avec les deux types de cellules immunitaires innées et adaptatives (Figure 28 et 29).

Figure 28. – Interaction des CSM avec les cellules immunes



Les CSM sont des cellules immuno-privilegiées qui inhibent à la fois l'immunité innée (neutrophiles, cellules dendritiques, cellules natural killer) et adaptative (lymphocyte T et B).

Figure 29. – Mécanismes d'action proposé des CSM.



Les effets immunomodulateurs des CSM se traduisent par une action sur les cellules immunes innées (cellules dendritiques, passage 2-4 ; cellules NK, passage 6) et adaptative (lymphocytes T, passage 1-5). L'inhibition de la sécrétion de $TNF-\alpha$ et la promotion de la synthèse $IL-10$ pourraient affecter la maturation des DC et entraîner la création d'un environnement moins inflammatoire et un phénotype plus tolérant. Par ailleurs, en cas d'environnement pro-inflammatoire, les CSM inhibent la sécrétion de l' $IFN-\gamma$ par les T_H1 ou les cellules NK et favorisent la sécrétion d' $IL-4$ par les cellules T_H2 et ainsi favorise le shift T_H1 vers T_H2 . Les CSM régulent leur propre immunomodulation par des contacts direct cellule-cellule ainsi que par différents facteurs sécrétés. CCL= chemokine ligand ; TCR=T cell receptor

Les cellules immunes innées dont les neutrophiles, les cellules dendritiques (DCs), les cellules tueuses naturelles (NK), les éosinophiles, les mastocytes et les macrophages sont responsables de la défense non spécifique aux infections et les CSM se sont avérés capables de supprimer la plupart de ces cellules pro-inflammatoires. Les neutrophiles sont l'une des premières cellules à répondre à une infection et un processus important dans leur réponse à des médiateurs inflammatoires est le métabolisme oxydatif, caractérisé par une grande consommation d'oxygène et la production de dérivés réactifs de l'oxygène.⁵⁴⁴ Les CSM ont montré leur capacité à diminuer le métabolisme oxydatif par la libération d'interleukine $IL-6$.⁵⁴⁵ Les DCs jouent un rôle particulièrement important dans la présentation de l'antigène aux cellules T naïves et les CSM se sont révélées de puissants inhibiteurs de la différenciation des monocytes immatures en cellules DCs.⁵⁴⁶ En outre, des co-cultures de CSM et de DCs inhibent la production du facteur de nécrose tumoral ($TNF-\alpha$), une puissante molécule pro-inflammatoire.⁵⁴⁷ Les cellules NK sont des cellules

innées importantes dans la défense contre les organismes viraux et pour la défense contre les tumeurs en sécrétant des cytokines et en induisant la cytolyse.⁵⁴⁴ Les CSM cultivées avec des cellules NK fraîchement isolés ont montré une inhibition de la prolifération induite d'IL-2 et une diminution de la sécrétion de l'interféron (IFN- γ) de 80%. Cependant, les cellules NK activées par l'IL-2 peuvent lyser les CSM autologues et allogéniques.⁵⁴⁷ Le système immunitaire adaptatif, composée de lymphocytes T et B, est capable de générer des réponses immunitaires spécifiques à des agents pathogènes par la production de cellules-mémoire. Une fois qu'un lymphocyte T est activé par la liaison d'un antigène étranger à un récepteur spécifique des cellules T, la cellule-T prolifère et relargue des cytokines.⁵⁴⁷ Les lymphocytes T existent soit sous forme de cellules T cytotoxiques CD8+, qui induisent la mort des cellules cibles, soit sous forme de cellules T auxiliaires CD4+ qui modulent les autres cellules immunitaires. De plus, les CSM ont montré leur capacité à supprimer la prolifération des lymphocytes T dans une culture de lymphocytes mixtes.⁵⁴⁷ La suppression de la prolifération lymphocytaire est médiée par des cytokines libérées par les CSM, telles que le rhHGF et rhTGF- β 1, qui peuvent également supprimer la prolifération des lymphocytes T auxiliaires et cytotoxiques.⁵⁴⁵ Lorsque les CSM sont présents au cours de la différenciation des lymphocytes T naïfs en cellules T auxiliaires CD4+, il y a diminution marquée de la production d'IFN- γ et une augmentation de la production d'IL-4,⁵⁴⁸ suggérant que les CSM modifient les cellules T naïves d'un état pro-inflammatoire (production massive d'IFN- γ) à un état anti-inflammatoire (augmentation de la production d'IL-4). Les cellule-B qui produisent les anticorps, sont très dépendantes des cellules-T, et l'inhibition des cellules-T par les CSM contribue probablement aux interactions des CSM avec des cellules-B. Les données contradictoires ont montré que les CSM peuvent inhiber et favoriser la prolifération des cellules-B.^{549, 550} Les études *in vivo* ont démontré que les CSM pourraient jouer un rôle important dans les maladies auto-immunes et le rejet de tissus transplantés. Les transplantations d'allogreffes cutanées survivent plus longtemps avec l'administration concomitante intraveineuse de CSM dans un modèle de babouin,⁵⁵¹ et la perfusion systémique de CSM se localisent préférentiellement dans les zones de dommages tissulaires.⁵⁵² La perfusion de CSM dans la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD), une complication mortelle après greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques, a démontré des résultats encourageants dans les GVHD résistant aux stéroïdes.⁵⁵³ Alors que les CSM ont montré leur capacité à supprimer les cellules immunitaires innées et adaptatives, les expériences *in vitro* avec les CSM induites afin

d'acquérir un phénotype cardiaque ou vasculaire, ont montré une augmentation de l'expression du CMH Ia et II (immunogène) et une diminution de l'expression du CMH Ib (immunotolérance).⁵⁵⁴ Par ailleurs, lorsque des CSM allogéniques étaient transplantés à des rats post-infarctus du myocarde, les cellules ont été éliminées du cœur et n'ont pas amélioré la FEVG.⁵⁵⁴ Ces données provenant de rats suggèrent que les CSM pourraient perdre leurs propriétés immunitaires privilégiées quand ils se différencient ; cependant, les CSM allogéniques transplantées chez des porcs ont montré la greffe de CSM indifférenciés (~ 75% de cellules identifiées) avec quelques CSM différenciées (~ 25%), et n'a pas induit une réponse immunitaire.⁵⁵⁵ En outre, la greffe de ces CSM indifférenciées dans des cœurs post-infarctus peuvent stimuler des mécanismes de réparation endogène.⁵⁵⁶

7.2. Cellules souches et niches inflammatoires

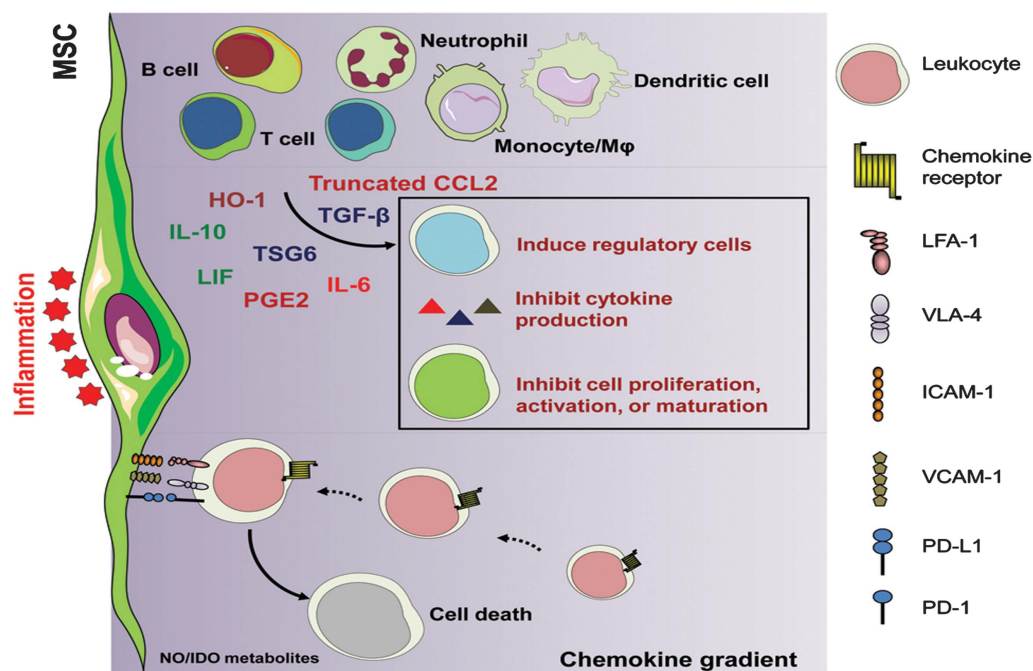
Outre les fonctions réparatrices des CSM dans des niches inflammatoires, des évidences croissantes démontrent que les CSM ont des propriétés immunomodulatrices puissantes.⁵⁵⁶ Par exemple, les CSM conservent les cellules dendritiques (DC) dans un état immature en inhibant l'expression du CMH de classe II, du CD1- α , CD40, CD80 et CD86, et en supprimant la production de cytokines pro-inflammatoires.⁵⁴⁶ Les CSM stimulées par le TNF- α peuvent recruter plus de monocytes/macrophages vers le site d'une tumeur pour former des microenvironnements immunosuppresseurs, améliorant ainsi la croissance tumorale.⁵⁵⁷ En outre, les CSM induisent la sécrétion d'IL-10 par les macrophages *in vitro* et *in vivo*.⁵⁵⁸ Outre les DC et les macrophages, les cellules NK peuvent également être supprimées par les CSM par des facteurs solubles tels que le TGF- β et la prostaglandine E2 (PGE2).⁵⁵⁹ Des résultats similaires sont observés avec des cellules humaines où les CSM inhibent la prolifération cellulaire des NK via l'IL-2 ou l'IL-15.⁵⁶⁰ Dans les réponses immunitaires adaptatives, les CSM sont déjà connues pour inhiber la prolifération des lymphocytes T provoquée par de nombreux types de stimuli, afin de diminuer la production d'IFN- γ et d'induire des cellules Tr1 et Foxp3 lymphocytes T régulateurs.⁵⁶¹⁻⁵⁶³ En outre, ils peuvent diminuer la prolifération des lymphocytes B par contact cellule-cellule et la sécrétion de facteurs solubles, bien que les effets puissent varier considérablement selon les conditions de cultures.⁵⁴⁹ Récemment, il a été suggéré que les

fonctions immunosuppressives des CSM sont déclenchées par le microenvironnement où les facteurs inflammatoires sont libérés en abondance à partir des cellules immunes.^{542, 564} Initialement, les études du mécanisme de modulation immunitaire des CSM ont été contradictoires. Certaines études de maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) et le lupus érythémateux disséminé (LED) ont montré les avantages des CSM pour inhiber vigoureusement les réponses immunitaires *in vivo*.^{553, 565} Dans d'autres études, bien que la suppression de la prolifération des lymphocytes par les CSM puisse être observée *in vitro*, la prolongation de la survie du greffon et le ralentissement de l'apparition du GvHD *in vivo* n'a pas été retrouvé.⁵⁶⁶ Ces études montrent que les propriétés immunosuppressives des CSM pourraient être affectées par des microenvironnements tissulaires spécifiques liés aux maladies. Il a été rapporté que, bien que les CSM allogéniques soient rejetées par le système immunitaire de l'hôte dans les souris receveuses avec mismatch CMH de classe I et II, elles sont exposées à des effets thérapeutiques similaires dans l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), comme celle de CSM autologue.^{567, 568} Autrement dit, même si les CSM ont la capacité de réguler négativement les réponses immunitaires, ces cellules pourraient ne pas être privilégiées immunitairement. Dans la thérapie de base des CSM, le dosage cellulaire est également important. En utilisant un modèle de lésion cérébrale chez le rat, les chercheurs ont récemment découvert qu'il existe un plateau d'efficacité au-dessus duquel les CSM supplémentaires ne pourraient pas améliorer le devenir.⁵⁶⁹ De plus, les CSM avec un nombre élevé de passages en culture ont montré une diminution de l'activation des CSM et de la protection myocardique.⁵⁷⁰ Par conséquent, l'immunosuppression par CSM peuvent être influencées par des conditions telles que la source à partir de laquelle les CSM sont isolées, le nombre de passages en culture avant d'être utilisées, les doses administrées de CSM et les conditions pathologiques spécifiques des receveurs. Néanmoins, les rôles immunomodulateurs des CSM ont suscité un grand intérêt de la recherche fondamentale et clinique.

7.3. Propriétés immunosuppressives des CSM

Récemment, de nombreuses études ont démontré que la capacité des CSM à inhiber l'activité des cellules immunitaires est influencée par le milieu inflammatoire. IFN- γ en combinaison avec l'une des cytokines pro-inflammatoires, le TNF- α , IL-1 α ou IL-1 β , peut stimuler les CSM afin d'obtenir des niveaux très élevés de facteurs immunosuppresseurs, ainsi qu'une augmentation de chimiokines et d'expression de molécules d'adhérence, y compris le CXCR3 ligand, le CCR5 ligand, la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1) et la molécule d'adhésion vasculaire -1 (VCAM-1).⁵⁷¹ Leur action combinée conduit à l'accumulation de cellules immunitaires à proximité immédiate de CSM, ainsi qu'à l'établissement d'un microenvironnement favorable dans lequel les effets des facteurs sécrétés par les CSM sont amplifiés et conduisent à une immunosuppression efficace (Figure 30).

Figure 30. – Propriétés immunosuppressives de CSM



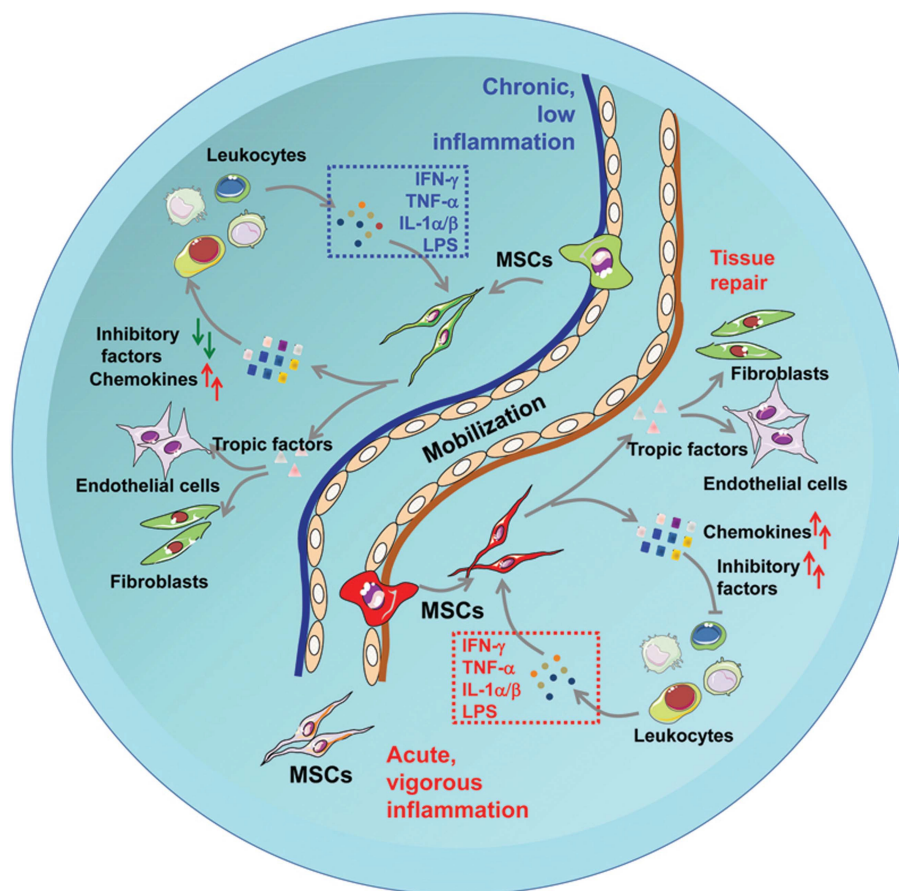
Les tissus endommagés sont toujours accompagnés par une infiltration de cellules immunes et de CSM. L'inflammation déclenche la production de niveaux élevés de chémokines et de molécules d'adhésion dans les CSM, y compris des ligands de CXCR3 et de CCR5, ICAM-1 et VCAM-1. Ces molécules induisent l'accumulation de cellules immunitaires en association étroite avec les CSM, de sorte que des concentrations élevées de NO (dans CSM murines) ou de l'épuisement du tryptophane (dans CSM humaines) conduit à l'inhibition de cellules immunitaires. D'autres facteurs immunosuppresseurs tels que l'IL10, TSG 6, IL-6, LIF, PGE2, HO-1 et CCL2 tronquée pourrait également affecter l'activation, la prolifération et les fonctions des cellules immunitaires.

De manière surprenante, les molécules qui contrôlent l'immunosuppression par CSM ne sont pas les mêmes dans différentes espèces. Ma et al. ont montré que les CSM murines utilisent la synthèse inductible de NO (iNOS) afin de produire de l'oxyde nitrique (NO), très immunosuppresseur à des concentrations élevées grâce à mécanismes encore à définir.^{572, 573} Dans des modèles murins de type hypersensibilité retardée (DTH) et GvHD, lorsque l'activité d'iNOS était abolie dans les CSM soit par inhibition chimique ou ablation génétique, les effets thérapeutiques disparaissaient.^{543, 574} Par ailleurs, les CSM iNOS-déficientes ont également montré des effets thérapeutiques atténués dans l'arthrite auto-immune dans la souris.⁵⁷⁵ Ces résultats suggèrent que le NO est un acteur majeur dans la médiation de la fonction immunosuppressive des CSM chez le murin. L'effet paracrine de protéolyse médié par les métalloprotéinases de CCL2 a également été jugée importante dans la thérapie de CSM chez la

souris dans l'EAE.⁵⁷⁶ Il convient de noter que bien que les CSM murins utilisent le NO pour exercer leur fonction immunosuppressive, les CSM humaines exploitent l'indoleamine-2,3-dioxygénase (IDO) à la place.^{541, 577} IDO est une enzyme qui catalyse la dégradation du tryptophane, un acide aminé essentiel, le long de la voie métabolique vers la kynurénine. L'immunosuppression semble résulter de l'épuisement du tryptophane et l'accumulation de métabolites du tryptophane localement,⁵⁷⁸ mais leurs mécanismes complexes n'ont pas été entièrement investigués. Mis à part IDO, le facteur de nécrose tumorale inductible par le gène 6 (TSG6), une protéine supposée anti-inflammatoire, peut être induite dans les CSM humaines par le TNF- α . La suppression de TSG6 dans les CSM humaines renverse leur capacité à réparer le myocarde infarci, les lésions de la cornée et ne parvient pas à prolonger la survie de l'allogreffe cornéenne.^{422, 579, 580} En outre, la production de TSG6 par CSM humaines peut améliorer la péritonite induite par le zymosan chez la souris en modulant le récepteur Toll-like 2 (TLR2)/facteur nucléaire κ B (NF- κ B) dans la voie de signalisation des macrophages résidents.⁵⁸¹ Cependant, le rôle exact de TSG6 dans l'immuno-régulation des CSM humaine mérite d'autres investigations. D'autres facteurs, tels que HLA-G, FRV et quelques autres, ont montré leur capacité à moduler l'immunosuppression par CSM humaines *in vitro*^{582, 583} (Tableau 1). LIF est sécrétée par les progéniteurs neuronaux ES dérivés de cellules chez la souris et exerce un effet thérapeutique bénéfique sur l'EAE,⁵⁶⁶ bien que le rôle exact de cette molécule dans les effets immunorégulateurs des CSM médiées chez le murin demeure obscure. Des études ont démontré que certaines molécules sont partagées dans l'immunosuppression des CSM murines et humaines, comme la PGE₂, l'IL-10, hème oxygénase-1 (HO-1), le ligand de mort cellulaire programmée 1 (PD-L1) et de l'IL-6^{547, 584} (Figure 3, Tableau 2). En particulier, la PGE₂ est produit par des facteurs inflammatoires stimulé par CSM murines et humaines. La PGE₂ libérée par les CSM de souris ou humaines peut reprogrammer les macrophages pour produire plus d'IL-10, inhiber la maturation des DC, ainsi que modifier l'équilibre entre Th1 et Th2.^{548, 585} Par ailleurs, en présence de PGE₂, les effets de IDO sur la prolifération des cellules T et de l'activation des cellules NK peuvent également être stimulés.^{586, 587} D'autres études du mécanisme d'expression PGE₂ dans les CSM et son rôle dans l'immunorégulation seront utiles pour de meilleures applications cliniques des CSM. Une relation claire existe entre l'IL-10 et le comportement immunosuppresseur des CSM. IL-10 a été trouvé *in vivo* par l'administration de CSM ou *in vitro* lorsque les CSM étaient co-cultivées avec des splénocytes. Cependant, le rôle de

l'IL-10 est encore controversé. Certaines études indiquent que les CSM seules ou avec stimulation LPS / IL-3 ne sécrètent pas d'IL-10, alors que d'autres études ont suggéré que les CSM pourraient produire des niveaux élevés d'IL-10 en co-cultures avec des lymphocytes activés.^{588, 589} Ainsi, il est peu clair si l'augmentation de la production d'IL-10 est due aux CSM seules ou à partir de cellules immunitaires en co-culture avec des CSM. Cependant, il a été démontré que le blocage d'IL-10 n'a pas d'incidence sur l'immunosuppression par les CSM sur les lymphocytes.⁵⁹⁰ La propriété immunosuppressive n'est qu'une facette d'immunomodulation par les CSM. Cependant, les études récentes soulignent que les CSM peuvent favoriser les réponses immunitaires en présence de faibles niveaux d'inflammation,⁵⁹¹ indiquant la plasticité des fonctions immunorégulatrices des CSM. Lorsque le niveau d'inflammation est faible ou lorsque l'expression des facteurs immunosuppresseurs mentionnés ci-dessus est inhibée, les CSM peuvent considérablement promouvoir les réponses immunitaires (Figure 31). Ce changement conceptuel a des implications significatives pour l'application clinique appropriée des CSM.

Figure 31. – Interaction entre CSM et cellules immunes au cours de la réparation cellulaire.

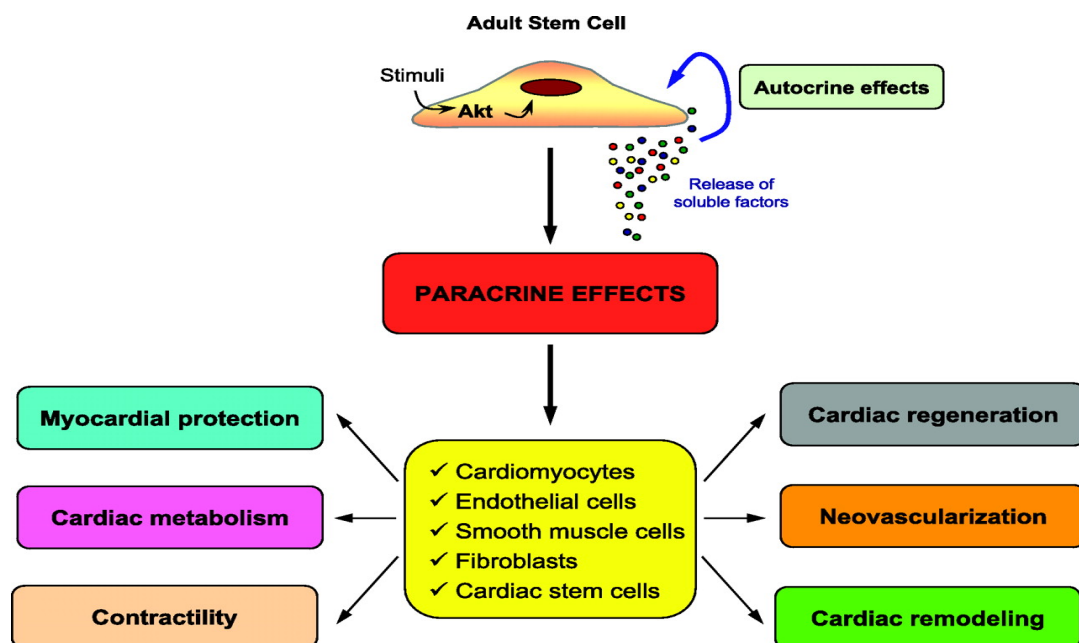


Une fois que la lésion tissulaire se produit, les CSM sont mobilisés. De puissants signaux d'inflammation induisent une régulation à la baisse des réponses immunitaires par les CSM, un processus médié par des niveaux élevés de chémokines et facteurs immuns. En outre, les facteurs de croissance sont également libérés par les CSM, qui favorisent la réparation tissulaire par les cellules endothéliales et les CSM. En cas d'inflammation chronique, des cytokines inflammatoires insuffisantes pourraient cependant stimuler les CSM pour produire des chémokines et facteurs trophiques en l'absence de facteurs inhibiteurs immunitaires suffisants. En tant que tel, l'inflammation chronique peut conduire les CSM à retarder la récupération de la maladie, ou même aggraver l'évolution de la maladie.

7.4. Propriétés immunomodulatrices des CSM

L'une des premières études cliniques de CSM concerne les patients atteints de GvHD.⁵⁹² Cependant, les effets thérapeutiques ne sont pas toujours atteints. Dans certains essais cliniques, les CSM étaient inefficaces chez les patients atteints de GvHD.⁵⁹² Dans d'autres cas, les CSM ont accéléré le rejet de greffe, même en co-administration avec la cyclosporine A (CsA).⁵⁹³ La question cruciale est pourquoi la fonction immunosuppressive des CSM n'est pas toujours atteinte. Dans certaines conditions, en effet, la fonction d'immunosuppression de CSM ne se produit pas, au contraire, une réponse immunitaire amplifiée est observée. Par exemple, dans des conditions inflammatoires obtenues par dose élevée de concanavaleine A (ConA) ou par cytokines pro-inflammatoires, les CSM ont exercé un important effet immunosuppresseur. Cependant, avec une faible dose de ConA ou l'ajout d'IL-10, l'effet suppressif de CSM était annulé.⁵⁹⁴ Cela peut également se produire lorsque les niveaux de cytokines inflammatoires sont insuffisants pour stimuler les CSM à sécréter le NO, malgré la production de chémokines.⁵⁹⁵ D'autres études ont également démontré qu'une inflammation importante est nécessaire au déclenchement de la fonction immunosuppressive de CSM *in vivo*. Une protection diminuée contre le GvHD a été observée si les CSM étaient administrées le jour même du transfert de la moelle osseuse.⁵⁹⁶ Un effet thérapeutique efficace peut être réalisé lorsque les CSM ont été perfusées après développement de la maladie. Par conséquent, l'état de l'inflammation détermine la tendance immunomodulatrice des CSM. Notamment, avec une faible dose d'IFN- γ , la capacité de présentation de l'antigène pourrait être stimulée dans les CSM. En fait, les CSM stimulées par l'IFN- γ peuvent être considérées comme des cellules présentatrices d'antigènes dans certaines conditions.⁵⁹⁷ Les CSM stimulées par l'IFN- γ peuvent induire la sécrétion de lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ Ag spécifiques *in vivo*, et rendre ainsi les CSM candidates pour le traitement de cancer ou maladies infectieuses.⁵⁹⁸ Ainsi, à l'exception des rôles immunosuppresseurs, les CSM pourraient également stimuler la réponse immunitaire.

Figure 32. – Résumé des effets paracrines sur le signalment des CS adultes



Tiré de Gnecci et al, *Circ Res* 2008 Novembre 21

7.5. Greffe de CSM dans les sites d'inflammation tissulaire

Il a été rapporté que les facteurs trophiques produits par les CSM peuvent être utilisés pour mettre en œuvre de nouveaux traitements dans les maladies inflammatoires. Au sein de tissus endommagés, les CSM greffées peuvent exercer une action concertée, orchestrant avec les cellules immunitaires, les cellules stromales, les cellules endothéliales et les cellules progénitrices une action de promotion sur la réparation tissulaire.⁵⁴¹ Ainsi, la prise de greffe réussie de CSM au sein de niches inflammatoires et des sites d'atteinte tissulaire sont des considérations importantes lors de l'analyse des effets bénéfiques des CSM. Contrairement au phénomène bien caractérisé du recrutement des leucocytes, celui des CSM, *de novo* ou par délivrance de CSM exogènes, est encore incertain. Cependant, les CSM exprimant le sialyl Lewis (x), une molécule capable de favoriser la migration des leucocytes dans le tissu inflammé, présentent une capacité plus élevée de recrutement dans le tissu endommagé.⁵⁹⁹ Il est important de noter que le sang périphérique de souris présentant une atteinte vasculaire contient plus de CSM que celui des souris témoins. Cette constatation est probablement due à des niveaux accrus de facteur de

stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF) à la suite de l'apparition des lésions.⁶⁰⁰ En plus de la mobilisation des CSM de l'hôte, de plus en plus d'études ont porté sur l'évaluation de la capacité de prise de greffe et les effets bénéfiques des CSM exogènes délivrées dans des modèles animaux, y compris les maladies inflammatoires de l'intestin (IBD), EAE, l'arthrite induite par le collagène, le diabète de type I, ainsi que dans les essais cliniques chez des patients souffrant de GvHD, d'infarctus du myocarde aigu, de sclérose en plaques et de la maladie de Crohn.

L'efficacité thérapeutique peut être influencée par les conditions de culture car les CSM exogènes administrées doivent toujours être multipliées et passées *in vitro*. Un nombre de passages extensifs des CSM affecte l'activation des CSM et la protection en cas d'ischémie/ reperfusion.

Ce phénomène serait attribué à une diminution de la synthèse de facteurs de croissance par les CSM lors de passages extensifs. En effet, les CSM peuvent acquérir ou perdre certains récepteurs de surface pendant la culture, ce qui pourrait affecter leur capacité de chimiotactisme.⁶⁰¹ De plus, par rapport aux CSM fraîchement isolées, les cellules maintenues en culture ont une capacité de migration réduite.⁶⁰² À cet égard, le CXCR4, un récepteur du SDF-1 présent à des niveaux élevés dans la moelle osseuse et les tissus ischémiques, disparaît toujours de la surface après culture des CSM.

Cependant des conditions de culture hypoxique peuvent favoriser la prise de greffe des CSM par le renforcement de l'expression CXCR4 et CX3CR1.⁶⁰³ En outre, lorsque les CSM cultivées sont traitées avec différentes cytokines, le niveau de CXCR4 peut aussi être restauré.

Cet effet contribue à promouvoir la prise de greffe de moelle osseuse des CSM chez les souris irradiés NOD/SCID et permet une récupération hématologique plus aisée de CSM

transplantées.⁶⁰⁴ En outre, le TNF- α , le TGF- β et de l'IL-1 β peuvent stimuler la sécrétion de métalloprotéinases de la matrice à des niveaux élevés par les CSM, ce qui peut conférer à ces cellules la capacité de migrer à travers la matrice extracellulaire en réponse à des chémokines.⁶⁰⁵

Par ailleurs, dans une étude *in vivo*, le prétraitement des CSM avec le TNF- α / ou un cocktail de cytokines conduit à une efficacité accrue de la prise de greffe des CSM et une amélioration de la pyélonéphrite aiguë.⁶⁰⁶ Ainsi, de nombreux facteurs peuvent influencer la mobilisation et la prise

de greffe des CSM. Par conséquent, il est important d'évaluer avec précision et de maîtriser les propriétés des CSM cultivées pour application clinique. Autrement, les microenvironnements

physiologiques qu'ils rencontrent peuvent modifier leurs comportements de manière sous

optimale. D'autres facteurs, tels que le site d'injection, le moment et le nombre de cellules

administrées, peuvent aussi influencer sur la prise de greffe et les effets thérapeutiques des CSM qui

sont fonction de l'état de la maladie spécifique. Les différentes voies d'injection qui ont été essayées, y compris par voie intraveineuse, intra-péritonéale, intra-artérielle et *in situ*, affecte chacune l'efficacité du recrutement des CSM ou de la localisation des organes cibles.⁶⁰⁷ Parmi eux, l'administration intraveineuse est pratique et efficace dans le traitement de certains types de maladies, mais une meilleure efficacité de prise de greffe peut parfois être obtenue par injections *in situ* intra-artérielles, comme dans l'infarctus du myocarde, la transplantation du rein ou les lésions cérébrales.⁶⁰⁸⁻⁶¹⁰ L'administration des CSM *in situ*, bien que parfois très efficace dans la prise de greffe et la thérapie cellulaire, est cliniquement moins applicable car invasive et introduit des cellules dans un microenvironnement hostile à leur survie.⁶¹¹ Dans une autre étude concernant l'ataxie spinocérébelleuse, l'injection intraveineuse était plus efficace dans la promotion de la survie des cellules de Purkinje du cervelet et de la prise de greffe des CSM comparé à l'injection intra-crânienne.⁶¹² La voie d'injection intra-péritonéale a été rarement utilisée, mais certaines études récentes utilisées pour traiter la dystrophie musculaire et dans un modèle de souris IBD, ont montré une prise de greffe efficace avec effets thérapeutiques.⁶¹³ Lorsque les CSM sont utilisés pour traiter des maladies distinctes, leurs voies d'administration devraient être bien choisies. Une autre influence sur l'efficacité des CSM est le stade d'avancement de la maladie: la livraison des CSM à un stade précoce après une ischémie ou une EAE a montré des taux de prise de greffe améliorés ainsi que des effets thérapeutiques, alors administrées au stade de la rechute de l'EAE, leurs effets bénéfiques sont réduits.^{611, 613} Enfin, la dose d'administration des CSM doit également être considérée, car l'administration d'une quantité plus importante de CSM ne résulte pas en un meilleur effet thérapeutique dans un modèle murin de lésion cérébrale.⁵⁸² Pris ensemble, ces études démontrent clairement que lorsque des thérapies à base CSM sont utilisées dans des expériences précliniques ou des essais cliniques, la source des CSM, la dose, la voie et le moment d'administration doivent tous être soigneusement examinés.

Tableau 7. – Résumé des facteurs de croissance impliqués dans la réparation tissulaire des CSM

Growth factors	Roles in MSC-mediated tissue repair
EGF	Wound healing, ¹¹⁴ tissue regeneration, ^{115,116} neurogenesis ¹¹⁷
PDGF	Tissue repair ¹¹⁸
FGF	Tissue repair, ¹¹⁴ intrinsic stem cell survival and regeneration ¹¹⁹
TGF- β	Wound healing ^{120,121}
VEGF	Angiogenesis, wound healing ^{121–123}
HGF	Vasculogenesis, ¹²⁴ intrinsic neural cell regeneration ³⁴
IGF-1	Wound healing, ¹¹⁴ neurogenesis ¹²⁵
KGF	Wound healing ¹²⁶
Ang-1	Angiogenesis, tissue repair ¹²³
EPO	Angiogenesis ¹²⁷
GDNF	Neuroprotective effect ¹²⁸
SDF-1	Neuroprotective effect, ¹²⁹ wound healing ^{130,131}
IL-8	Wound healing ¹¹⁴

Abbreviations: Ang-1, angiopoietin-1; EGF, epidermal growth factor; EPO, erythropoietin; FGF, fibroblast growth factor; GDNF, glial cell line-derived neurotrophic factor; HGF, hepatocyte growth factor; IGF, insulin growth factor-1; IL-8, interleukin-8; KGF, keratinocyte growth factor; MSC, mesenchymal stem cell; PDGF, platelet-derived growth factor; SDF-1, stem cell-derived factor-1; TGF- β , transforming growth factor β , VEGF, vascular endothelial growth factor

Chapitre 8 – Manuscrit #3

8. Avant-propos au Manuscrit #3

Tel que décrit, l'action paracrine des CSM d'origine adipeuse permet une modulation des mécanismes déclenchés suite à l'apparition de la maladie coronarienne du greffon. Ce mode de traitement innovant permettrait de réduire l'impact de la MCG après transplantation cardiaque. Dans ce troisième manuscrit, le candidat au doctorat en sciences biomédicales propose au lecteur d'étudier les effets potentiels de la thérapie cellulaire sur la préservation du greffon cardiaque et son influence sur l'apparition de la MCG. Dans ce travail de recherche fondamentale, le candidat cerne donc principalement les bénéfices potentiels induits par les actions paracrines des ASCs, et ce, grâce à un modèle animal de transplantation cardiaque chez le murin. L'effet paracrine de la thérapie cellulaire et leur rôle potentiel dans l'application de nouvelles voies de traitement sont analysés en observant à 14 jours les effets de l'application directe sur le ventricule droit des ASCs sous forme sphéroïdes. Ce manuscrit a été soumis pour publication dans le « *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* »

**Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells cultured as spheroids improve
cardiac allograft vasculopathy development in a heart transplantation
model**

Anthony Nguyen MD, MSc^{a,c}, Celia Sid-Otmane MSc^{b,c}, Martin G. Sirois PhD^c, Marie-
Elaine Clavet^c, Louis-P. Perrault MD, PhD^{a,c}, and Hung-Q. Ly MD, MSc^{b,c}

^a Department of Cardiovascular Surgery, Montreal Heart Institute and Université de Montréal,
Montreal, Quebec, Canada

^b Department of Cardiology, Montreal Heart Institute and Université de Montréal, Montreal,
Quebec, Canada

^c Research center, Montreal Heart Institute and Université de Montréal, Montreal, Quebec,
Canada

Word Count:

Abstract Word Count: 257

* Corresponding author: Dr. Hung-Quoc Ly, Department of Cardiology, Montreal Heart
Institute, 5000 Belanger Street, Montreal, Quebec H1T 1C8, Canada. Tel.: 514-376-3330
(Ext. 2438). Fax: 514-593-6299. E-mail: qh.ly@umontreal.ca

Abstract

BACKGROUND: Cardiac transplantation remains the definitive therapy for eligible patients with end-stage heart failure. Beyond the first-year post-transplant period, cardiac allograft vasculopathy (CAV) represents one of the major causes of death, which implies immunologic and non-immunologic factors. Adipose tissue is a rich and very convenient source of cells for regenerative medicine therapeutic approaches. Adipose-derived stromal cell (ASC) treatment is a potentially effective cell therapy for cardiac disease. We investigated the effects of epicardial delivery of ASC matrix in a rat model of heterotopic abdominal heart transplantation (HAHT) associated with CAV.

METHODS: Hearts of wild-type Fischer 344 rats were harvested and transplanted heterotopically into the abdomen of recipient wild-type Lewis rats (n=20). After HAHT, ASCs cultured as 3D spheroids were injected on epicardial patch into transplanted hearts of animals in the experimental group (n=10), whereas controls received normal saline (NS).

RESULTS: Fourteen days after injection, confocal immunofluorescence antibodies CD90⁺ identified ASCs into the allograft myocardium but also in lower proportion in the host native heart. An improvement in ventricular remodeling and reduction in cardiac fibrosis were observed by immuno-histochemical analysis and confirmed by cardiac magnetic resonance imaging in the ASC group. The 3D spheroids ASCs showed enhanced anti-inflammatory properties compared to monolayer cultured ASCs. This was confirmed by the observations that VEGF, IL-6, IL-8 and MCP-1 levels were markedly elevated in 3D spheroids ASCs compared to monolayer ASCs.

CONCLUSIONS: We showed favorable ventricular remodeling, reduced cardiac fibrosis, and decreased cardiomyocyte apoptosis of the transplanted heart in a rat model of HAHT after epicardial delivery of spheroids ASCs. Our data suggest that 3D spheroids ASCs improved anti-inflammatory properties compared to monolayer cultured ASCs.

Keywords: Cardiac allograft vasculopathy – other ▪ Heart failure ▪ Heterotopic heart transplant model

INTRODUCTION

Transplantation remains the definitive therapy for end-stage heart disease despite recent advances in mechanical support techniques.²² A considerable improvement in the prevention and treatment of acute rejection has been achieved over the past 20 years.²⁷ A better knowledge of transplant immunology combined with an increasingly effective and targeted use of immunosuppressive treatments has improved short-term survival in transplant patients. However, improvement in the long-term success of organ transplants has been limited, mainly compromised by the occurrence of cardiac allograft vasculopathy (CAV). The factors determining the occurrence of CAV are multiple, involving immunological and non-immunological mechanisms. Graft vascular disease remains one of the determining factors in the progression of heart transplants that can lead to chronic allograft dysfunction. This remains one of the main causes of graft loss after one year following heart transplant. Thus, the register of the International Society of Cardiac and Lung Transplantation (ISHLT) reports the survival rates of heart transplants at five and ten years to be 60 and 45%, respectively.²⁸ This register also indicates that chronic vascular lesions are evidenced by angiography in 8% of survivors at one year, 32% at five years and 43% at eight years. Furthermore, recent work has suggested that the impact of graft vascular disease would be underestimated in kidney or liver transplant^{29,30}. Nowadays, orthotopic heart transplantation remains the only curative treatment for irreversible post-infarct damage. However, the shortage of cardiac grafts has limited access to transplant and the incidence of end-stage heart failure (HF) is still increasing across developed countries due to aging population.²⁷

Bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) are multipotent stromal cells whose cardiac tissue repair properties have been studied for many years.³¹ In preclinical³² and clinical studies^{14,33}, MSCs demonstrated improvement in left ventricular ejection fraction (LVEF), ventricular remodeling and reduction of myocardial scar size. Recent reports have

demonstrated promising results with new adipose-derived stem cells (ASCs) in cardiac regenerative medicine due to their unique anti-apoptotic, anti-inflammatory and pro-angiogenic properties.^{34, 35} ASCs appear to be an interesting alternative to BM-MSCs in cell therapy since they are harvested by lipoaspirate sampling in greater quantity and in a less invasive fashion compared to BM-MSCs. Moreover, adipose tissue contains 500-fold more MSCs than adult bone marrow.^{34, 35}

In animal model studies³⁶, ASCs have demonstrated a reduction in myocardial scar size by paracrine effect, notably by the secretion of soluble factors directly affecting cardiomyogenesis, neovascularization and cardiac regeneration.¹² The ASCs have also demonstrated a superior beneficial effect in improving cardiac function and decreasing myocardial scar compared to MSCs.^{37, 38} Furthermore, recent studies have shown that 3D cultures of MSCs increase their anti-inflammatory and immunomodulatory potential compared to monolayer cultures.^{39, 40} However, few studies have investigated the therapeutic role of spheroid ASCs in CAV.

Heterotopic abdominal heart transplantation (HAHT) model in rats has been widely used to explore the physiological and structural modifications involved in left ventricle (LV) unloading. This model was first described by Abbot et al⁴¹ in 1964 and improved by Ono and Lindsey⁴² in 1969, which is nowadays the classic model of ventricular heart discharge in the rat. The technique has been well described in the literature⁴³. HAHT is an inexpensive experimental model frequently used to study hemodynamic and histological changes in ischemia/reperfusion injury⁴⁴ (isogenic strain of rats) but also in immunological research on acute^{45, 46} or chronic rejection⁴⁷ (allogeneic rats).

In this study, we used an allogenic HAHT model between two histo-incompatible strains of rats, Fischer 344 (FIS) and Lewis (LEW), in order to study the effect of ASCs on chronic allograft rejection. We hypothesized that the local delivery of spheroidal ASCs at the surface

of the grafted heart would be associated with a prevention in the development of CAV, characterized by a decreased myocardial fibrosis, favorable ventricular remodeling, and reduced inflammation and apoptosis.

MATERIALS AND METHODS

Animal Subjects and Experimental Design

Eight weeks old male rats (200-250g) from two inbred strains, FIS and LEW, were purchased from the Charles River Laboratory (Saint Constant, QC, Canada). Before surgery, rats were randomly divided into two experimental groups: the control group treated with normal saline (NS) injection (NS; n=10) or the ASCs group treated with ASCs spheroids (ASC; n=10). We used the rat model of HAHT FIS-to-LEW, which consisted in heterotopic grafting of hearts from FIS rats to LEW recipients with a minor histocompatibility complex (MHS) matched to allow the development of CAV without any immunosuppressive therapy. All experiments were conducted according to the Canadian Legislation for the Treatment of Animals and this study was approved by the Institutional Animal Use and Care Committee of the Université de Montréal, Montreal, QC, Canada (Animal Use Protocol #1699). Rats had access to food and water *ad libitum*.

Heterotopic Abdominal Heart Transplantation

All experiments were performed under general anesthesia (isoflurane 3-5%). After heparin injection, the donor heart was rapidly harvested and flushed with cold physiologic saline solution and immediately transplanted to the recipient in infrarenal position. Prior to transplantation, donor caval veins and pulmonary veins were ligated. Briefly, the implantation of the cardiac graft was performed intra-abdominally between the ascending aorta of the donor and the descending aorta of the recipient, and then between the pulmonary artery of the donor and the inferior vena cava of the recipient. No immunosuppressive treatment was used. The recipient aortic clamping time ranged from 50-60 minutes. This constitutes a right working-heart model with complete unloading of the left ventricle.

Cell cultures

Human ASCs were purchased from Life Technologies (StemPro human ASCs, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) and cultured in Mesenpro RS medium supplemented with 1000 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 2 mM glutamine. Once confluence reached, cells were detached from flasks using trypsin ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) to produce spheroid bodies through the hanging drop method. Briefly, drops of 35µl of cell suspension were plated on the lid of a petri dish and inverted on the dish with PBS inside to produce spheroids containing 2×10^6 cells/spheroid. After 3 days in the incubator (37°C; 5% CO₂), spheroids were recovered to transplant on the myocardium or used for *in vitro* experiments.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

TSG-6 levels were quantified through ELISA. Briefly, a 96-well Costar plate was coated with TSG-6 monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnologies, California, USA) at a concentration of 10 µg/ml overnight at 4°C. After washing the plate 4 times with PBS 1X Tween-20 0.1%, wells were blocked with PBS containing BSA 0.5% for 45 minutes. At the end of the incubation, the plate was washed again before putting standards (recombinant human TSG-6) and samples in the appropriate wells for 2h30 incubation. After washing off the plate, another 2h incubation with anti-TSG-6 biotin at 0.5 µg/ml followed by streptavidin incubation for 30 minutes. HRP substrate was introduced after a final washing step and the reaction was stopped after 20 minutes with stop solution (sulphuric acid 2N). The optical density of the plate was read at 450 nm right after.

Luminex[®] Assay

The assays were performed following the manufacturer's protocol . Briefly, microparticles and samples or standards were put in the appropriate wells of 96 well-filtered plate and incubated

for 2 hours with agitation. Washing step followed and biotin antibody was added for 1h before incubating with streptavidin for 30 minutes. The washing solution was added at the end after washing off streptavidin and the plate was read in a Bio-plex 200 (Bio-Rad) to quantify VEGF, MCP-1, IL-6 and IL-8.

Infusion of Adipose-derived Stem Cells

Normal saline (NS group) or ten ASCs spheroids (2×10^6 cells/spheroid) suspended in 3 ml of NS (ASC group) were placed on the surface of the beating right ventricle (RV) of the transplanted heart and covered with an oxidized regenerated cellulose matrix to maintain the NS or ASCs in direct contact with the myocardium.

Animal Monitoring and Sacrifice

The transplanted hearts were monitored by daily manual palpation. After 14 days, all rats were sacrificed by aortic transection. The transplanted and the native hearts were rapidly dissected, removed and irrigated with cold physiological saline before preparation for immunohistochemistry analysis.

Distribution of transplanted ASCs

Immunohistofluorescence

The subcellular localization of CD90⁺ was determined by immunohistofluorescence on 5 µm sectional slices of the native and transplanted ventricles from LEW rats. The sections were incubated overnight at 4 °C with anti-CD90 mouse antibody (1: 500; Abcam Inc., Toronto, ON, Canada). The second antibody used was a goat anti-mouse antibody IgG (1: 800; Abcam Inc., Toronto, ON, Canada). Nonspecific staining was achieved by adding the secondary antibody alone. immunohistofluorescence was performed using a confocal fluorescence microscope (LSM 510 Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) as z-stacks consisting of serial 2-D images acquired at 250 nm intervals. Image stacks were digitally deconvolved (Huygens Professional software, ScientificVolume Imaging, Hilversum, Netherlands) to reduce out-of-focus light and maximum projections were prepared from the deconvolved z-stacks.

Cardiac fibrosis and ventricular remodeling

Histology and Immunohistochemistry (IHC)

Fourteen (14) days post-procedures the animals were sacrificed under general anesthesia (Isoflurane 3-5%, 20cc saline solution followed by 20cc formalin perfusion by pressure gradient). The native and orthotopic hearts were then fixed in 10% formalin PBS-buffered solution, embedded in paraffin and sectioned sagittally (6 µm-thick) at the ASCs injection site (orthotopic hearts) or corresponding site (native hearts). The sections were stained with Masson's trichrome reagent to assess the degree of myocardial fibrosis, which was evaluated by calculating the amount of collagen content per region. In addition, morphometric analyses were performed to evaluate the LV myocardial thickness and the coronary intima hyperplasia.

To determine whether transplanted human ASCs persisted at the injection site, we performed an immunohistochemistry (IHC) study using monoclonal mouse anti-human

mitochondrial antibody. A citrate-antigen retrieval approach was used to unmask protein epitopes on tissues. The endogenous peroxidase activity was quenched in a solution of 3% hydrogen peroxide and non-specific binding of primary antibodies was prevented by preincubating the tissues with 10% serum from the species used to raise the secondary antibodies. Corresponding heart tissue sections were then exposed to monoclonal mouse anti-human mitochondrial antibody (1: 1000, Abcam Inc., ON, Canada), overnight at 4°C followed by incubation with biotinylated goat anti-mouse (1:400) (Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA). The peroxidase labeling was achieved using an avidin/biotin complex (ABC kit; Vector), and antibody visualization was established after an exposure to 3,3-diaminobenzidine solution (DAB kit; Vector). Sections were counterstained by Mayer's hematoxylin and then mounted with a permount solution (Fisher Scientific, Hampton NH, USA). This approach was repeated for the following IHC experiments to define the remodeling process of the hearts (e.g. apoptosis, angiogenesis and acute/chronical inflammation). Apoptosis was revealed by quantification of cleaved Caspase-3 (1:100, Cell signaling, MA, USA); angiogenesis was assessed by endothelial cells staining and by measuring PECAM-1 (CD31) expression (1:200, Novus Biologicals, CO, USA); acute/chronical inflammation was measured by neutrophil-specific detection of myeloperoxidase (MPO) expression (1:200, Thermo Fisher Scientific ON, Canada), and macrophage-specific detection of mannose-receptor (CD206) expression (1:500, Abcam Inc., ON, Canada).

Images were collected using a brightfield microscope (BX45 by Olympus, Tokyo, Japan) and acquired with Image Pro Premier software (MediaCybernetics, MD). All IHC results (except for PECAM-1 staining) were expressed as a percentage (%) of occupancy of the protein compared with the total area of the cardiac sections analyzed (%) of 5 random fields. Analysis of angiogenic process was performed by the detection and quantification of PECAM-1 protein

in the region of viable (non-necrotic) cardiac region and compared to the total area of the cardiac sections analyzed.

Magnetic resonance imaging (MRI)

Fourteen days after HAHT, cardiac MRI was performed in six animals (n = 6) FIS-to-LEW rat (n = 3 injected with saline, n = 3 injected with ASC-MSCs) with a 7 Tesla (Agilent, Santa Clara, CA, USA) MRI scanner, with a 30 cm bore and a gradient insert with 600mT/m maximal slope. Rat noses were placed into a cylindrical tube for anesthesia that limited head movement. Anesthesia was maintained with 2-3% isoflurane at 2 L/min in pure O₂. Rats were maintained at 37 °C and rectal temperature and respiration rate were recorded. The electrocardiographic gating was optimized with two cardiogram electrodes attached to the animal's abdomen with respiratory motion and body temperature monitors (Small Animal Instruments, Stony Brook, NY, USA).

Statistical analysis

Results of morphometric study collected prospectively in a database were reported as means \pm SD for continuous variables and as absolute numbers or percentages for categorical variables. Comparisons between treatments groups were performed using ANOVA for continuous variables, and Chi-square or Fisher's exact test for categorical variable. $P < 0.05$ values were deemed to be statistically significant. Statistical analyses were conducted with the SPSS computer software package (version 25.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS

Spheroid bodies (SBs) secretome is richer in immunomodulatory and angiogenic factors compared to monolayer ASCs (MLs)

In vitro experiments from this study proved that, whether cultured as 2D or 3D, ASCs secrete different immune related factors at different levels (Figure 1). The level of secreted TSG-6, an anti-inflammatory factor, was higher for SBs compared to ML in basic conditions, without cell stress but also in response to the inflammatory stimulus $\text{TNF}\alpha$. The 24h measure demonstrated the augmented secretion of TSG-6 in basic conditions and in response to $\text{TNF}\alpha$. However, for a longer period after 72h of stimulation, ML ASCs were capable of reaching the same amount of secreted TSG-6 in response to $\text{TNF}\alpha$. For the immunomodulator IL-6, SBs produced higher amounts in presence or not of inflammatory stimulus ($\text{TNF}\alpha$) but IL-8 is potently secreted by $\text{TNF}\alpha$ stimulated ML than by SBs. To evaluate the angiogenic potential, VEGF was quantified and SBs were also more efficient to secrete this factor than ML. MCP-1 has also been associated with pro-angiogenic properties and SBs were able to secrete this chemokine with a bigger potential than ML but, as for IL-8, in response to inflammatory stimulus, ML responded with higher secreted levels of MCP-1 than SBs. In summary, SBs showed higher levels of TSG-6, VEGF and IL-6 whether stimulated or not.

Distribution of transplanted ASCs

After 14 days post-injection of ASCs, the presence of CD90^+ labelling in confocal immunofluorescence within the myocardium indicated the penetration of spheroidal ASCs from the surface to the transplanted heart. Interestingly, confocal immunofluorescence antibodies CD90^+ identified ASCs into the myocardial allograft but also in the host heart where there was no CAV injury (Figure 2). Those cells were present near epicardial arteries but in lower proportion. Those findings correlated with results obtained with mouse anti-human mitochondrial monoclonal antibodies analysis. Indeed, the presence of labeled cells by human

anti-mitochondrial antibodies was 7-fold higher in the ASC group than in the control group (Figure 3).

ASCs infusion reduced cardiac fibrosis and improved ventricular remodeling in transplanted hearts

In all transplanted hearts, Masson's trichrome staining performed 14 days after HAHT showed moderate fibrosis in the ASCs group and in the control group. The sections of the native hearts transplanted at 14 days after infusion of ASCs or NS are shown in Figure 4. Quantitative analysis of the collagen volume fraction demonstrated a significant reduction of fibrosis in the ASCs treated group compared to the NS-treated group (HAHT / ASCs $31.2 \pm 1.2\%$ vs HAHT / NS $21.6 \pm 1.7\%$, $p < 0.05$). The left ventricle wall was significantly thicker in the ASCs group than in the control group, indicating a favorable ventricular remodeling in the ASCs group (HAHT / ASCs $2.4 \pm 0.2\text{mm}$ vs HAHT / NS $1.7 \pm 0.7\text{mm}$, $p < 0.05$).

Infusion of ASCs significantly reduced inflammation and apoptosis in transplanted hearts

ASCs spheroids decrease neutrophilic activity, as demonstrated by the secreted myeloperoxidase (MPO) assay (Figure 5). Our results showed that the MPO positive cell distribution was less important in the ASCs group compared to the control group. In the group of transplanted hearts, the density of MPO⁺ cells was lower than in the NS-treated group ($0.11 \pm 0.04\%$ vs $0.24 \pm 0.03\%$ HAHT / NS vs ASCs, $p < 0.05$).

The number of apoptotic cells (Caspase 3⁺ cells) were stained brown. Our data showed a decreased percentage of apoptotic cells in the ASCs-treated group compared to the NS-treated group (0.01% HAHT / ASCs vs 1.1% HAHT / NS, $p < 0.01$), suggesting that ASCs spheroids transfer could decrease apoptosis induced by chronic rejection following HAHT.

Sacrifices on day 14 showed obliterative lesions in coronary arteries in all transplanted hearts (Figure 6). Those coronary lesions were characterized by extensive intimal proliferation leading

to coronary artery occlusion, associated to massive perivascular adventitial inflammatory cell infiltrate and lymphocyte cell infiltrate into the myocardium.

ASCs infusion did not improve significantly macrophage activation nor angiogenesis in transplanted hearts

The microvessel density (angiogenesis, CD31⁺ cells) (Figure 7A-D) and the macrophage cell densities (CD206⁺ cells) (Figure 7E-H) showed a trend to increase in the group receiving ASCs compared with NS but no statistically significant ($p=0.7$)

The number of capillaries (CD31⁺ cells) were stained brown (Figure 7A-D). In transplanted hearts receiving ASC infusion, the microvessel density was slightly higher than that of the NS group but not significantly (HAHT/ ASCs 0.59 ± 0.31 vs HAHT/ NS $0.43 \pm 0.27\%$, $p=0.8$) (Figure 7D).

A trend towards increased macrophage density (CD206⁺ cells stained brown) compared to NS control group was also noted 14 days after ASC infusion but not significantly. (HAHT/ ASCs 0.55 ± 0.16 vs HAHT/ NS $0.42 \pm 0.74\%$, $p=0.75$) (Figure 7H).

DISCUSSION

Despite recent advances in the field of circulatory assistance and immunosuppression, chronic rejection remains a major cause of mortality during first year after cardiac transplantation^{22, 41}. However, the effect of spheroid ASCs in solid organ transplantation models has not been reported so far. In this study, we investigated the therapeutic effects of spheroid ASCs infusion on CAV development in a rat model of HAHT. Our results showed that the ASC spheroids infusion resulted in a significant decrease in the fibrotic area and an increased thickness of the left ventricle in systole, at 14 days between the two groups. In ASCs transplanted group, we found a significant decrease in neutrophilic activity as well as apoptosis with MPO and Caspase 3 protein expression. Our report suggests a cardioprotective effect of ASCs on transplanted heart. In contrast, macrophage activation and angiogenesis remained unchanged; there was no significant change between the two groups.

In recent studies, ASCs have demonstrated down-regulation properties on pro-apoptosis genes as well as improved survival genes, which may explain the decrease in the number of apoptotic cells in the transplanted heart.⁴⁸ Recent reports demonstrated that ASCs are associated to an improvement in LVEF, an increase in neovascularization, and a decrease in fibrosis in a model of myocardial infarction in rats.³⁸ Indeed, when infused in injured inflammatory tissue, ASCs can modulate inflammatory response with the secretion of anti-inflammatory cytokines (IL-6, IL-8) as well as anti-apoptotic and anti-fibrotic growth factors (MCP-1). Then, those mediators induce a local anti-inflammatory, pro-regenerative cellular state. In addition, ASCs in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) and platelet-derived growth factor (PDGF) would increase microvascular density and thus reduce the area of fibrosis, which we observed in the transplanted hearts 14 days after infusion. The increase in pro-angiogenic molecules secretion like VEGF, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and immunomodulating molecules secretion (IL-6 and IL-8) suggest that these 3D spheroid ASCs could be more effective than

monolayer adherent cell cultures, inducing neovascularization, but also reducing the inflammatory response. These results suggest also that ASCs spheroids secrete more effective pro-angiogenic factors compared to 2D culture.^{14, 34-36, 39, 49}

In recent studies, it has been shown that MSCs are capable of transmigration to inflammatory tissues and partially integrate within the endothelium³⁸. Moreover, the participation of MSCs is limited by their low delivery rate after injection, varying from less than 1% to 5% depending on the studies, these cells remaining blocked by the pulmonary filter. Thus, our hypothesis was that the closest delivery of the target organ would allow a better diffusion of ASCs and therefore a better therapeutic effect of these cells on the transplanted heart. Our cell-tracking experiment showed that CD90⁺ labeled ASCs were present in both the transplanted heart but also in a smaller amount in the native heart near small epicardial arteries, signaling transmigration of ASCs. These observations were corroborated by the second labeling with IgG anti-human mitochondria.

The immunomodulatory properties of ASCs are well known, including the promotion of T-cell induction, which may be the cause of CAV depression. It would thus be interesting to investigate whether the decrease in T-cell infiltration by ASCs could contribute to the reduction of lymphocyte attack on the arteriole media.

Three-dimensional culture of MSCs is an efficient method known to regulate their healing properties. Culturing cells as 3D structures closely reproduce the *in vivo* microenvironment through the cell-to-cell contact and cell-to-matrix contact. Enhanced immunomodulatory functions have been related to aggregating MSCs, showing higher amounts of secreted PGE2 that could induce a switch from pro-inflammatory macrophages to an anti-inflammatory phenotype⁴⁹. Given the similarities between MSCs and ASCs, aggregating ASCs is also beneficial to their healing functions. The secretome of ASCs contains multiple factors explaining the pleiotropic effects of these cells such as anti-apoptotic, angiogenic and anti-

inflammatory. Bhang et al characterized the secretome of 3D cultured ASCs and reported higher VEGF, HGF and FGF-2 than the conventional monolayer culture⁵⁰. Moreover, they described a pro-angiogenic effect of the conditioned media of these 3D structures in a hind-limb ischemia-reperfusion mice model. Our in vitro data lead to the same conclusion as SBs showed richer secretome in angiogenic factors with increased levels of VEGF and MCP-1. The anti-inflammatory effect of ASCs is partly mediated by a strong paracrine factor TNF α induced protein 6 (TSG-6)⁵¹. This study showed an enhanced secretion of TSG-6 by SBs in standard and stimulated media for 24 hours. However, stimulation with TNF α for 72 hours triggered the same level of TSG-6 secretion between 2D and 3D structures. This could be explained by the impact of TNF α on ASCs proliferation cultured as monolayers⁵², whereas aggregating is thought to inhibit cell proliferation³⁹. Mediators participating to the immunoregulatory impact of ASCs are secreted in a responsive rather than a constitutive pattern. The microenvironment induces a different response depending on paracrine, endocrine and neural signals⁵³. Herein, we tested responsiveness to TNF α but other cells stressors such as hypoxia or oxidative stress will be experimented to provide further characterization of the secretome.

LIMITATIONS

A major limitation of our HAHT model is the virtual complete LV unloading leading to myocardial atrophy and progressive thrombosis of the LV of the donor.

Many modifications of the model originally described by Ono and Lindsey in 1969⁴² have been published to allow partial discharge of the LV. However, the effects induced by the left ventricular discharge remain controversial whether it is on the apoptosis of the myocardium⁵⁴,

the metabolic modifications via the transcription factors⁵⁵ or the expression of mitochondrial proteins.⁵⁶

This non-volume loaded model has been the most used model for decades in solid organ rejection research⁵⁷. In addition, the well-established FIS-LEW model allows the study of chronic rejection and its immunological mechanisms without any use of immunosuppression. However, as previously published by our group⁵⁸, working heterotopic allografts develop an endothelial dysfunction comparable with that of nonworking allografts, which validates the use of the simpler nonworking graft for the study of endothelial function. Perrault et al ⁵⁸ concluded that the similar prevalence of intimal hyperplasia with the development of more severe coronary lesions in working hearts may be due to differences in local nitric oxide release in these two models.

CONCLUSION

Finally, in our study, the use of spheroids ASCs demonstrated good tolerance and the absence of side effects. Our results suggest that infusion during ASC transplantation may limit the onset of CAV and potentially open a new therapeutic pathway to chronic rejection, thereby improving graft tolerance and survival.

FIGURES

Figure 1: Levels of anti-inflammatory (TSG-6), immunomodulator (IL-6, IL-8), antiapoptotic (MCP-1) and proangiogenic (VEGF) molecules. Luminex assay measurements of TSG-6, VEGF, MCP-1, IL-6 and IL-8 expression in ASCs grown as monolayer culture (ML) or 3D spheroid bodies (SB) in basic conditions and in response to TNF α (100 ng/ml) for two time points, 24 and 72h. (A) Anti-inflammatory factor TSG-6, (B) Angiogenesis related factors VEGF and MCP-1 and (C) immunomodulator IL-6 and IL-8. Values are mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$ and **** $p < 0.0001$ vs ML.

Figure 2: Distribution of ASC spheroids in treated animals 14 days after infusion (A, C). Representative images from confocal CD90⁺ immunostaining ASCs in transplanted heart (original magnification: 20X). (B, D) Representative images from immunostaining of grafted ASCs, in host heart. Arrows: CD90⁺ cells. White scale bar = 100 μ m; blue scale bar = 50 μ m.

Figure 3: Distribution of ASCs measured by immunostaining for mouse anti-human mitochondrial monoclonal antibodies (Human IgG) in heart sections. Representative staining of (A, C) recipient (host) and (B, D) heterotopically transplanted (HAHT) heart tissue in animals 14 days post-infusion of (A, B) NS or (C, D) ASCs. Human IgG stained yellow (original magnification: 10). Values are mean \pm SEM.

Scale bar = 100 μ m * p =NS *** p <0.05

Figure 4: Degree of fibrosis and left ventricular wall thickness 14 days after ASCs spheroids or NS infusion in cardiac tissue. Representative Masson's trichrome staining of (A) recipient (host) and (B, C) heterotopically transplanted heart tissue in animals 14 days after infusion of (A, B) NS or (C) ASCs. Scar tissue stained blue. Scale bar = 2mm. (D) Fibrotic area quantified as percent of total heart area (host vs ASCs treated $31.2 \pm 1.2\%$ vs NS treated $21.6 \pm 1.7\%$). Left ventricular wall thickness (LVWT; vs ASCs treated 2.4 ± 0.2 mm vs NS 1.7 ± 0.7 mm). Data represent mean \pm SEM (n=10); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

Figure 5: Neutrophil cells and apoptotic cells measured by immunostaining for myeloperoxidase (MPO) and Caspase 3 in heart sections. (A-D) MPO⁺ cells and (E-H) Caspase 3⁺ values. Representative staining of (A, E) recipient (host) and (B, C, F, G) heterotopic transplanted (HAHT) heart tissue in animals at 14 days post-infusion of (B, F) NS or (C, G) ASCs spheroid. MPO and Caspase 3 stained brown (original magnification 20x using Image Pro Premier imaging software). Scale bar=100μm. (D, H) MPO⁺ and Caspase 3⁺ cells density of host, with transplanted hearts receiving NS or ASCs spheroid. Data represent mean ± SEM; * $p < 0.05$ *** $p < 0.01$

Figure 6: Histologic aspects of NS FIS cardiac graft 14 days after injection: Effects of chronic rejection on coronary artery in LEW recipient (hematein). In all cases, transplant coronary lesions were characterized by extensive intimal proliferation leading to coronary artery occlusion (A, C, D). Those intimal lesions were associated with massive perivascular adventitial inflammatory cell infiltrate (A, D) and lymphocyte cell infiltrate into the myocardium (B). *LEW*, Lewis; *FIS*, Fisher rat

Figure 7: Representative angiogenesis and macrophages cells measured by immunostaining for CD31 and CD206 in heart sections. (A-D) CD31⁺ cells and (E-H) CD206⁺ values. Representative staining of (A, E) recipient (host) and (B, C, F, G) heterotopic transplanted (HHT) heart tissue in animals at 14 days post-infusion of (B, F) NS or (C, G) ASCs spheroid. CD206 and CD31 stained brown (original magnification 20x) using Image Pro Premier imaging software). Scale bar=100μm. (D, H) CD31⁺ and CD206⁺ cells density of host, with transplanted hearts receiving NS or ASCs spheroid. Data represent mean ± SEM; * $p = NS$

Figure 1:

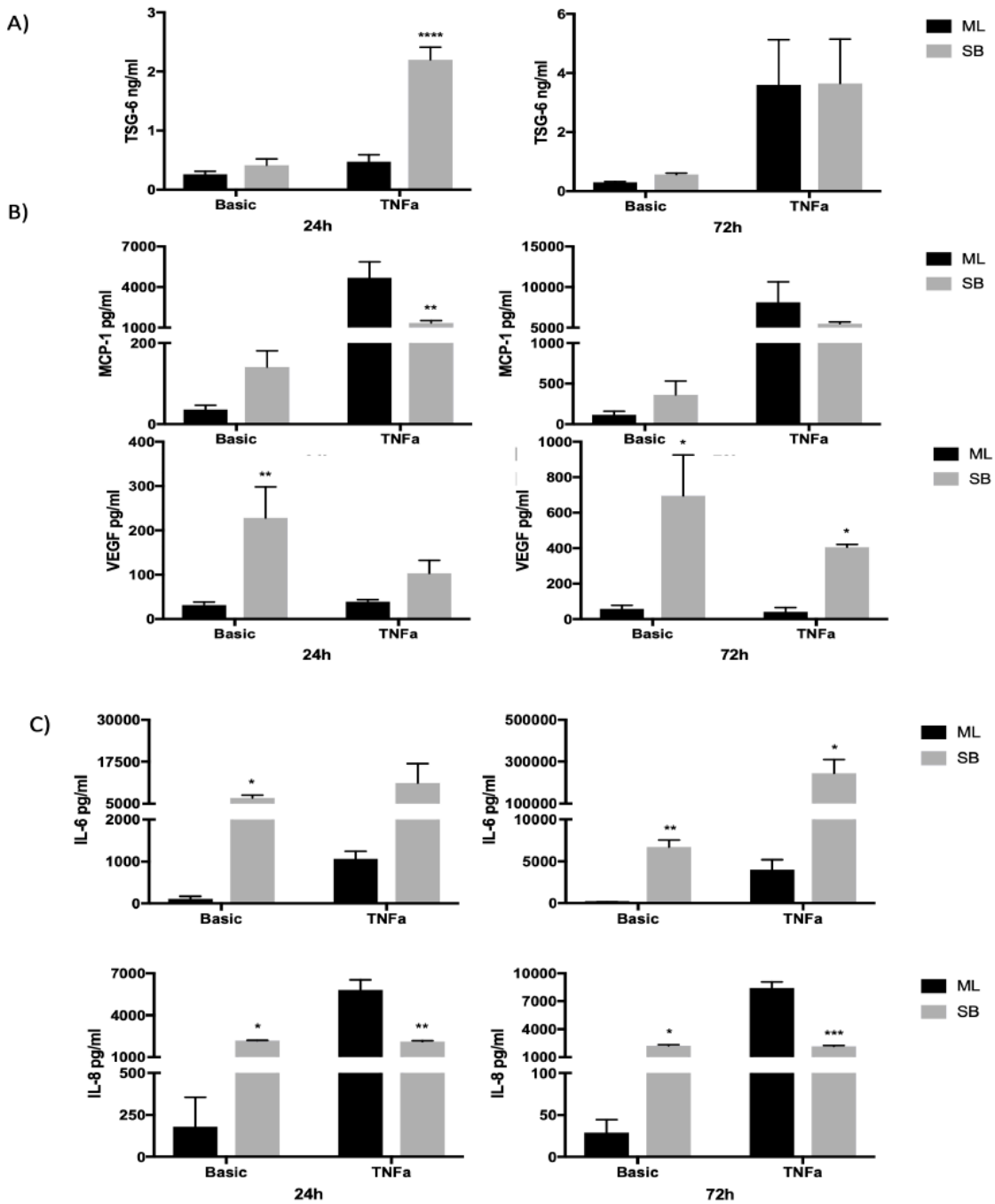


Figure 2:

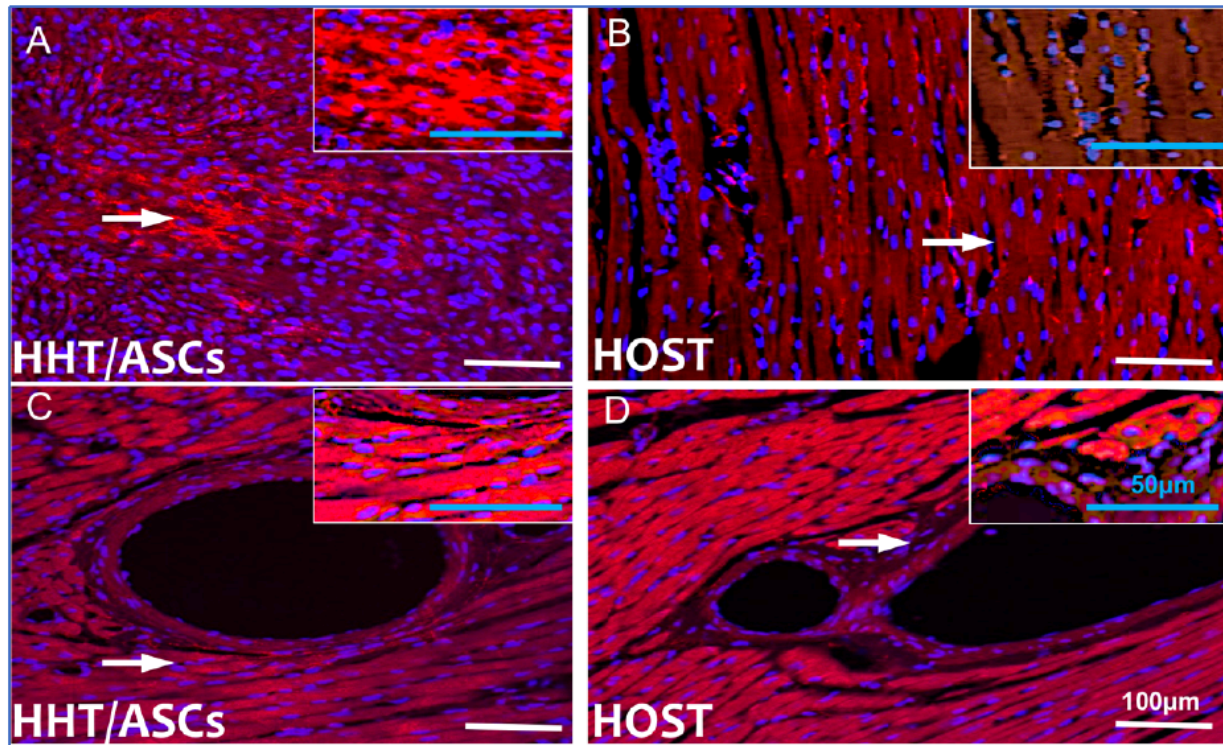


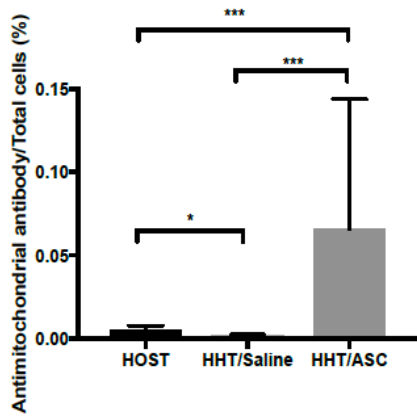
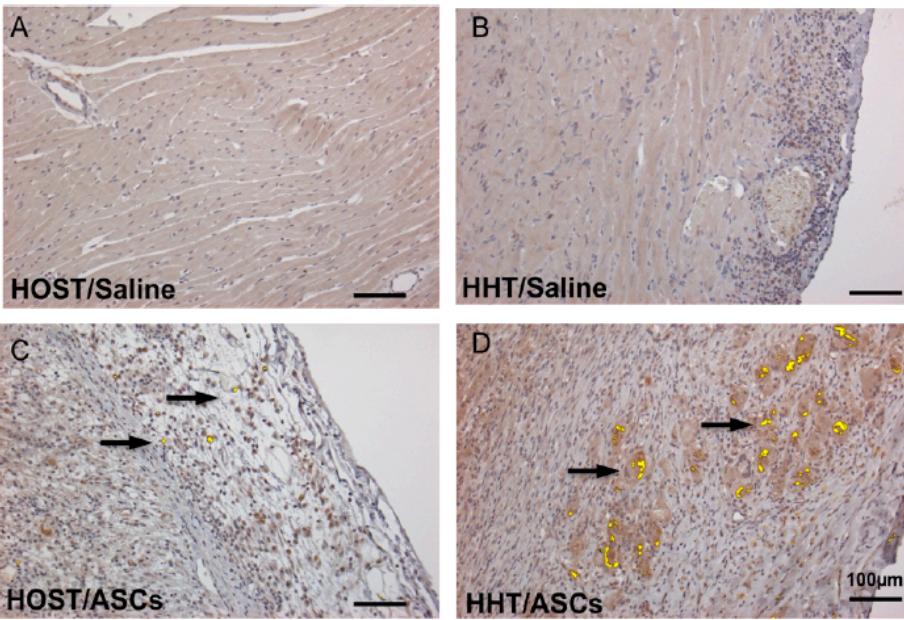
Figure 3:

Figure 4:

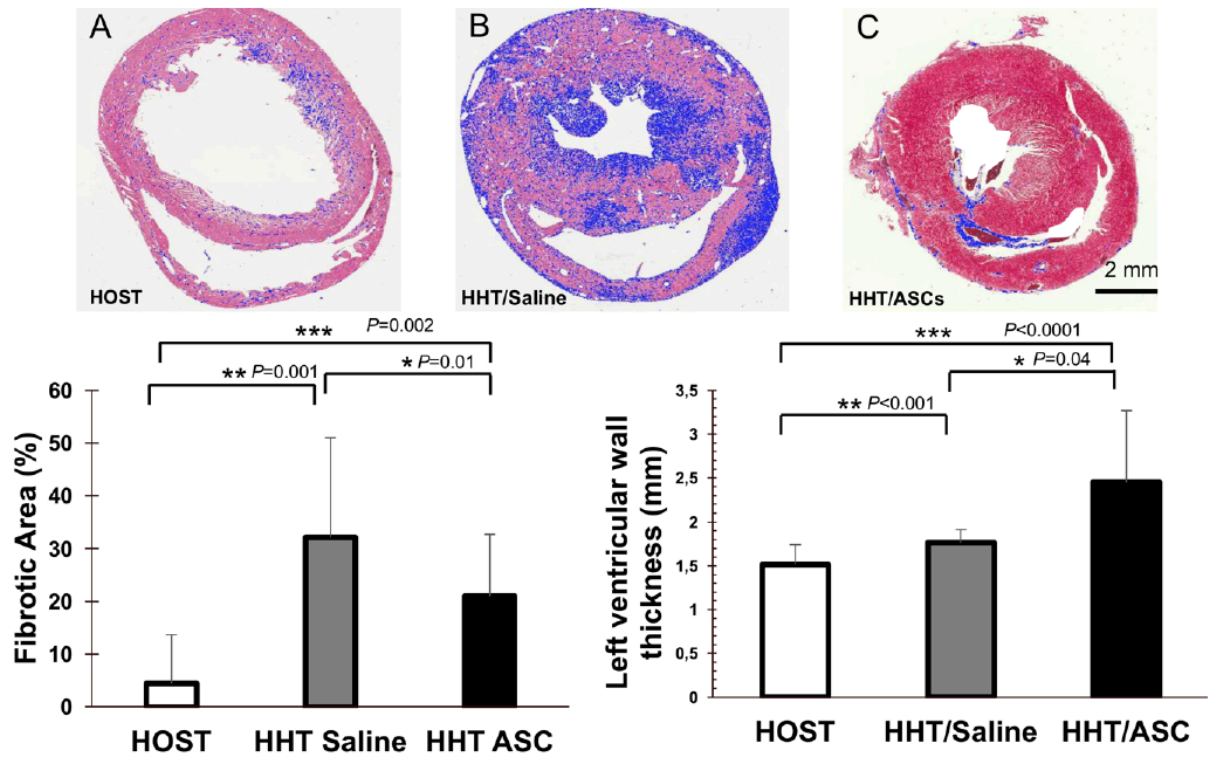


Figure 5:

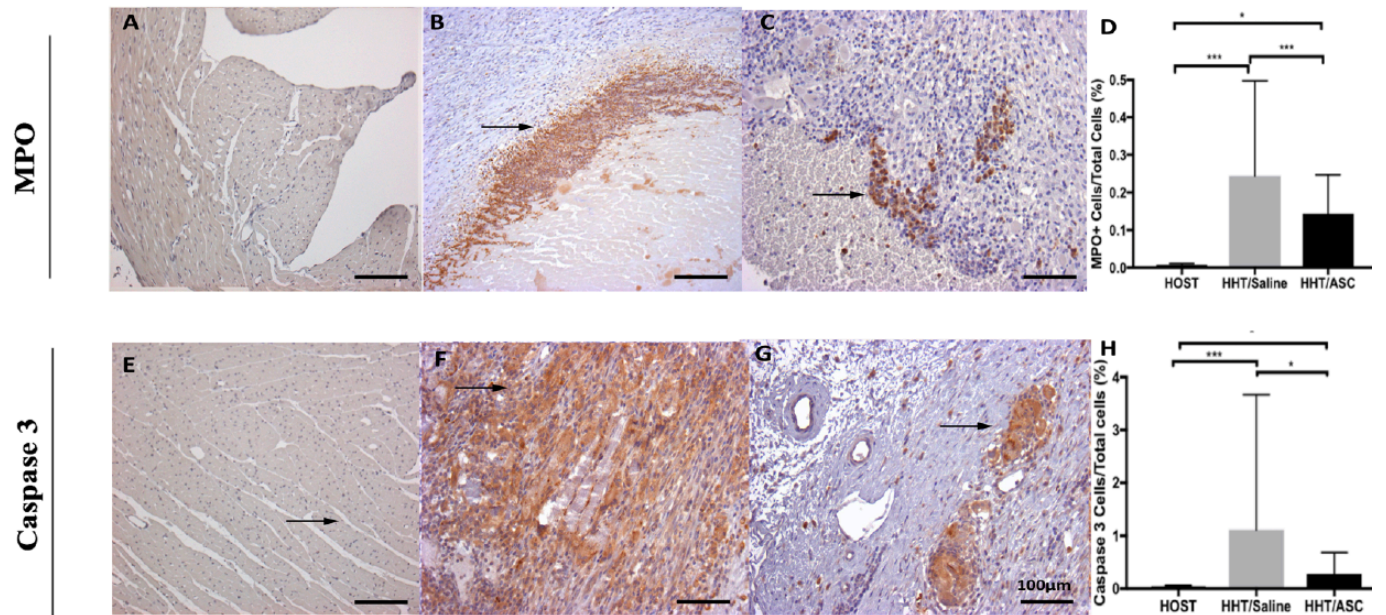


Figure 6:

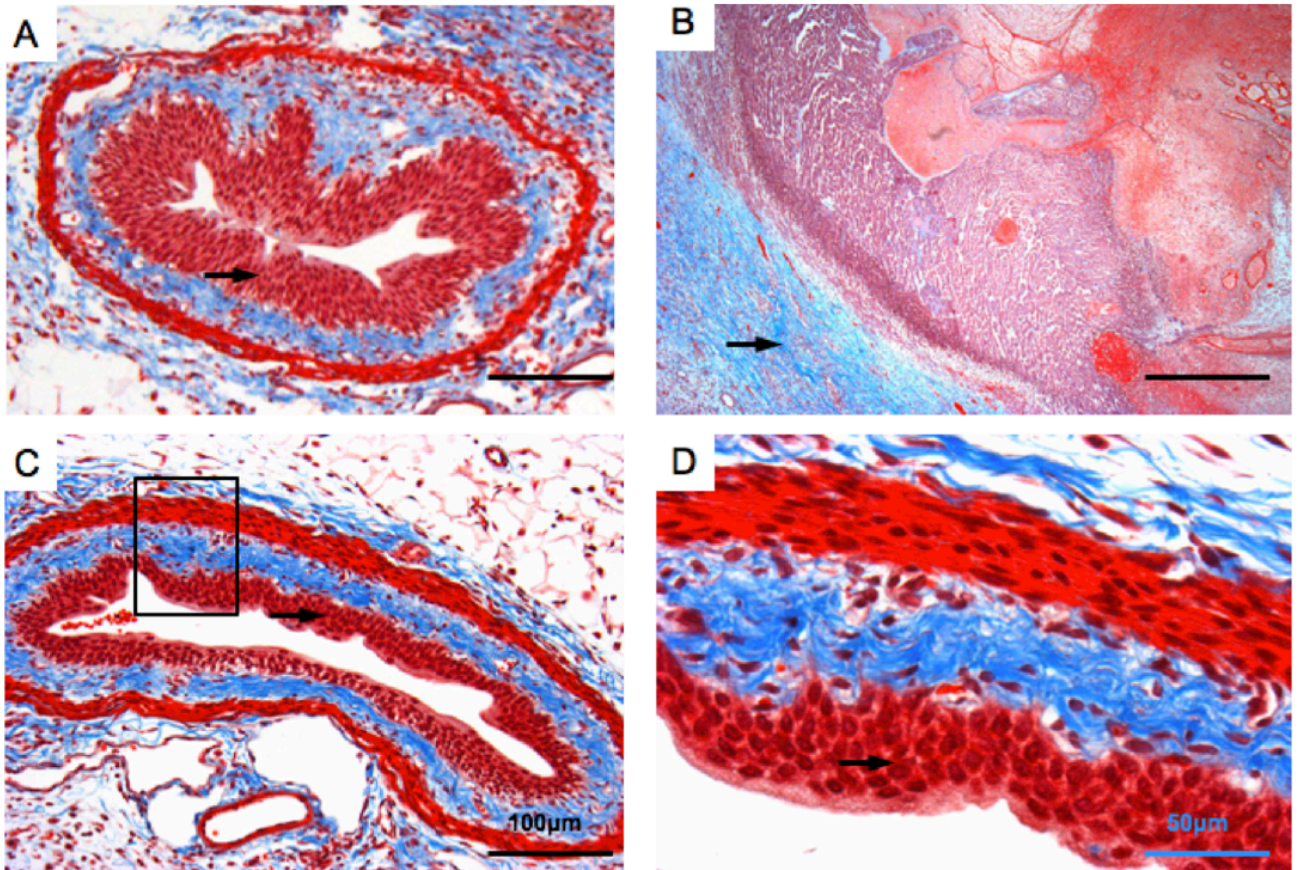
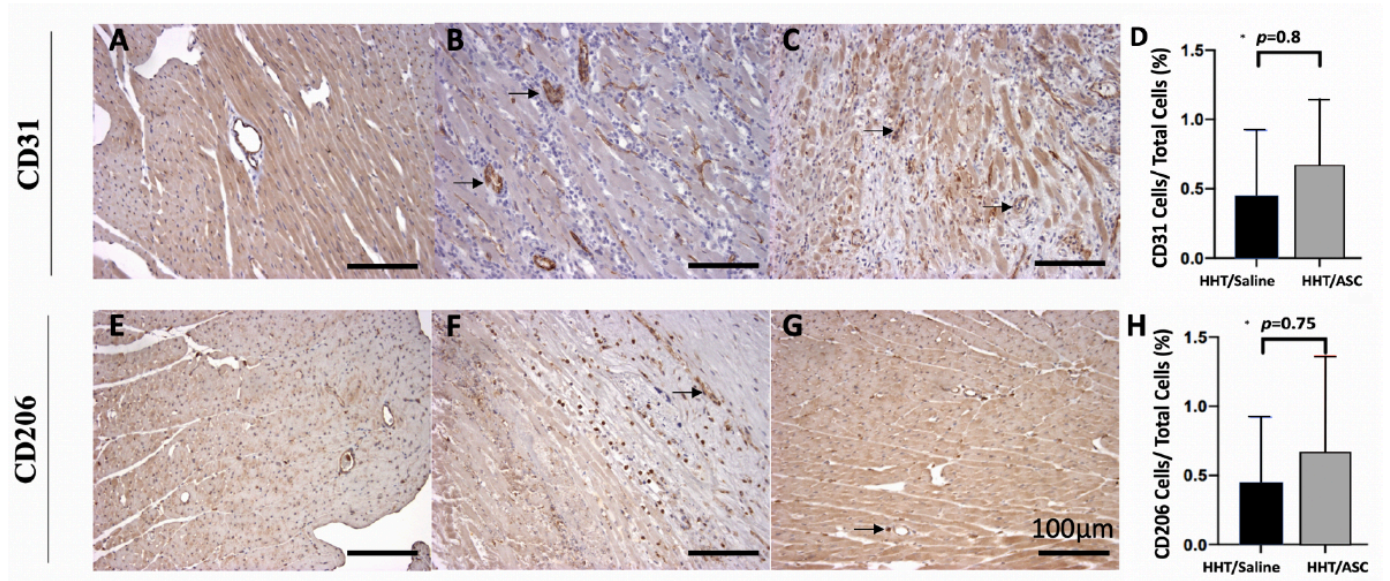


Figure 7:



REFERENCES

1. Kalogeropoulos AP, Fonarow GC, Georgiopoulos V, Burkman G, Siwamogsatham S, Patel A, Li S, Papadimitriou L and Butler J. Characteristics and Outcomes of Adult Outpatients With Heart Failure and Improved or Recovered Ejection Fraction. *JAMA Cardiol.* 2016;1:510-8.
2. Moe GW. BNP in the diagnosis and risk stratification of heart failure. *Heart Fail Monit.* 2005;4:116-22.
3. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Jr., Drazner MH, Fonarow GC, Geraci SA, Horwich T, Januzzi JL, Johnson MR, Kasper EK, Levy WC, Masoudi FA, McBride PE, McMurray JJ, Mitchell JE, Peterson PN, Riegel B, Sam F, Stevenson LW, Tang WH, Tsai EJ, Wilkoff BL, American College of Cardiology F and American Heart Association Task Force on Practice G. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62:e147-239.
4. Shah SJ, Kitzman DW, Borlaug BA, van Heerebeek L, Zile MR, Kass DA and Paulus WJ. Phenotype-Specific Treatment of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Multiorgan Roadmap. *Circulation.* 2016;134:73-90.
5. Costanzo MR. Selection and treatment of candidates for heart transplantation. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 1996;8:113-25.
6. Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC and Chen CC. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells.* 2004;22:1330-7.
7. Devine SM and Hoffman R. Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol.* 2000;7:358-63.
8. Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR and Mosca JD. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci.* 2003;10:228-41.
9. Iso Y, Spees JL, Serrano C, Bakondi B, Pochampally R, Song YH, Sobel BE, Delafontaine P and Prockop DJ. Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;354:700-6.
10. Leiker M, Suzuki G, Iyer VS, Canty JM, Jr. and Lee T. Assessment of a nuclear affinity labeling method for tracking implanted mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.* 2008;17:911-22.
11. Price MJ, Chou CC, Frantzen M, Miyamoto T, Kar S, Lee S, Shah PK, Martin BJ, Lill M, Forrester JS, Chen PS and Makkar RR. Intravenous mesenchymal stem cell therapy early after reperfused acute myocardial infarction improves left ventricular function and alters electrophysiologic properties. *Int J Cardiol.* 2006;111:231-9.
12. Gneocchi M, Zhang Z, Ni A and Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res.* 2008;103:1204-19.
13. Shabbir A, Zisa D, Suzuki G and Lee T. Heart failure therapy mediated by the trophic activities of bone marrow mesenchymal stem cells: a noninvasive therapeutic regimen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;296:H1888-97.
14. Hare JM, Traverse JH, Henry TD, Dib N, Strumpf RK, Schulman SP, Gerstenblith G, DeMaria AN, Denktas AE, Gammon RS, Hermiller JB, Jr., Reisman MA, Schaer GL and Sherman W. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of

- intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:2277-86.
15. Cai L, Johnstone BH, Cook TG, Tan J, Fishbein MC, Chen PS and March KL. IFATS collection: Human adipose tissue-derived stem cells induce angiogenesis and nerve sprouting following myocardial infarction, in conjunction with potent preservation of cardiac function. *Stem Cells*. 2009;27:230-7.
 16. Hamdi H, Boitard SE, Planat-Benard V, Pouly J, Neamatalla H, Joanne P, Perier MC, Bellamy V, Casteilla L, Li Z, Hagege AA, Mericskay M, Menasche P and Agbulut O. Efficacy of epicardially delivered adipose stroma cell sheets in dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*. 2013;99:640-7.
 17. Okayama K, Azuma J, Dosaka N, Iekushi K, Sanada F, Kusunoki H, Iwabayashi M, Rakugi H, Taniyama Y and Morishita R. Hepatocyte growth factor reduces cardiac fibrosis by inhibiting endothelial-mesenchymal transition. *Hypertension*. 2012;59:958-65.
 18. Hunt SA, American College of C and American Heart Association Task Force on Practice G. ACC/AHA 2005 guideline update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:e1-82.
 19. Jessup M and Brozena S. Heart failure. *N Engl J Med*. 2003;348:2007-18.
 20. Kannel WB. Incidence and epidemiology of heart failure. *Heart Fail Rev*. 2000;5:167-73.
 21. Gillum RF. Epidemiology of heart failure in the United States. *Am Heart J*. 1993;126:1042-7.
 22. Kirklin JK, Naftel DC, Pagani FD, Kormos RL, Stevenson LW, Blume ED, Myers SL, Miller MA, Baldwin JT and Young JB. Seventh INTERMACS annual report: 15,000 patients and counting. *J Heart Lung Transplant*. 2015;34:1495-504.
 23. Gibbon JH, Jr. Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery. *Minn Med*. 1954;37:171-85; passim.
 24. DeBakey ME. Development of mechanical heart devices. *Ann Thorac Surg*. 2005;79:S2228-31.
 25. DeVries WC, Anderson JL, Joyce LD, Anderson FL, Hammond EH, Jarvik RK and Kolff WJ. Clinical use of the total artificial heart. *N Engl J Med*. 1984;310:273-8.
 26. Rose EA, Gelijns AC, Moskowitz AJ, Heitjan DF, Stevenson LW, Dembitsky W, Long JW, Ascheim DD, Tierney AR, Levitan RG, Watson JT, Meier P, Ronan NS, Shapiro PA, Lazar RM, Miller LW, Gupta L, Frazier OH, Desvigne-Nickens P, Oz MC, Poirier VL and Randomized Evaluation of Mechanical Assistance for the Treatment of Congestive Heart Failure Study G. Long-term use of a left ventricular assist device for end-stage heart failure. *N Engl J Med*. 2001;345:1435-43.
 27. Burchill LJ and Ross HJ. Heart transplantation in adults with end-stage congenital heart disease. *Future Cardiol*. 2012;8:329-42.
 28. Kirklin JK, Naftel DC, Kormos RL, Stevenson LW, Pagani FD, Miller MA, Ullisney KL, Baldwin JT and Young JB. Third INTERMACS Annual Report: the evolution of destination therapy in the United States. *J Heart Lung Transplant*. 2011;30:115-23.
 29. Jardine AG, Gaston RS, Fellstrom BC and Holdaas H. Prevention of cardiovascular disease in adult recipients of kidney transplants. *Lancet*. 2011;378:1419-27.
 30. VanWagner LB, Ning H, Whitsett M, Levitsky J, Uttal S, Wilkins JT, Abecassis MM, Ladner DP, Skaro AI and Lloyd-Jones DM. A point-based prediction model for cardiovascular risk in orthotopic liver transplantation: The CAR-OLT score. *Hepatology*. 2017;66:1968-1979.

31. Ptaszek LM, Mansour M, Ruskin JN and Chien KR. Towards regenerative therapy for cardiac disease. *Lancet*. 2012;379:933-42.
32. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ and Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002;105:93-8.
33. Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, DiFede Velazquez DL, Zambrano JP, Suncion VY, Tracy M, Gherlin E, Johnston PV, Brinker JA, Breton E, Davis-Sproul J, Schulman IH, Byrnes J, Mendizabal AM, Lowery MH, Rouy D, Altman P, Wong Po Foo C, Ruiz P, Amador A, Da Silva J, McNiece IK, Heldman AW, George R and Lardo A. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transcatheter injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA*. 2012;308:2369-79.
34. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Penicaud L and Casteilla L. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 2004;109:656-63.
35. Sanz-Ruiz R, Fernandez-Santos E, Dominguez-Munoz M, Parma R, Villa A, Fernandez L, Sanchez PL and Fernandez-Aviles F. Early translation of adipose-derived cell therapy for cardiovascular disease. *Cell Transplant*. 2009;18:245-54.
36. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV and March KL. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004;109:1292-8.
37. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, Ishino K, Ishida H, Shimizu T, Kangawa K, Sano S, Okano T, Kitamura S and Mori H. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med*. 2006;12:459-65.
38. Mazo M, Planat-Benard V, Abizanda G, Pelacho B, Leobon B, Gavira JJ, Penuelas I, Cemborain A, Penicaud L, Laharrague P, Joffre C, Boisson M, Ecay M, Collantes M, Barba J, Casteilla L and Prosper F. Transplantation of adipose derived stromal cells is associated with functional improvement in a rat model of chronic myocardial infarction. *Eur J Heart Fail*. 2008;10:454-62.
39. Bartosh TJ, Ylostalo JH, Mohammadipour A, Bazhanov N, Coble K, Claypool K, Lee RH, Choi H and Prockop DJ. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:13724-9.
40. Zimmermann JA and McDevitt TC. Pre-conditioning mesenchymal stromal cell spheroids for immunomodulatory paracrine factor secretion. *Cytotherapy*. 2014;16:331-45.
41. Abbott CP, Lindsey ES, Creech O, Jr. and Dewitt CW. A Technique for Heart Transplantation in the Rat. *Arch Surg*. 1964;89:645-52.
42. Ono K and Lindsey ES. Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1969;57:225-9.
43. Benke K, Sayour AA, Matyas C, Agg B, Nemeth BT, Olah A, Ruppert M, Hartyanszky I, Szabolcs Z, Radovits T, Merkely B and Szabo G. Heterotopic Abdominal Rat Heart Transplantation as a Model to Investigate Volume Dependency of Myocardial Remodeling. *Transplantation*. 2017;101:498-505.
44. Montanari S, Dayan V, Yannarelli G, Billia F, Viswanathan S, Connelly KA and Keating A. Mesenchymal stromal cells improve cardiac function and left ventricular remodeling in a heart transplantation model. *J Heart Lung Transplant*. 2015;34:1481-8.
45. Deuse T, Hua X, Taylor V, Stubbendorff M, Baluom M, Chen Y, Park G, Velden J, Streichert T, Reichenspurner H, Robbins RC and Schrepfer S. Significant reduction of acute

- cardiac allograft rejection by selective janus kinase-1/3 inhibition using R507 and R545. *Transplantation*. 2012;94:695-702.
46. Panther F, Strasen J, Czolbe M, Lazariotou M, Burkard N, Williams T, Lange V, Otto C and Ritter O. Inhibition of nuclear translocation of calcineurin suppresses T-cell activation and prevents acute rejection of donor hearts. *Transplantation*. 2011;91:597-604.
47. Bedi DS, Riella LV, Tullius SG and Chandraker A. Animal models of chronic allograft injury: contributions and limitations to understanding the mechanism of long-term graft dysfunction. *Transplantation*. 2010;90:935-44.
48. Preda MB, Ronningen T, Burlacu A, Simionescu M, Moskaug JO and Valen G. Remote transplantation of mesenchymal stem cells protects the heart against ischemia-reperfusion injury. *Stem Cells*. 2014;32:2123-34.
49. Ylostalo JH, Bartosh TJ, Coble K and Prockop DJ. Human mesenchymal stem/stromal cells cultured as spheroids are self-activated to produce prostaglandin E2 that directs stimulated macrophages into an anti-inflammatory phenotype. *Stem Cells*. 2012;30:2283-96.
50. Bhang SH, Lee S, Shin JY, Lee TJ, Jang HK and Kim BS. Efficacious and clinically relevant conditioned medium of human adipose-derived stem cells for therapeutic angiogenesis. *Mol Ther*. 2014;22:862-72.
51. Song W-J, Li Q, Ryu M-O, Ahn J-O, Ha Bhang D, Chan Jung Y and Youn H-Y. TSG-6 Secreted by Human Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorates DSS-induced colitis by Inducing M2 Macrophage Polarization in Mice. *Scientific Reports*. 2017;7.
52. Salamon A, Adam S, Rychly J and Peters K. Long-term tumor necrosis factor treatment induces NFkappaB activation and proliferation, but not osteoblastic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;54:149-62.
53. Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell*. 2012;10:709-16.
54. Birks EJ. Molecular changes after left ventricular assist device support for heart failure. *Circ Res*. 2013;113:777-91.
55. Gupte AA, Hamilton DJ, Cordero-Reyes AM, Youker KA, Yin Z, Estep JD, Stevens RD, Wenner B, Ilkayeva O, Loebe M, Peterson LE, Lyon CJ, Wong ST, Newgard CB, Torre-Amione G, Taegtmeier H and Hsueh WA. Mechanical unloading promotes myocardial energy recovery in human heart failure. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014;7:266-76.
56. Cao DJ, Jiang N, Blagg A, Johnstone JL, Gondalia R, Oh M, Luo X, Yang KC, Shelton JM, Rothermel BA, Gillette TG, Dorn GW and Hill JA. Mechanical unloading activates FoxO3 to trigger Bnip3-dependent cardiomyocyte atrophy. *J Am Heart Assoc*. 2013;2:e000016.
57. Wakayama K, Fukai M, Yamashita K, Kimura T, Hirokata G, Shibasaki S, Fukumori D, Haga S, Sugawara M, Suzuki T, Taniguchi M, Shimamura T, Furukawa H, Ozaki M, Kamiyama T and Todo S. Successful transplantation of rat hearts subjected to extended cold preservation with a novel preservation solution. *Transpl Int*. 2012;25:696-706.
58. Perrault LP, Bidouard JP, Desjardins N, Villeneuve N, Vilaine JP and Vanhoutte PM. Comparison of coronary endothelial dysfunction in the working and nonworking graft in porcine heterotopic heart transplantation. *Transplantation*. 2002;74:764-72.

Chapitre 9 – Effets paracrines potentiels des CSM sur le myocarde

9.1. Introduction

Le taux d'implantation et de différenciation des CSM dans le myocarde est faible (<1%) par rapport à la récupération fonctionnelle observée du myocarde après transplantation de cellules, ce qui a soulevé des questions quant à savoir si la différenciation était réellement le mécanisme prédominant de l'action des CSM. Celles-ci sont connues pour sécréter des facteurs paracrines qui contribuent à la cardiomyogenèse endogène et l'angiogenèse.¹⁴⁶ Les CSM sécrètent une large gamme de cytokines et de facteurs de croissance, qui peuvent supprimer le système immunitaire, inhiber la fibrose et l'apoptose, améliorer l'angiogenèse, et stimuler la différenciation des cellules souches en tissus spécifiques.³¹¹ Des études *in vitro* ont montré que le milieu conditionné à partir de Akt-CSM hypoxique inhibe l'apoptose et peut déclencher des contractions spontanées de cardiomyocytes de rat⁶¹⁴. Lorsque ce milieu conditionné à partir d'Akt-CSMs a été injecté dans des cœurs post-infarctus de rat, la taille de l'infarctus était réduite et la FEVG améliorée.⁶¹⁴ Plusieurs gènes codant pour le VEGF, FGF-2, HGF, IGF-I sont surexprimés dans les Akt-CSMs, et ces facteurs pourraient expliquer les améliorations fonctionnelles observées.⁶¹⁴ En outre, ces chercheurs suggèrent que ces améliorations sont observées 72 heures après injection et que la prise d'allogreffe serait alors peu probable pour expliquer des améliorations si rapides, mais que des facteurs paracrines seraient en mesure d'affecter immédiatement le milieu. Par ailleurs, les Akt-CSMs sécrètent une protéine spécifique (SFRP2), qui est un facteur paracrine exerçant un effet pro-survie sur le myocarde ischémique grâce à la modulation des signaux Wnt.⁶¹⁵ Le milieu conditionné concentré (MCC) des CSM de la moelle osseuse (MO-CSM) a montré la présence de facteur de croissance vasculaire endothéliale (VEGF), du facteur de croissance basique des fibroblastes (bFGF), du facteur de croissance placentaire (PIGF) et de la protéine monocyttaire chémoattractant-1 (MCP-1), qui renforcent la prolifération des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses.⁶¹⁶ L'augmentation de taux locaux de VEGF et de FGF a été détecté lorsque des CSM marquées par la β -galactosidase étaient injectées dans les muscles périphériques de souris ischémiques par rapport aux témoins. Ces CSM ont été détectés dans des quantités décroissantes du jour 7 à 28 post-transplantation et ont échoué à s'intégrer au sein des vaisseaux.⁶¹⁶ L'administration seule des facteurs sécrétés par les CSM ne peut pas avoir le même impact que l'administration des cellules. Dans un modèle porcin d'infarctus, l'injection intra-

myocardique de CSM réduit la taille de l'infarctus par le recrutement endogène c-kit + des cellules souches cardiaques (CSC), alors qu'une seule application du MCC ne le fait pas.⁶¹⁷ Seule une très faible quantité des CS s'incorpore au sein du myocarde en raison de la nature hostile du milieu traité (inflammation, ischémie, diminution de la vascularisation)⁶¹⁸. Les différents types et sources de cellules, ainsi que la voie d'administration pourraient être à l'origine des variations de rétention des CS rapportées dans les études. Cependant, l'efficacité des CS a été démontrée sur la FEVG.^{330, 596} Les CS ont la capacité de sécréter différents facteurs de croissance, tels que le facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF), le facteur de croissance « insuline-like type 1 » (IGF-1), le facteur de croissance hépatocyte (HGF) ou le NO³⁷². Ainsi, ces peptides actifs ont un effet favorable sur le myocarde en agissant sur l'inflammation, l'apoptose et l'angiogenèse⁶¹⁹. En réponse à une insulte cardiaque ischémique, plusieurs mécanismes de réparation inadaptés se mettent en route afin d'altérer la dimension (remodelage) et la fonction du VG⁶²⁰. La modification de la MEC, l'activation de cytokines proinflammatoires et l'apoptose provoquent une suite d'événements aboutissant à une dilatation progressive du VG et l'IC⁶²¹. Les bases de la thérapie cellulaire en milieu ischémique vont se focaliser sur ces différents mécanismes de défense.

9.1. Survie et cytoprotection

Les CS adultes au sein d'un environnement ischémique favorisent la survie des cardiomyocytes via la sécrétion de molécules cytoprotectrices. Gnechi et al. ont démontré que le milieu de culture conditionné par des CSM hypoxiques réduisait l'apoptose des cardiomyocytes de rats ainsi que la nécrose.^{622, 623} Uemura et coll. ont observé dans un modèle murin que le transfert de CSM-MO, montrant une régulation positive sur Akt après brève anoxie, prévenait l'apoptose par un effet paracrine. Ainsi, cette étude a prouvé que les CSM-MO inhibaient de façon significative le remodelage négatif ventriculaire après IAM.⁶²⁴ De même, Kinnaird et al. ont suggéré qu'une augmentation des TIMP pourrait avoir un effet anti-apoptotique et prévenir ainsi la mort cellulaire programmée des cardiomyocytes⁴⁵⁴. Takahashi et al. ont également démontré dans un modèle murin que les cellules mononucléaires de la MO sécrètent des protéines comme le VEGF, PDGF, IGF-1 et IL-1b dont la production est stimulée par l'hypoxie. Le milieu de culture CS inhibait l'apoptose des cardiomyocytes et préservait leurs capacités contractiles.⁴⁹³

Nos études précédentes (Master II en sciences chirurgicales, Paris La Sorbonne) portaient sur la cible myocytaire privilégiée dans le rejet chronique. Nous avons montré par la méthode du TUNEL que le cardiomyocyte était la cible privilégiée (apoptose) du rejet humoral. Ainsi, l'effet cardioprotecteur des CSM en inhibant l'apoptose des cardiomyocytes pourrait être une des voies thérapeutiques possibles de la MCG.

9.2. Prolifération des cardiomyocytes

Le facteur de croissance fibroblastique 2 (FGF₂) favorise la prolifération des cardiomyocytes *in vitro* via PKC_ε incluant un processus de phosphorylation connexine-43.⁶²⁵ De même, le PDGF augmente la prolifération des cardiomyocytes via l'activation d'Akt, l'inactivation de GSK-3β et la régulation négative de l'inhibiteur de la cycline kinase dépendante p27.⁶²⁶ La neuréguline-1 (NRG1) stimule la synthèse d'ADN dans les cardiomyocytes adultes à travers un récepteur ErbB4.⁶²⁷ Dans un modèle de souris ischémique, l'injection de NRG1 favorise la régénération cardiaque suivant un IDM⁶²⁷ et est utilisée dans certaines études cliniques comme agent thérapeutique dans l'IC.⁶²⁸

Les facteurs de croissance comme le FGF, PDGF, et NRG1 favorisent la prolifération des cardiomyocytes via PI3K. Sous des conditions hypoxiques, les ADCs sécrètent une cytokine pro-inflammatoire IL-6 et cette protéine est également liée à l'augmentation de la prolifération des cardiomyocytes via Stat3 et ERK1/2.⁶²⁹ Une autre protéine la périostine sécrétée par les ASCs⁶³⁰ favoriserait la prolifération des cardiomyocytes via l'intégrine et l'activation médiée de PI3K.⁶³¹ Dans un modèle murin d'IDM, les cardiomyocytes induits par la périostine réintègrent le cycle cellulaire et sont associés à une amélioration de la FEVG.⁶³¹

Bien que cette protéine ait été associée à une augmentation de la fibrose myocardique,^{632, 633} son injection dans l'espace péricardique améliore la FEVG suivant un IDM.⁶³²

9.3. Néovascularisation

L'injection de CSM-MO dans un myocarde ischémique résulte en une augmentation du flux sanguin local et une augmentation de la densité capillaire.^{349, 621} De plus, l'injection des CSM suivant une occlusion chronique augmente la densité capillaire.^{623, 634} Seule une faible proportion de CSM s'intègre et se différencie en structures vasculaires.^{635, 636}

Le facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF), le facteur de croissance des hépatocytes (HGF), le facteur de croissance insulino-like 1 (IGF1) et le facteur de croissance de fibroblastes (FGF) sont les cytokines les plus étudiées dans la néoangiogenèse car retrouvées en quantité abondante⁶³⁷ après injection de CS adultes.⁶³⁸ Le VEGF est un important facteur paracrine pro-angiogénique car l'ablation de ce gène inhibe la capacité des CSM à promouvoir l'amélioration de la fonction dans un cœur ischémique.⁶³⁹ Par ailleurs, les anticorps ciblant spécifiquement VEGF et FGF n'atténuent que partiellement l'effet sur la média.⁶⁴⁰

Ces médiateurs paracrines angiogéniques sont sécrétés en grande quantité au sein du muscle cardiaque⁶⁴¹. Des études suggèrent que la sécrétion de ces cytokines stimule l'angiogenèse et, par conséquent, la perfusion locale du myocarde ischémique^{642, 643}. Ainsi, Gnecchi et al. ont été parmi les premiers à démontrer que l'injection d'un milieu de culture de CSM conditionnées était suffisant pour démontrer un effet bénéfique *in vitro* et *in vivo*.⁶²²

De même, l'incorporation de gènes cibles dans la CS permettrait d'améliorer la synthèse de peptides actifs (VEGF, FGF) et d'induire une augmentation des signaux paracrines et de la néoangiogenèse⁶⁴⁴.

Les cellules endothéliales progénitrices (CPEs) agissent également sur l'angiogenèse via les mécanismes paracrines.⁶⁴⁵ Le VEGF et le facteur stromal-1 (SDF-1) sont tous deux sécrétés par les CPEs et induisent une migration cellulaire endothéliale ainsi que la formation de capillaires.⁶⁴⁶

9.4. Remodelage cardiaque

L'atteinte cardiaque lors d'un IDM est accompagnée d'une perte cellulaire et de fonction menant progressivement au remodelage ventriculaire péjoratif. Ceci s'accompagne d'une modification de

la MEC incluant le développement de fibrose, d'hypertrophie myocytaire, et de modifications de la fonction et des dimensions ventriculaires. La mauvaise régulation de la MEC est à l'origine du remodelage négatif et d'une baisse de la performance du myocarde dans l'IC⁶⁴⁷. Les CSM via le relargage de facteurs paracrines peuvent protéger la MEC et ainsi prévenir le remodelage négatif post-infarctus. Notamment, les CSM ont causé dans différents modèles animaux une diminution de la fibrose au sein de plusieurs organes comme le coeur⁶³⁷, les poumons⁵¹⁰, le foie⁶⁴⁸ ou les reins⁶⁴⁹. Les CSM expriment un certain nombre de protéines qui régulent la MEC, comme les métalloprotéinases (MMP), les protéases sériques, les inhibiteurs de protéases sériques suggérant que les CS transplantées pourraient inhiber la fibrose via un effet paracrine.⁶⁵⁰

Suite à un IAM, la transplantation de CSM entraîne une inhibition de l'expression de collagène I et III ainsi que de l'inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases (TIMP-1).⁶⁵¹ Le milieu conditionné préparé à partir de CS inhibe la prolifération fibroblastique et inhibe la production de collagène I et III.⁶⁵² Fedak et coll. ont observé, dans un modèle ischémique chez le rat, une augmentation de l'expression des TIMP dans le myocarde, une réorganisation des éléments dégradés de la MEC et une diminution de la dilatation ventriculaire⁶⁵³. D'autres études ont démontré une amélioration de la FEVG par une préservation de la MEC⁶⁵⁴. La protéine Sfrp2 a démontré un rôle inhibiteur sur la fibrose et l'activité de Bmp1, une enzyme clé dans la régulation de la synthèse de collagène, était réprimée par de haute dose de Sfrp2.⁶⁵⁵ Matri et al. ont montré une réduction de la fibrose et une amélioration de la fonction cardiaque après délivrance intrapéritonéale de Sfrp2 chez des hamsters cardiomyopathiques.⁶⁵⁶ Considérant que les CSM sécrètent Sfrp2, le microenvironnement formé par l'injection de ces CS pourrait créer un milieu avec une activité anti-fibrotique.

9.5. Activation des CS résidentes

Le cœur contient un certain nombre de CS résidentes définies par un des marqueurs tel que c-Kit et Sca-1. Les CS résidentes ayant présenté le plus d'intérêt à l'heure actuelle sont les cellules progénitrices cardiaques c-Kit (CPC). Ces CPC auraient la capacité de promouvoir la régénération myocardique via la mobilisation de différentes cellules cardiaques matures au sein du tissu lésé⁶⁵⁷. L'injection intracoronaire de CPCs autologues c-Kit+ améliorent la FEVG et réduit la taille de l'infarctus chez les patients en IC après IDM.^{658, 659} Dans des modèles animaux, l'injection de ces CPCs au sein du myocarde infarci entraîne une amélioration de la FEVG. Cependant, la différenciation des cellules c-Kit+ en cardiomyocytes est trop lente pour expliquer le bénéfice fonctionnel. Les auteurs concluent donc que l'effet paracrine pourrait être responsable de l'effet régénérateur des CPCs c-Kit+.^{660, 661} La nature de ces facteurs paracrines reste encore à définir. Les données récentes suggèrent que les facteurs paracrines sécrétés par les CS adultes augmenteraient la capacité des CPCs c-Kit+ à se différencier en cardiomyocytes. Le milieu de culture dérivé de CSM favorise la prolifération et la différenciation des CPCs. Le facteur de croissance IGF-1 sécrété par les CSM améliore la mobilisation des CS résidentes⁶⁶² et leur engagement dans la lignée cardiaque.^{663, 664}

En activant ces CS résidentes, les CSM favoriseraient l'activation des mécanismes endogènes de réparation du myocarde. Fazel et coll. ont identifié un facteur déterminant dans les processus de réparation endogène, le facteur de cellule souche (SCF)⁶⁶⁵. Ils ont démontré également une augmentation d'un signal du récepteur « c-kit » qui stimule le recrutement endogène des CSM-MO⁶⁶⁶. Ces processus suggèrent qu'une présence même transitoire de CS peut provoquer une modulation durable du phénomène de réparation endogène par un effet paracrine. D'autres équipes ont identifié le facteur paracrine Abi3p sécrété par les CSM comme une protéine favorisant la différenciation des CSM, en formant des dépôts extracellulaires.⁶⁶⁷ De plus, Abi3p a démontré des capacités d'inhibition de la prolifération des CSM ainsi que des CPCs.^{667, 668} L'ablation de l'expression génétique de Abi3p est associée à une mauvaise guérison du myocarde après IDM.⁶⁴¹

9.6. Dysfonction endothéliale des artères coronaires

Le développement de la maladie chronique du greffon (MCG) pourrait être relié à la présence d'une dysfonction endothéliale des artères coronaires du greffon. La production de synthase induite de NO (iNOS) notamment est sur-stimulée dans les greffons avec MCG et iNOS pourrait y jouer un rôle protecteur. Par exemple, les animaux déficients en iNOS voient le développement de vasculopathie du greffon exacerbé et chez les animaux où l'iNOS est stimulé par thérapie génique, la MCG est réduite.^{669, 670} Un effet protecteur similaire est atteint chez les animaux qui ont un niveau abaissé en diméthylarginine, un facteur inhibiteur de iNOS.⁶⁷¹ Ainsi, la production en grande quantité de iNOS par les CSM en cas de lésion endothéliale, permettrait d'obtenir un effet protecteur sur l'endothélium coronarien et immuno-régulateur sur l'infiltration lymphocytaire, notamment en évitant l'apparition d'hyperplasie intimale.⁶⁷² Enfin, de récentes publications ont montré que les traitements par CSM après lésion ischémique, pouvaient promouvoir le déplacement des macrophages M1 pro-inflammatoires vers un phénotype M2 anti-inflammatoire notamment par la sécrétion de PGE₂ par les CSM.⁶⁷³ De même, Prockop et al. ont démontré qu'une seconde boucle anti-inflammatoire était activée, lors de la sécrétion par les CSM de TSG-6. Celui-ci interagit avec le CD44 sur les macrophages résidents afin de diminuer le signal TLR2/NFκB et ainsi, réduit la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires.⁶⁷³ En plus de ses actions immuno-modulatrices précitées, les CSM peuvent également promouvoir l'induction de lymphocytes T, et ainsi réduire le rejet de greffe et promouvoir l'utilisation des CSM dans le traitement des lésions d'ischémie/reperfusion.⁶⁷⁴ Des études plus approfondies confirmant que les CSM peuvent diminuer le rejet en réduisant l'infiltration de lymphocytes T dans l'allogreffe sont nécessaires.

9.7. Facteurs de croissance

Bien qu'il existe une multitude de cytokines potentiellement thérapeutiques et des facteurs de croissance sécrétés par une variété importante de cellules ⁶⁷⁵, nous allons détailler brièvement les facteurs paracrines-clés qui ont été déjà étudiés, soit en étude préclinique ou clinique afin de favoriser la guérison ou la réparation cardiaque. Les cinétiques d'action exactes de ces facteurs paracrines ne sont pas connues mais l'efficacité dans le remodelage et la restitution de la fonction cardiaque a été démontrée aussi rapidement qu'à 72 heures après injection des CSM.

9.7.1. Le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) :

Ce facteur de croissance est traditionnellement lié à l'angiogenèse.⁶⁷⁵ Il régule la croissance vasculaire en modulant la biologie vasculaire (notamment par la modulation de la perméabilité vasculaire).⁶⁷⁶ Outre son potentiel angiogénique, le VEGF pourrait se révéler bénéfique en tant que facteur paracrine en raison d'autres effets rapportés. Wu et al. ont démontré que le VEGF était directement impliqué dans les mécanismes de défenses des cellules endothéliales contre les lésions ischémiques ou cytotoxiques (CyD, H₂O₂, CsA).⁶⁷⁷ Aussi, l'utilisation spécifique d'anticorps anti VEGF modifie la réponse à ces agents en augmentant les dommages cellulaires. Ainsi, ces résultats suggèrent que le VEGF joue un rôle critique dans le maintien de la viabilité endothéliale dans des conditions de dommages cellulaire. En favorisant la sécrétion paracrine de VEGF, les CSM induisent un mécanisme de protection endothéliale coronarien pouvant potentiellement prévenir la survenue de lésions de coronaropathie du greffon. Il a été montré également que le VEGF augmente la densité cellulaire de la MO, ainsi que la mobilisation et le recrutement des cellules progénitrices.⁶⁷⁷ Il agit comme médiateur en limitant la taille de l'infarctus suite à l'injection de cellules mononucléaires de la MO, grâce à ses propriétés anti-apoptotique ⁶⁷⁸. En outre, dans un modèle porcin d'IAM, Laguens et al. ont démontré que le VEGF pouvait induire la mitose (cariokinésie) au sein des cardiomyocytes après injection intra-myocardique. ⁶⁷⁹

9.7.2. Le facteur de croissance hépatique (HGF) :

L'atténuation des lésions ischémiques au sein du tissu cardiaque pourrait venir de l'induction de facteurs anti-apoptotiques agissant comme cardioprotecteurs. Le facteur de croissance hépatique (HGF) a initialement été identifié au sein des hépatocytes comme agent mitogène doué de chémoattractisme et d'actions antiapoptotiques au sein de différents tissus (du système nerveux au système immunitaire et réticulo-endothélial).^{680, 681} Dans un modèle d'ischémie/reperfusion chez le rat, l'administration de HGF en intraveineux réduit l'apoptose des cardiomyocytes et la taille de l'infarctus.^{682, 683} Soit par transfert de gènes ou surexpression des CS transplantées, les rôles cardioprotecteurs de HGF seraient liés à son potentiel angiogénique, le remodelage positif de la MEC et l'amélioration de la prise de greffe de CS exogènes au sein du myocarde endommagé^{684, 685}. Par ailleurs, en combinaison avec d'autres cytokines, HGF améliorerait le recrutement de CS endogènes cardiaques.⁶⁸⁶

9.7.3. Le facteur dérivé des cellules souches (SDF-1 α) :

Cette chimiokine, appelée également CXCL12, a été impliquée dans les propriétés migratoires des CS progénitrices, avec un rôle actif dans les processus inflammatoires liés à l'atteinte tissulaire⁴⁶⁴. Il est impliqué notamment dans l'hématopoïèse et la cardiogénèse. Par son action sur le chémorécepteur CXCR4, SDF-1 contribue au recrutement des CS ou des cellules malignes⁴⁶⁶. Lors d'atteintes ischémiques, le facteur hypoxique induit-1 (HIF-1), un médiateur-clé de la réponse cellulaire à l'hypoxie, régule directement les taux de SDF-1.^{467, 687} Après une lésion cardiaque, les taux de SDF-1 intra-myocardiques varient grandement la 1^{ère} semaine⁴⁴⁸. En utilisant un transfert de gène d'adénovirus afin de sur-exprimer le SDF-1 sur les CSM-MO, on a constaté que l'augmentation de la mobilisation des CS est produite uniquement en cas d'atteinte cardiaque⁶⁸⁸. En outre, l'expression locale de CXCL12 a donné lieu à une amélioration de la FEVG, médiée par un plus grand recrutement des CEP^{468, 689}.

9.7.4. Facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF-BB) :

La famille PDGF est composée de quatre gènes (PDGF : A-D) et est exprimée dans de nombreuses autres populations de cellules sous différents états physiologique et pathologiques⁶⁹⁰⁻⁶⁹². Les altérations de l'expression cardiaque de PDGFR ont souligné l'importance de ces récepteurs dans l'homéostasie cardiaque⁶⁹³. En particulier, la production diminuée de PDGF a

été démontrée dans les cœurs sénescents, se traduisant par une réduction de sa capacité angiogénique et ainsi que de son potentiel de réparation⁶⁹⁴. Des études ont montré les effets cardioprotecteurs du PDGF. Notamment, l'injection intramyocardique de PDGF a amélioré la FEVG chez les cœurs ischémiques⁶⁹⁵. Un prétraitement au PDGF a abouti à la restauration du potentiel angiogénique de cœurs sénescents et la promotion de l'engagement des CSM-MO à réintégrer la lignée cardiaque⁶⁹⁶. Enfin, le PDGF (surexprimé de façon concomitante avec bFGF ou VEGF) agit favorablement sur l'angiogenèse^{697, 698}.

9.7.5. Facteur de croissance basique des fibroblastes (bFGF):

D'autres facteurs pro-angiogéniques ont été identifiés tels que bFGF, et impliqué dans une action autocrine sur les cellules endothéliales⁶⁹⁹. Ces études en thérapie génique clinique et expérimentale ont montré des résultats prometteurs⁷⁰⁰. Cependant, les essais cliniques ultérieurs utilisant le transfert de gènes à base d'adénovirus (AGENT-3 et AGENT-4) n'ont pas démontré d'amélioration cliniquement significative chez les patients angineux chroniques symptomatiques non éligibles à une angioplastie ou une revascularisation chirurgicale⁷⁰¹. Cependant, en utilisant un modèle porcin d'infarctus, Lu et al. ont rapporté l'action synergique de bFGF co-administré avec le PDGF par une libération lente de polymère en sucrose octosulfate d'aluminium et possédant une activité de liaison à l'héparine.⁷⁰¹ La néo-angiogenèse ainsi que le remodelage et l'artériogenèse ont été seulement amélioré par la combinaison de ces facteurs de croissance. L'angiogenèse et la FEVG étaient toutes deux améliorées lorsque deux facteurs de croissance étaient administrés de façon concomitante⁷⁰². Padoue et al. ont été les premiers à définir le rôle du bFGF dans la réparation cardiaque en utilisant un modèle d'atteinte cardiaque induite par l'isoprotérénol⁷⁰³. Ces auteurs ont constaté que l'augmentation de bFGF était présente dans la zone proche de l'infarctus, postulant que cela favorisait la migration des CS progénitrices et leur prolifération. D'autres chercheurs ont documenté les effets cardioprotecteurs via des effets directs sur la prolifération des cardiomyocytes ou en complément à la thérapie cellulaire pour améliorer la survie des cellules transplantées^{704, 705}.

9.7.6. Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1):

La famille de l'IGF (l'insuline, l'IGF-1 et l'IGF-2) a démontré sa participation à l'embryogenèse et sa capacité à moduler les différents organes⁷⁰⁶. Les récepteurs fonctionnels d'IGF-I sont

nécessaires pour que la cellule progresse à travers le cycle cellulaire et, par conséquent, seraient liés à l'oncogenèse ⁷⁰⁷. Parmi les actions pléiotropiques de l'IGF-I, les effets anti-apoptotiques et mitogènes ont été rapportés dans le cadre de régénération neurale liées aux CS ⁷⁰⁸⁻⁷¹⁰. L'un des effets paracrines potentiels des CS pourrait être médié par la capacité de régénération du cœur adulte par activation des CEP résidentes. Les cardiomyocytes et les CS cardiaques endogènes expriment des récepteurs à l'IGF-1 et peuvent donc être recrutés par activation du ligand du récepteur concerné. En combinaison avec HGF, l'IGF-1 améliore la survie des CEP cardiaques activées, après leur translocation à partir de niches locales, se traduisant par une réduction de taille de l'infarctus et une amélioration de la fonction ventriculaire ⁷¹¹.

9.7.7. Facteur de croissance transformant (TGF- β) :

La présence de récepteurs du TGF- β ainsi que la capacité à en produire a été démontrée au sein du tissu épithélial, endothélial, hématopoïétique, neuronal et conjonctif ⁷¹². Cette famille de polypeptides est impliquée dans les processus fibrotiques dans de nombreux organes (foie, poumon, rein et cœur), la pathogenèse de l'athérosclérose, le cancer et les télangiectasies hémorragique ⁷¹³. Le TGF- β contribue à l'angiogenèse par son rôle central dans l'embryogenèse ⁷¹⁴ et la croissance tumorale ⁷¹⁵. Des études sur des souris TGF- β knock-out ont rapporté le rôle essentiel de cette cytokine dans la cardio-morphogenèse, avec des anomalies de différenciation valvulaire, des défauts de myocardisation du septum primaire ainsi que des anomalies au niveau de la chambre de chasse ventriculaire gauche ⁷¹⁶. Le TGF- β permettrait également de moduler l'endothélium vasculaire en équilibrant la migration et la prolifération cellulaire ⁷¹⁷. La première preuve d'une activité paracrine cardiaque est venue de modèles cardiaques Langendorff, qui ont rapporté des niveaux élevés de TGF- β comme étant un facteur responsable de l'augmentation du VEGF au niveau ARNm ⁷¹⁸. Par la suite, Li et al. ont démontré le rôle du TGF- β , notamment par le pré conditionnement CD117⁺ des cellules mononucléaires de la MO par TGF avant injection dans l'IAM. Aucune différence de densité capillaire n'a été trouvée entre les cellules mononucléaires non traitées par rapport à celles préconditionnées. Cependant, dans ce groupe, des preuves de renouvellement myocardique récent, une cicatrisation réduite et une amélioration de la FEVG, ont été démontrées par rapport au groupe contrôle ⁷¹⁹.

Chapitre 10 – Manuscrit #4

10.1. Avant-propos au Manuscrit #4

Dans ce dernier article original, le candidat au doctorat en Sciences Biomédicales présente l'effet des ASCs injectés par voie sous-cutané dans un modèle de péritonite chez le murin. A l'aide de ce modèle de recherche expérimentale, nous avons étudié l'infiltration des cellules inflammatoires chez les animaux traités par ASCs monocouches ou sphéroïdes. Nous tentons d'élucider les mécanismes sous-tendant les effets anti-inflammatoires des ASCs. Ce manuscrit est soumis pour publications dans le « *Cell Transplantation (CLL), the Regenerative Medicine Journal* »

Remote delivery of adipose derived stem cells as spheroid bodies versus monolayer to promote anti-inflammatory effect in the setting of peritonitis

Celia Sid-Otmane*, Anthony Nguyen*, Martin G. Sirois, Louis P. Perrault and Hung Q. Ly

*Both authors contributed equally to this manuscript and shared the first authorship

Department of Pharmacology and Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Canada.

Research Centre, Montreal Heart Institute, Université de Montréal, Montreal, Canada.

Corresponding Author: Hung Q. Ly, MD, SM, FRCPC; Montreal Heart Institute; 5000 Belanger Street; Montreal, Quebec H1T 1C8, Canada

Tel: 1-514-376-3330, #2438

Email: qh.ly@umontreal.ca.

Abstract

Background: The therapeutic potential of adipose derived stem cells (ASC) have garnered greater attention due to their pleiotropic effects reported in both preclinical studies and recent clinical trials. The aim of this study was to explore the anti-inflammatory effect of human ASCs injected subcutaneously either as monolayers (ML) or as spheroid bodies (SBs) in a rat model of peritonitis.

Methods: Sprague Dawley rats were injected with Zymosan (500mg/kg) to induce sterile peritoneal inflammation. This was followed by subcutaneous injections of ML or SBs, 5 or 24 hours after the toxin. Histological analysis, neutrophil and macrophage count were used to characterize inflammation and CD31 to determine vascular density whereas quantification of secreted inflammatory factors were analyzed in the exudate.

Results: Immune cells infiltration was diminished in all treated animals. Moreover, neutrophil recruitment was significantly reduced by treatment with lessened tissue infiltration in the 24h-SB group compared to ML. Macrophage presence in the tissue was reduced with SB and ML remote delivery. The inflammatory cell infiltration was dose-dependent on the number of SBs injected. Inflammatory factors and cytokines such as IL-10, IL-6 and TSG-6 in the exudate were higher in untreated animals compared to healthy ones and treatment with ML and SBs reduced their levels. Phenotypically, the SB group treated 24 hours post Zymosan showed the smallest change between sacrifice and initial weights.

Conclusion: Our findings show a significant anti-inflammatory effect of remote, subcutaneous delivery of ML and SBs of hASCs to treat peritonitis, with SB demonstrating greater impact on neutrophil infiltration.

Keywords: Adipose stromal cells, spheroid bodies, inflammation, peritonitis, remote transplantation

Background

Cell-based therapy has been shown to be a novel approach to improve cardiac function and reverse myocardial tissue damage. Ethical concerns associated with embryonic stem cells and safety uncertainties in clinical use of induced pluripotent stem cells have favored mesenchymal stem cells (MSCs) for clinical translation. These multipotent cells have the capacity to self-renew and expand with ease in vitro [1]. While documented in nearly all human tissues, MSCs were first isolated from bone marrow (BM). The intricate procedure to isolate these cells and the poor yield from BM raised interest for other sources. Adipose tissue is an abundant and exploitable niche of adipose derived stromal cells (ASCs). The ease of procurement and their abundance in fat tissue represent great advantages for animal and clinical studies [2, 3]. Their low immunogenicity offers an advantage for allogeneic transplantations without concerns regarding impact of aging or comorbidities on intrinsic properties of MSCs [4]. Moreover, the efficacy of transplantation is severely hindered by the lack of migration and the low rate of engraftment [5]. Therefore, benefits due to transplantation of these cells have been associated to the wide array of cytokines and growth factors composing the ASC secretome [6]. The diversity of bioactive factors of the secretome contribute to these pro-healing pleiotropic effects such as angiogenesis and immunomodulation [7, 8]. Inflammatory and immune responses constitute a formidable system designed to combat infections and tissue injuries [9]. However, excessive or ongoing inflammation contributes to diseases like diabetes, myocardial infarction, cancer or neurodegenerative disease [9]. Hence, there are opportunities to exploit the therapeutic potential of MSCs, as they are stimulated by microenvironment to produce anti-inflammatory factors [10]. Prior studies have compared the immunomodulatory abilities of bone marrow MSCs and ASCs and have documented similar capacities [11, 12]. Conversely, others have attributed a higher anti-inflammatory potency of ASCs [13, 14]. Immunosuppressive properties of ASCs have been demonstrated in kidney transplantation both through factor secretion and cell-to-cell contact with inflammatory cells [15]. Finally, reduced airway inflammation has also been reported using

murine ASCs in an allergic model [16].

Different techniques (whether through genetic manipulations or preconditioning procedures) have been used to enhance the paracrine potential and the survival of ASCs in order to achieve optimal recovery [17]. Various settings can alter paracrine actions of stem cells, aggregating cells in three-dimension culture could be potentially help optimize enrichment of the secretome of stem cells [18]. Studies have documented the formation of spheroid bodies (SB) when MSCs were incubated using the hanging drop technique, a condition that prevents adhesion to planar surface. Anti-inflammatory and angiogenic properties have been documented when MSCs are expanded in 3-D configurations in models of peritonitis or ischemic kidney injury [18-20]. Enriching the secretome would permit to elaborate strategies to deliver ASCs in a non-invasive manner with the intent of maximizing their trophic effects.

The optimal delivery method remains to be determined between systemic infusion into the vascular system or local transplantation. Intravenous injection of MSCs leads to cell trapping in the lung, due to their larger size compared to capillary diameter [21]. Non-invasive administration of MSCs by intramuscular injection has been tested. In a hamster heart failure model, investigators have reported improved ventricular function and increased levels of circulating paracrine factors and stimulated expression of VEGF, IGF and HGF in the myocardium [22].

Thus, the present study explores the trophic effect of hASCs spheroid bodies injected subcutaneously in a rat model of peritonitis. By delivery cells remotely (not locally or near the injury zone), this study will assess the impact of the hASC secretome on wound healing, when expanded in either 3-D or monolayer configuration.

Material and Methods

Cells and Reagents: Human adipose derived stem cells (hASC) were purchased from Invitrogen with the specified medium and supplement, MesenPRO RS. Zymosan A from *Saccharomyces cerevisiae* was from Sigma. Myeloperoxidase MPO antibody (Thermo fisher PA5-16672). TSG-6 antibody A38.1.20 (Santa Cruz biotechnologies sc-65886). Human TSG-6 biotinylated antibody (R&D Systems BAF2104). Rat luminex and ELISA assays were all from R&D systems.

Animals: Male Sprague Dawley rats weighting 300 ± 50 g were purchased from Charles River Laboratories and used under an approved protocol by the Animal Ethics Committee of the Montreal Heart Institute. Animals were used under strict national and institutional guidelines.

Rat Peritonitis: Rats underwent anesthesia with isoflurane 2-3% and received a single intraperitoneal injection of zymosan 500mg/kg at two different sites (left and right) to induce peritoneal inflammation. Buprenorphine (0.03mg/kg) was used for pain control. Treatment with either monolayer cells or SBs was administered via a subcutaneous injection with a 21G needle in the abdominal area either 5- or 24-hours post toxin injection. Three days after zymosan injection, rats were anesthetized with isoflurane and sacrificed with saturated potassium chloride injection in the jugular vein. Peritoneal exudate was collected with cold sterile PBS 1X and five different sections of peritoneal tissue were excised and fixed in 10% phospho-buffered formalin for histopathology.

Hematoxylin & Eosin staining and analysis: Harvested tissue from 5 different areas of the peritoneum was fixed in 10% formalin, embedded in paraffin and cut into 6 μ m thick sections. Slides were stained with hematoxylin & eosin following standard procedures. Inflammation was scored as follow: using light microscope examination, 6 pictures were taken from each area for a total of 30 images per animal were evaluated. The latter method is a modified version of previously published scoring methods [23, 24]. Scores were established to evaluate the propensity of the inflammation based on tissue disorganisation and cell infiltration ranging from

0 to 3.0 was attributed to fields without any cell infiltration and peritoneal thickening and 3 was attributed to severe inflammatory cells infiltration and thickening of peritoneal wall. The evaluation was performed blindly.

Immunohistochemistry: Sections were de-paraffinized with xylene and rehydrated in alcohol baths before antigen retrieval for 30 minutes at 100°C. Slides were then washed in PBS 1X and pre-treated with 3% hydrogen peroxide solution for 20 minutes to block endogenous peroxidase activity. It was followed by incubation in donkey serum for 30 minutes to block non-specific binding before primary antibody incubation for 1 hour at room temperature. Myeloperoxidase (MPO) was used to detect neutrophils, CD68 and CD206 were used to quantify macrophages. CD31 was used to determine vascular density in the peritoneal tissue. After washing off the antibody in PBS 1X, ImmPRESS reagent was put on each section for 30 minutes followed by DAB exposition and counterstaining with Mayer before montage. Slides were observed under light microscope and pictures were taken and analysed with image Pro Plus 9.2 software.

Cell Culture: hASCs were cultivated in flasks in Mesenpro medium supplemented with Mesenpro RS, 100U/ml Penicillin and 100ug/ml streptomycin and 2mM glutamine. Cells were detached with trypsin EDTA when used as monolayers or to produce spheroid bodies.

Spheroid bodies: hASCs between passage 3 and 6 were used to produce SBs through the hanging drop method. Cells were detached from flasks with trypsin EDTA, collected with serum-supplemented media and centrifuged at 450g for 5 minutes. Cells were washed, centrifuged and diluted in Mesenpro medium to produce drops of 35ul containing 100 000 or 200 000 cells. The drops were then deposited on the lid of a petri dish containing PBS solution. After three days, SBs were collected to be injected in rats with PBS as a vehicle.

Immunoenzymatic assays: In the ELISA to detect TSG-6, a costar 96 well plate was coated with TSG-6 antibody at 10 ug/ml overnight at 4°C. Wells were washed with PBS-Tween,

blocked for 45 minutes with 0.5% Bovine serum albumin (BSA) and diluted exudates were incubated in wells for two hours along with recombinant TSG-6 diluted for standard curve on a shaker. After 2 hours, the wells were washed 4 times with PBS-tween 0.1%, and biotin coupled TSG-6 antibody was added to wells and incubated for another 2 hours. Washing was followed with streptavidin HRP incubation for 30 minutes. Wells were washed and incubated with HRP substrate for 15 minutes before stopping the reaction with sulfuric acid 2N and optical density was measured at 465 nm in a plate reader. IL-10 and VEGF were quantified using purchased ELISA kits following the manufacturer protocol.

Luminex assay: IL-6 was quantified using a Luminex assay from R&D systems according to the provided protocol. Briefly, diluted exudates from rats were added to microparticles in a filtered microplate and incubated for 2 hours. A washing step with a vacuum device was followed by an incubation of 1 hour with the biotinylated mix. Wells were washed off, incubated for 30 minutes with streptavidin HRP, followed by substrate reaction and quantification in a bioplex (Bio-Rad).

Statistical analysis

Statistics were performed using GraphPad prism version 8.0c. Results are presented as mean values \pm standard error of the mean (SEM). Parametric comparisons between groups were made using one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett post hoc test for multiple comparisons. Unpaired t test was used when there were only two groups. P value of less than 0.05 was considered significant.

Results

Subcutaneous SBs improved inflammatory cell infiltration

Intraperitoneal injection of Zymosan induced inflammation characterized by inflammatory cell infiltration in the peritoneal tissue and thickening of the peritoneal wall (Fig. 1B). A score was counted in 30 different fields per animal in each group based on inflammatory cell infiltration and thickness of the peritoneal wall. The inflammatory score for rats with no treatment was

significantly higher than that of healthy controls (Fig. 1C; 2.1 ± 0.2 vs 0.18 ± 0.04 respectively $p < 0.0001$). The left panel of figure 1C showed a significant reduction of this score in the groups receiving the treatments 5 hours injection group (1.07 ± 0.16 vs 1.25 ± 0.19 for ML and SB 5h respectively). hASCs transplantation was also found to reduce inflammation when injected 24h post-Zymosan (1.35 ± 0.7 vs 0.85 ± 0.17 for ML and SB 24h respectively in Fig 1C right panel). Peritoneal thickness is another marker of damage to the parietal peritoneum. Inflammation resulted in thickening of the peritoneal wall as demonstrated in Figure 1D. Peritoneal thickening was significantly different between untreated and healthy animals (74.35 ± 4.55 μm and 23.87 ± 1.76 μm respectively; $p < 0.0001$). Treatment with SB impacted peritoneal thickening of the peritoneal wall, albeit with only the SB 24h-group attaining statistical significance in the right panel of figure 1D (74.35 ± 4.55 μm for untreated vs 58.29 ± 4.27 μm for SB 24h $p < 0.05$). Moreover, differences in anti-inflammatory effect was noted when comparing ML and SB groups, whether delivered at 5 or 24h following injury (Fig. 1D; 74.08 ± 7.68 μm for ML 5h vs 53.93 ± 3.35 μm for SB 5h $p < 0.05$ and 77.54 ± 4.92 μm for ML 24h vs 58.29 ± 4.27 μm $p < 0.005$). Thus, SBs were found to be more efficient at reducing thickening of the peritoneum. Phenotypically, animals were compared based on their weight. Healthy rats showed a weight gain with a percentage of change of $5.8\% \pm 1.4$ between the onset and the end of the experiment. Following Zymosan administration, there were notable phenotypic differences as untreated animals demonstrated great weight lost relative to healthy controls. SBs and ML hASCs were either injected 5 hours after toxin injection or 24 hours later. As shown in figure 1E, less weight

loss was documented in the SB 24h group ($-5.9 \pm 0.5\%$; $p < 0.0005$). The ML and SB 5h groups also demonstrated a relatively low percentage of change, which was not statistically significant.

Neutrophil recruitment and further tissue infiltration inhibited by late injection of SBs

Rapid recruitment of neutrophil from the vasculature is essential in the active form of inflammation [25]. To further characterize inflammation in this model, we sought to determine neutrophil recruitment to the peritoneal tissue through myeloperoxidase immunostaining (Fig. 2A). Neutrophil count based on positive myeloperoxidase cells normalized to tissue area was significantly higher in the untreated group compared to healthy rats (Fig. 2B; 0.97 ± 0.15 vs 0.027 ± 0.019 $p < 0.0001$ respectively). Figure 2B shows neutrophil intravascular recruitment, illustrating the response to the inflammation-induced by Zymosan. ML and SBs reduced the presence of neutrophils in the vasculature, whether injected 5 hours or 24 hours post Zymosan injection (0.17 ± 0.06 for ML 5h; 0.34 ± 0.05 for SB 5h; 0.18 ± 0.05 for ML 24h and 0.09 ± 0.02 for SB 24h $p < 0.0001$). With regard to extravascular neutrophils, a significant difference was observed between untreated and control group (0.64 ± 0.1 versus 0.24 ± 0.04 respectively; $p < 0.0005$). Rats treated with ML displayed reduced extravasation of neutrophils as their presence in the tissue was reduced. However, when injected 24 hours after Zymosan, ML failed to reduce extravascular neutrophils unlike the SB 24h group which exhibited a great reduction in tissue neutrophils (Fig. 2C right panel; 0.15 ± 0.03 $p < 0.0001$ vs untreated). There was a remarkable difference between ML 24h and SB 24h (0.39 ± 0.08 vs 0.15 ± 0.03 $p < 0.0001$ respectively). Strictly regarding SBs, there was a stronger effect observed when SBs were administered later than earlier when comparing right and left panel of figure 2C. neutrophil recruitment and extravasation was more significantly reduced by late SB administration, the 24h SB group.

In order to establish if there was any dose dependent effect of hASCs, in this model, and found that reducing the quantity of SBs by half, injecting 5 rather than 10 SBs, increased neutrophil recruitment (Left panel of Fig. 2D; 0.09 ± 0.02 for 10 SBs vs 0.35 ± 0.1 for 5 SBs $p < 0.05$) and neutrophil extravasation (Right panel of Fig 2D; 0.49 ± 0.16 for 5SB versus 0.15 ± 0.03 for 10 SB $p = 0.05$). Hence, increasing SB number had an incremental effect on neutrophils.

Tissue macrophages reduced by hASCs as monolayers and spheroids

We aimed to investigate the presence of macrophages in the peritoneal tissue using CD206, a known marker of macrophages (Fig. 3A). Untreated animals showed enhanced CD206 expression compared to healthy ones (Fig. 3B; 0.01 ± 0.002 vs 0.004 ± 0.0008 $p < 0.0005$ respectively). Administration of ML cells 5 hours after Zymosan significantly reduced macrophages in the peritoneal tissue (Fig. 3B; 0.004 ± 0.0006 $p < 0.005$ vs untreated). SB treatment however did not show any marked effect whether injected 5 or 24 hours post toxin (Fig. 3B; 0.009 ± 0.001 for both). As was seen with neutrophil infiltration, reducing the amount of injected SBs by half increased macrophage presence in the tissue (Fig. 3C; 0.009 ± 0.001 for 10 SBs vs 0.02 ± 0.004 for 5 SBs $p < 0.005$). Macrophage presence in the peritoneal tissue was also described by quantification of CD68, a known marker mostly associated with the pro-inflammatory phenotype (Fig 4A). A significant increase of CD68 was observed in untreated animals compared to control group (Fig 4B $0,0083 \pm 0,0018$ versus $0,00038 \pm 0,00016$ respectively). In the left panel of figure 4B, a reduction of CD68 was shown for ML ($0,0019 \pm 0,00033$) and for SB ($0,0016 \pm 0,00043$). The same impact was induced by the late treatment shown in the right panel as both ML and SBs injected 24h after zymosan reduced CD68 macrophages ($0,0027 \pm 0,00063$ versus $0,0032 \pm 0,001$). In figure 4C, we showed that reducing the amount of SBs injected induced a dose

dependent effect. Injecting 5 SBs increased CD68 in the peritoneal tissue compared to animals receiving 10 SBs.

Subcutaneous administration of SB or ML hASCs increased vascular

We sought to determine if subcutaneous administration of hASCs could increase vascularity in the peritoneal tissue given that pro-angiogenic factors are secreted by these cells. As shown in figure 5A, there is a remarkable difference between control and untreated animals as the presence of vessels in the later is obvious ($0,00086 \pm 0,0002$ for control versus $0,0029 \pm 0,00047$ for untreated). However, treatment with hASC as ML or SBs 5h after toxin injection did not show a significant impact on vascular density (left panel of fig 5B; $0,0036 \pm 0,00031$ versus $0,0035 \pm 0,0011$). The impact on vascular density is more prominent with the 24h treatment regimen shown in the right panel of figure 5B. There is a trend towards increased angiogenesis but not reaching significance for SBs ($0,0046 \pm 0,0007$ for ML 24h and $0,0048 \pm 0,0012$ for SB 24h). Here again, reducing the amount of SBs abolished the pro-angiogenic effect showing once again the dose dependent effect. When comparing early and late administration, we observed a clear trend indicating that 24h post toxin injection of ML and SBs increased vascular density with greater impact than injecting 5h after zymosan.

Inflammatory mediators were reduced by ML and SBs treatment in the peritoneal exudate

We sought to quantify secretion of factors in the peritoneal exudate as another criterion to evaluate inflammation in this model. We first observed that secretion of VEGF was greater in untreated rats compared to healthy ones (Fig. 6A; 928.9 ± 94.99 vs 55.18 ± 6.74 pg/ml $p < 0.005$ respectively) and that treatment initiated 5 hours after Zymosan did not seem to induce

significant changes. ML injection rather provoked an increased VEGF secretion in the peritoneum (Fig. 6A; 1782 ± 364.4). Injection of SBs 24 hours after toxin reduce levels of VEGF, almost to levels comparable to control values (Fig. 6A; 436.2 ± 142 pg/ml). Quantification of IL-10 revealed that untreated group exhibited increased amounts compared to the healthy group (Fig. 6B; 139.7 ± 18.4 vs 6.33 ± 2.04 pg/ml $p < 0.05$ respectively). In the 5 hours-SB injection 5 hours, there was significantly reduced IL-10 in the exudate (Fig. 4A; 73.89 ± 11.65 pg/ml $p < 0.05$ vs untreated). The initiation of treatment 24 hours after Zymosan induced greater effect in both treated groups (63.04 ± 15.84 for ML 24h and 62.29 ± 15.88 for SB 24h). Levels of IL-6 were also increased in untreated animals compared to controls (Fig. 6C; 0.69 ± 0.11 vs 0.01 ± 0.004 pg/ml $p < 0.005$ respectively). Treatment 5 hours post-injury did not induce any significant change although a tendency was seen toward reduction of IL-6 levels. However, the treatment initiated after 24 hours induced a significant effect in SB group (Fig. 6C; 0.18 ± 0.04 vs 0.69 ± 0.11 pg/m for untreated). Another factor measured was TSG-6, a known strong anti-inflammatory factor [26]. Figure 6D demonstrated increased levels of TSG-6 among untreated animals compared to healthy ones (1.32 ± 0.24 vs 0.09 ± 0.02 ng/ml $p < 0.0005$ respectively). In the exudates of treated animals, levels were reduced, showing lower inflammatory status, whether treatment was performed using ML cells or SBs.

Discussion

Adipose tissue is a readily accessible reservoir of multipotent stem cells that can contribute to regenerate, repair and regulate mechanisms to facilitate injured tissue. Adipose derived stem cells can regenerate and repair tissue possibly by direct differentiation and likely through a plethora of secreted factors that participate in immunoregulation and empower other cells to tissue repair [27]. This study's findings extend this hypothesis as we demonstrated an effect of remotely

delivered hASCs on inflammation in a peritonitis model. We explored the therapeutic effect of these cells when expanded under two forms, as monolayer and SBs. To our knowledge, this is the first study demonstrating pro-healing effects of hASCs delivered by subcutaneous route remote from the site of inflammatory stimuli. We demonstrated an effect on neutrophil and macrophage infiltration with a reduction of inflammation-related factors and cytokines in the peritoneum of treated animals. We also documented a trend toward an augmentation of vascular density with late administration of ML and SBs. Prior studies have shown such an effect for hASCs in a spheroid form as well as monolayer form. Comparable benefits have been shown for both forms but SBs seemed more potent in reducing tissue infiltration of neutrophil. This is yet another proof of the trophic effects of these stem cells through their rich secretome. The 2D-monolayer cell culture system lacks the ability to portray the cellular and spatial distribution a natural environment. This method is not adequate to provide a nest-like physiological microenvironment. Conversely, tridimensional SBs overcome such a limitation [28].

Using cellular aggregates free of exogenous biomaterial is advantageous as this overcomes the unwanted reactions that the matrix could elicit. The cell-to-cell contact in a 3-D structure is thought to act as a stimulus and elicit an autocrine activity to produce anti-inflammatory, proangiogenic and antiapoptotic factors. This architecture also allows for better cell survival and engraftment [29].

While the inflammatory cascade is initiated in a protective mechanism, inflammation can cause damages if it does not subside [9]. A conjuncture of phenotype switches of inflammatory cell and secreted molecules ensures resolution of the process. Neutrophils are the dominant leukocytes at the earliest stages of inflammation, recruited to ingest apoptotic cells and clear the microenvironment of any cellular or bacterial debris [25]. Bone marrow MSCs have been shown to inhibit the migration of neutrophils, preventing them from causing oxidative harm [30]. Our

findings document that 3 days after Zymosan injury neutrophils were mainly found within the surrounding vasculature rather than in the tissue itself. Treatment very early on or 24 hours after Zymosan lead to reduced neutrophil recruitment, defined as intravascular neutrophils. Levels of tissue or extravascular neutrophils were reduced as well in response to SBs injected 24 hours post-injury, describing a potent inhibitory effect of the 3-D form. It has been previously reported that graft-versus-host disease can be treated with great success when MSCs were administrated once inflammation was already robust while the therapeutic effect was less vigorous when injected at the same time as the bone marrow transplantation [31, 32]. This aspect is primordial as it portrays the power of the spheroid bodies of hASCs to reverse activated innate immune cells.

In the resolution phase of inflammation, neutrophils undergo apoptosis and are rapidly ingested by macrophages and cleared through draining lymph nodes. We showed in this study a significant effect of the remote transplantation of either ML or SBs on CD68 macrophages with a notable diminution, whether injected 5h or 24h after zymosan. CD206, also called the mannose receptor, is another marker expressed on macrophages thought to be important in late stages of repair [33]. CD206 expression was highly reduced in tissue from SB 24h group but not as much as ML 5h group. The latter showed reduced tissue neutrophils and consequently reduced macrophages. We hypothesize that the ML injection very early on rapidly blocked neutrophil infiltration compared to SB. This would be related to the ability for ML cells to travel and diffuse into the circulation, inhibiting neutrophil extravasation through both secreted factors and direct contact regulation. The effect was totally lost when ML were injected 24 hours after toxin administration, illustrating the inability of this 2-D form to reverse the process compared to SBs. This result is a bit discordant with literature as CD206 macrophages are thought to be pro-healing, hence expected to be increased by stem cell administration. However, literature showing increased CD206 after MSC or ASC administration quantify these macrophages early on after

cell transplantation, in the 24 hour window rather than 72 hours. This inflammatory model was induced by only one injection of zymosan, creating a transient acute inflammatory process rather than a chronic one induced with repetitive administration of toxin. Zymosan induces an acute inflammation that is self resolving in a period of days [34]. Moreover, documenting an increased vascular density in the peritoneal tissue on the third day after toxin injection indicated an advanced healing process already installed as a significant difference was observed between control and untreated animals.

We also observed reduced amounts of secreted cytokines IL-6 and IL-10 as well as reduced VEGF and TSG-6 in the exudate of treated animals, particularly for the 24-hour treatment group. This is considered a hallmark of attenuated inflammatory stress. Secretion of these factors is dependent on activation of different immune cells. Macrophages expressing CD206 release great amounts of IL-10 and VEGF in order to fulfill their reparative role. The reduced levels of these factors in peritoneal exudates of treated animals are related to improved healing and reduced CD206 macrophages too.

Once delivered, we can presume that SBs will respond to endogenous signals in order to secrete the required amount of factors to help resolve inflammation. The beneficial outcomes arise from the crosstalk between tissue or host cells and transplanted cells [29]. The anti-inflammatory effect of stromal stem cells is responsive rather than constitutive. The latter cells can adapt their secreted factors in response to signals from the microenvironment. Mechanisms underlying the anti-inflammatory effect of ASCs can include either cell migration or the immunomodulation of cells. There is no consensus about the superiority of the immunomodulatory effect of ASCs over bone marrow MSCs. It was shown initially that both cell populations expressed the same immune related markers and exhibited similar immunosuppressive properties, but recent data have attributed greater impact of ASCs.

Investigators described more inhibitory effect of ASCs on differentiation of monocytes into dendritic cells, and greater stimulatory effect on secretion of IL-10 [14]. In vitro experiments showed higher proangiogenic activity of hASCs compared to hBM-MSCs [35]. Prior data have reported the impact of ASCs on inflammation. Using a mouse model of bleomycin-induced lung injury, intravenous injection of ASCs accumulated in the lung interstitium and inhibited proinflammatory cytokine production by macrophages such as TNF α and IL-12 [36]. In addition, hASCs improved colitis injury through release of TSG-6 which resulted in macrophage polarization toward anti-inflammatory status [37]. Finally, immunomodulatory effects have also been attributed to ASCs in a murine model of autoimmune encephalomyelitis. Semon and collaborators showed reduced inflammatory infiltrates and serum levels of IFN- γ and IL-12 with intraperitoneal injection of ASCs [38].

Different routes of delivery have been used over the past decade for stem cell therapy; whether using localized or systemic transplantation. In murine model of myocardial injury, i.v. injection accumulates MSCs in the lungs because of their large size, preventing them from passing through the pulmonary circulation. Entrapped cells in the lungs secreted enough mediators to improve myocardial function and decrease scarring in a myocardial infarction mouse model [21]. Intraperitoneally injected MSCs to rats that underwent peritoneal scraping failed to reduce peritoneal adhesion compared to a marked effect of intravenously injected cells. MSCs were phagocytosed by macrophages not long after their injection in the peritoneum while i.v. injection produced emboli of cells in the lung before being traced in the spleen and liver [24]. However, another study rather demonstrated the successful reduced damage of intraperitoneal injection of MSCs following corneal injury without evidence of cell engraftment [39]. Both studies demonstrated secretion of TSG-6 by MSCs.

Subcutaneous injection delivers into the interstitial space below the dermis.

Understanding of the mechanisms underlying subcutaneous absorption is limited despite the wide application of this method [40]. Prior studies have reported on the subcutaneous administration of MSCs within or in proximity to injury to promote local tissue repair [41, 42]. However, studies exploring the impact of this non-invasive route of administration on systemic injuries are limited. In a murine model of cardiac ischemia-reperfusion injury, subcutaneous transplantation of ASCs reduced infarct size and improved cardiac function. The luciferase labeled ASCs failed to migrate and engrafted at the site of injection with little proliferation. The investigators sought to uncover putative mediators responsible for this cardioprotective phenomenon and found elevated plasma levels of pentraxin 3 and to a lesser extent TSG-6 in ASCs transplanted mice [43]. Another non-invasive, remote potential strategy that has been explored is the intramuscular injection of cell therapy. This route of delivery was used to locally inject human cord blood derived stem cells in a rat model of dilated cardiomyopathy. This led to improved cardiac function and increased levels of circulating HGF and VEGF despite remote cell injection [44]. Shabbir and colleagues have also administered MSCs into the hind limb skeletal muscle of a heart failure hamster model and observed improved ventricular function. The investigators suggested a possible crosstalk between transplanted MSCs and bone marrow progenitor cells but mechanisms and involved factors remain ill-defined [22]. Therefore, the potential therapeutic strategy of such models centers on an endocrine mechanism to promote tissue healing and repair. In our model, we speculate that SBs transiently engraft on within the dermis and secrete mediators depending on the level of exposure to pro-inflammatory cytokines. An immunosuppressive phenotype will be adopted by SBs resulting in dampening of inflammation to promote tissue homeostasis. Endocrine activity likely explains the therapeutic functions of ASCs and how they act on injured

tissue despite remote delivery. This allows for the elaboration of further therapeutic strategies using non-invasive delivery methods better suited for clinical applicability.

Finally, our studies present some key limitations to this study. The experimental design should be viewed as a proof of concept as we tried to explore the effect of remote hASC delivery on inflammation-induced tissue injury. We did not investigate any mechanistic pathways leading to the reduced neutrophil and macrophage infiltration. Investigation into the biodistribution of the transplanted cells is also needed. Translational research using large animal models of inflammation injury are needed to better validate this potential therapeutic use of cells and their endocrine pro-healing mechanisms. In summary, this study ascribed a strong endocrine effect to hASCs as they were shown to elicit anti-inflammatory effects, when delivered remotely from the site of injury.

LIST OF ABBREVIATIONS

hASC: human adipose derived stem cells

BM-MSC: bone marrow derived mesenchymal stem cells

ML: monolayer

SB: spheroid bodies

VEGF: vascular endothelial growth factor

IL-10/6: Interleukin 10/6

DECLARATIONS

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and material

All data generated by this study are included in the published article.

Competing interests

All authors declare that they have no competing interests.

Funding

This work was supported by the Montreal Heart Institute Foundation, the ThéCell Network (FRQS), Chaire DesGroseillers-Bérard en Cardiologie Interventionnelle and Chaire Fondation Marcel et Jean Coutu de traitements chirurgicaux novateurs en insuffisance cardiaque from Université de Montréal.

Authors' contributions

CSO contributed to design the project, carried out the experiments, analyzed data and wrote the manuscript. AN contributed to experiment design. MGS advised on histopathology. LPP contributed to study design and funding. HQL contributed to study design, revision of manuscript and funding.

All authors have reviewed and approved the final version of the manuscript.

References

1. Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther.* 2008;15:109-116.
2. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res.* 2007;100:1249-1260.
3. Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell.* 2012;10:709-716.
4. Dimmeler S, Leri A. Aging and disease as modifiers of efficacy of cell therapy. *Circ Res.* 2008;102:1319-1330.
5. Gneccchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res.* 2008;103:1204-1219.
6. Zuk P. Adipose-Derived Stem Cells in Tissue Regeneration: A Review. *ISRN Stem Cells.* 2013;2013:1-35.
7. Hao C, Shintani S, Shimizu Y, Kondo K, Ishii M, Wu H, Murohara T. Therapeutic angiogenesis by autologous adipose-derived regenerative cells: comparison with bone marrow mononuclear cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014;307:H869-879.
8. Girdlestone J. Mesenchymal stromal cells with enhanced therapeutic properties. *Immunotherapy.* 2016;8:1405-1416.
9. Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation. *Cell.* 2010;140:871-882.
10. Prockop DJ, Oh JY. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Mol Ther.* 2012;20:14-20.
11. Valencia J, Blanco B, Yanez R, Vazquez M, Herrero Sanchez C, Fernandez-Garcia M, Rodriguez Serrano C, Pescador D, Blanco JF, Hernando-Rodriguez M *et al.* Comparative analysis of the immunomodulatory capacities of human bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells from the same donor. *Cytotherapy.* 2016;18:1297-1311.
12. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, Taureau C, Cousin B, Abbal M, Laharrague P *et al.* Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol.* 2005;129:118-129.

13. Melief SM, Zwaginga JJ, Fibbe WE, Roelofs H. Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts. *Stem Cells Transl Med.* 2013;2:455-463.
14. Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Dimitrov R, Bukarev D, Kyurkchiev S, Tivchev P, Altunkova I, Kyurkchiev DS. Adipose tissue-derived cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunol Lett.* 2009;126:37-42.
15. Kato T, Okumi M, Tanemura M, Yazawa K, Kakuta Y, Yamanaka K, Tsutahara K, Doki Y, Mori M, Takahara S *et al.* Adipose tissue-derived stem cells suppress acute cellular rejection by TSG-6 and CD44 interaction in rat kidney transplantation. *Transplantation.* 2014;98:277-284.
16. Cho KS, Roh HJ. Immunomodulatory effects of adipose-derived stem cells in airway allergic diseases. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2010;5:111-115.
17. Williams AR, Hare JM. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res.* 2011;109:923-940.
18. Bartosh TJ, Ylostalo JH, Mohammadipoor A, Bazhanov N, Coble K, Claypool K, Lee RH, Choi H, Prockop DJ. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:13724-13729.
19. Zhao X, Qiu X, Zhang Y, Zhang S, Gu X, Guo H. Three-Dimensional Aggregates Enhance the Therapeutic Effects of Adipose Mesenchymal Stem Cells for Ischemia-Reperfusion Induced Kidney Injury in Rats. *Stem Cells Int.* 2016;2016:9062638.
20. Ylostalo JH, Bartosh TJ, Tiblow A, Prockop DJ. Unique characteristics of human mesenchymal stromal/progenitor cells pre-activated in 3-dimensional cultures under different conditions. *Cytotherapy.* 2014;16:1486-1500.
21. Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, Semprun-Prieto L, Delafontaine P, Prockop DJ. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell.* 2009;5:54-63.
22. Shabbir A, Zisa D, Suzuki G, Lee T. Heart failure therapy mediated by the trophic activities of bone marrow mesenchymal stem cells: a noninvasive therapeutic regimen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;296:H1888-1897.
23. Dinarvand P, Hassanian SM, Weiler H, Rezaie AR. Intraperitoneal administration of activated protein C prevents postsurgical adhesion band formation. *Blood.* 2015;125:1339-1348.

24. Wang N, Li Q, Zhang L, Lin H, Hu J, Li D, Shi S, Cui S, Zhou J, Ji J *et al*. Mesenchymal stem cells attenuate peritoneal injury through secretion of TSG-6. *PLoS One*. 2012;7:e43768.
25. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:159-175.
26. Lee RH, Yu JM, Foskett AM, Peltier G, Reneau JC, Bazhanov N, Oh JY, Prockop DJ. TSG-6 as a biomarker to predict efficacy of human mesenchymal stem/progenitor cells (hMSCs) in modulating sterile inflammation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111:16766-16771.
27. Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol*. 2014;15:1009-1016.
28. Fennema E, Rivron N, Rouwkema J, van Blitterswijk C, de Boer J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends Biotechnol*. 2013;31:108-115.
29. Ylostalo JH, Bartosh TJ, Coble K, Prockop DJ. Human mesenchymal stem/stromal cells cultured as spheroids are self-activated to produce prostaglandin E2 that directs stimulated macrophages into an anti-inflammatory phenotype. *Stem Cells*. 2012;30:2283-2296.
30. Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, Robey PG, Leelahavanichkul K, Koller BH, Brown JM *et al*. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med*. 2009;15:42-49.
31. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, Zhao RC, Shi Y. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*. 2008;2:141-150.
32. Sudres M, Norol F, Trenado A, Gregoire S, Charlotte F, Levacher B, Lataillade JJ, Bourin P, Holy X, Vernant JP *et al*. Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice. *J Immunol*. 2006;176:7761-7767.
33. Koh TJ, DiPietro LA. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Rev Mol Med*. 2011;13:e23.
34. Cash JL, White GE, Greaves DR. Chapter 17. Zymosan-induced peritonitis as a simple experimental system for the study of inflammation. *Methods Enzymol*. 2009;461:379-396.

35. Hsiao ST, Asgari A, Lokmic Z, Sinclair R, Dusting GJ, Lim SY, Dilley RJ. Comparative analysis of paracrine factor expression in human adult mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose, and dermal tissue. *Stem Cells Dev.* 2012;21:2189-2203.
36. Kotani T, Masutani R, Suzuka T, Oda K, Makino S, Ii M. Anti-inflammatory and anti-fibrotic effects of intravenous adipose-derived stem cell transplantation in a mouse model of bleomycin-induced interstitial pneumonia. *Sci Rep.* 2017;7:14608.
37. Song W-J, Li Q, Ryu M-O, Ahn J-O, Ha Bhang D, Chan Jung Y, Youn H-Y. TSG-6 Secreted by Human Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorates DSS-induced colitis by Inducing M2 Macrophage Polarization in Mice. *Scientific Reports.* 2017;7.
38. Semon JA, Maness C, Zhang X, Sharkey SA, Beuttler MM, Shah FS, Pandey AC, Gimble M, Zhang S, Scruggs BA *et al.* Comparison of human adult stem cells from adipose tissue and bone marrow in the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem Cell Res Ther.* 2014;5:2.
39. Oh JY, Kim MK, Shin MS, Lee HJ, Ko JH, Wee WR, Lee JH. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. *Stem Cells.* 2008;26:1047-1055.
40. Wang W, Chen N, Shen X, Cunningham P, Fauty S, Michel K, Wang B, Hong X, Adreani C, Nunes CN *et al.* Lymphatic transport and catabolism of therapeutic proteins after subcutaneous administration to rats and dogs. *Drug Metab Dispos.* 2012;40:952-962.
41. Qi Y, Jiang D, Sindrilaru A, Stegemann A, Schatz S, Treiber N, Rojewski M, Schrezenmeier H, Vander Beken S, Wlaschek M *et al.* TSG-6 released from intradermally injected mesenchymal stem cells accelerates wound healing and reduces tissue fibrosis in murine full-thickness skin wounds. *J Invest Dermatol.* 2014;134:526-537.
42. Falanga V, Iwamoto S, Chartier M, Yufit T, Butmarc J, Koultab N, Shroyer D, Carson P. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. *Tissue Eng.* 2007;13:1299-1312.
43. Preda MB, Ronningen T, Burlacu A, Simionescu M, Moskaug JO, Valen G. Remote transplantation of mesenchymal stem cells protects the heart against ischemia-reperfusion injury. *Stem Cells.* 2014;32:2123-2134.
44. Mao C, Hou X, Wang B, Chi J, Jiang Y, Zhang C, Li Z. Intramuscular injection of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells improves cardiac function in dilated cardiomyopathy rats. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8:18.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Phenotypical and histological evaluation of Zymosan-induced peritonitis (500mg/kg) and the impact of subcutaneous injection of monolayer (ML) or spheroid bodies (SB) of human adipose stromal cells (hASCs). (A) Representative images of monolayer ML and spheroid bodies SB (B) Representative images of peritoneal tissue stained with Hematoxylin & Eosin 3 days after zymosan injection, original magnification x200. (Scale bar, 50 um). (C) Inflammation scores from 30 fields per animal in each group based on a modified scoring method [24] described above. ** $p < 0.005$ vs Untreated *** $p < 0.0005$ vs Untreated. (D) Peritoneal thickness evaluate from 30 different fields per animal in each group. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0001$. n=7-9 animals / group (E) Percentage of change of the weight of rats in each group between the beginning before toxin injection and sacrifice, 3 days after, demonstrating a systemic effect induced by the inflammation and the therapeutic strategy.

Figure 2: Subcutaneous Injections of ML and SB of hASCs reduce inflammation by decreasing neutrophil recruitment to peritoneal tissue. (A) Representative images of immunohistochemistry against myeloperoxidase (MPO) in peritoneal sections. Original magnification x200. (Scale bar, 100 um). Black arrows indicate vascular neutrophils and asterix indicate infiltrated tissue neutrophils (extravascular). (B) Intravascular neutrophil normalized to tissue area. (C) Neutrophil infiltration in peritoneal tissue normalized to tissue area. (D) Comparison of neutrophil infiltration in peritoneal tissue in response to reduced quantity of SBs, 5 SBs versus 10. n=4

animals/group.

Figure 3: CD206 positive macrophage presence in peritoneal tissue after Zymosan injection.

(A) Representative images of immunochemistry against CD206. Original magnification x200. (Scale bar, 100 μ m). (B) CD206 expression normalized to tissue area. (C) Comparison of CD206 expression normalized to tissue area in response to reduced quantity (5 SBs vs 10 SBs) or (D) * p <0.05; ** p <0.005; *** p <0.0005. n=4 animals /group.

Figure 4: CD68 positive macrophage presence in peritoneal tissue after zymosan injection.

(A) Representative images of immunohistochemistry against CD68. Original magnification x200. (B) CD68 expression normalized to tissue area. (C) CD68 expression in peritoneal tissue comparing SBs versus 10 SBs. n=4 animals per group.

Figure 5: CD31 quantification to evaluate vascular density in peritoneal tissue after zymosan

injection. (A) Representative images of immunohistochemistry against CD31. Original magnification x200. (B) CD31 expression in peritoneal tissue normalized to total area. (C) CD31 expression in response to reduced SBs, comparing 5 SBs to 10 SBs. n=4 per group.

Figure 6: Quantification of secreted factors and cytokines in exudates of animals at sacrifice (A) VEGF, (B) IL-10, (C) IL-6 and (D) TSG-6. * p <0.05; ** p <0.005; *** p <0.0005.

Figure 1 :

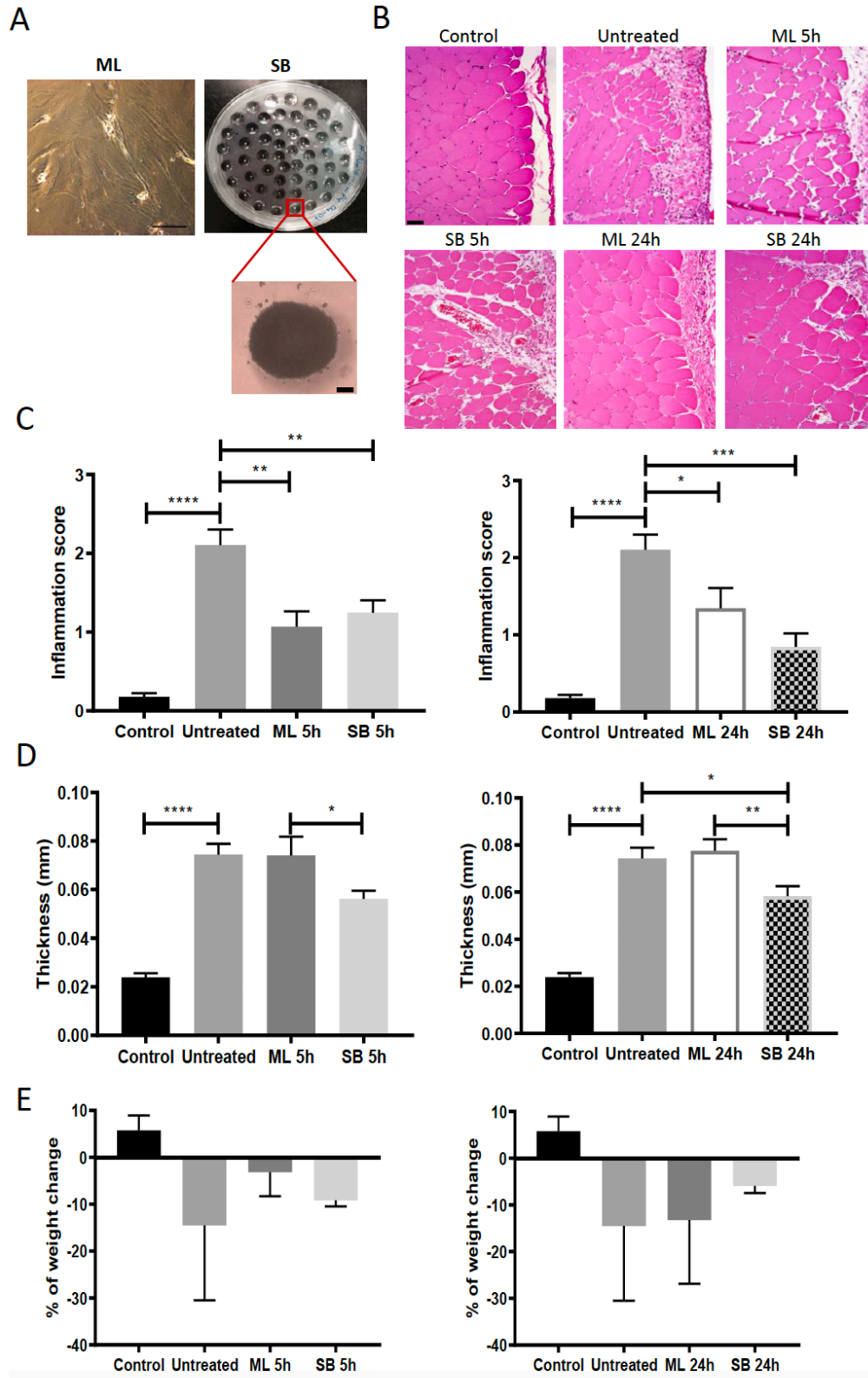


Figure 2 :

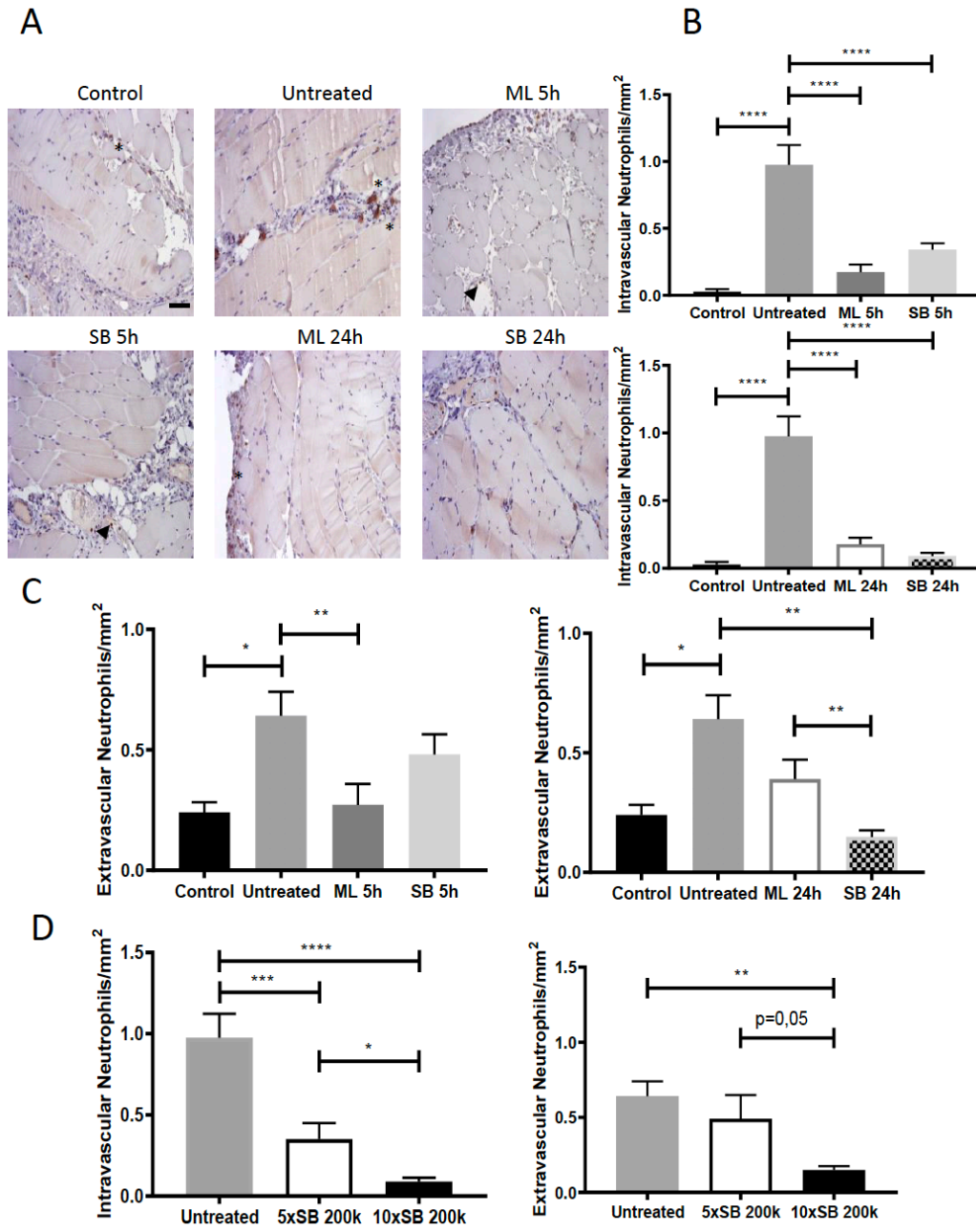


Figure 3 :

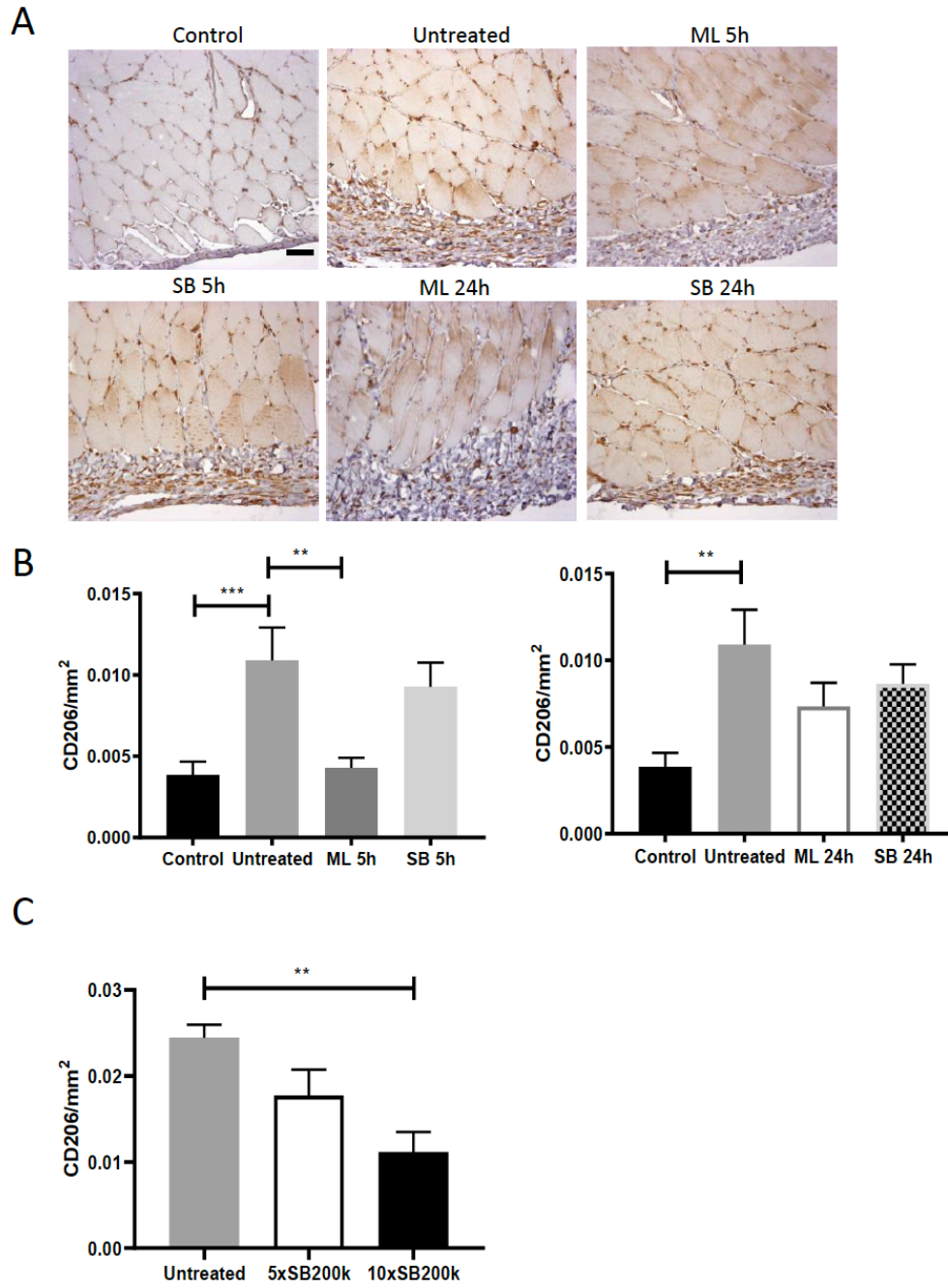


Figure 4 :

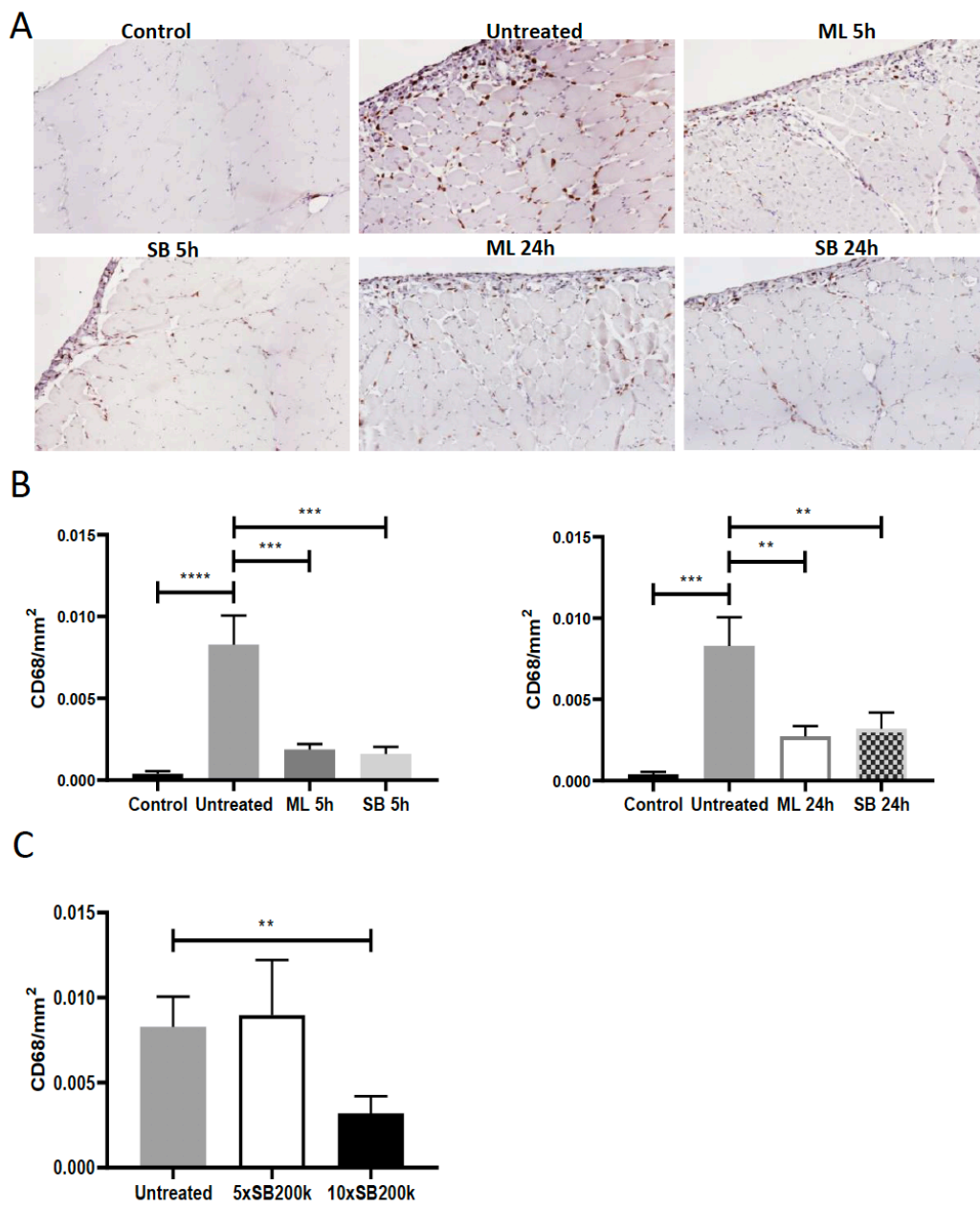


Figure 5 :

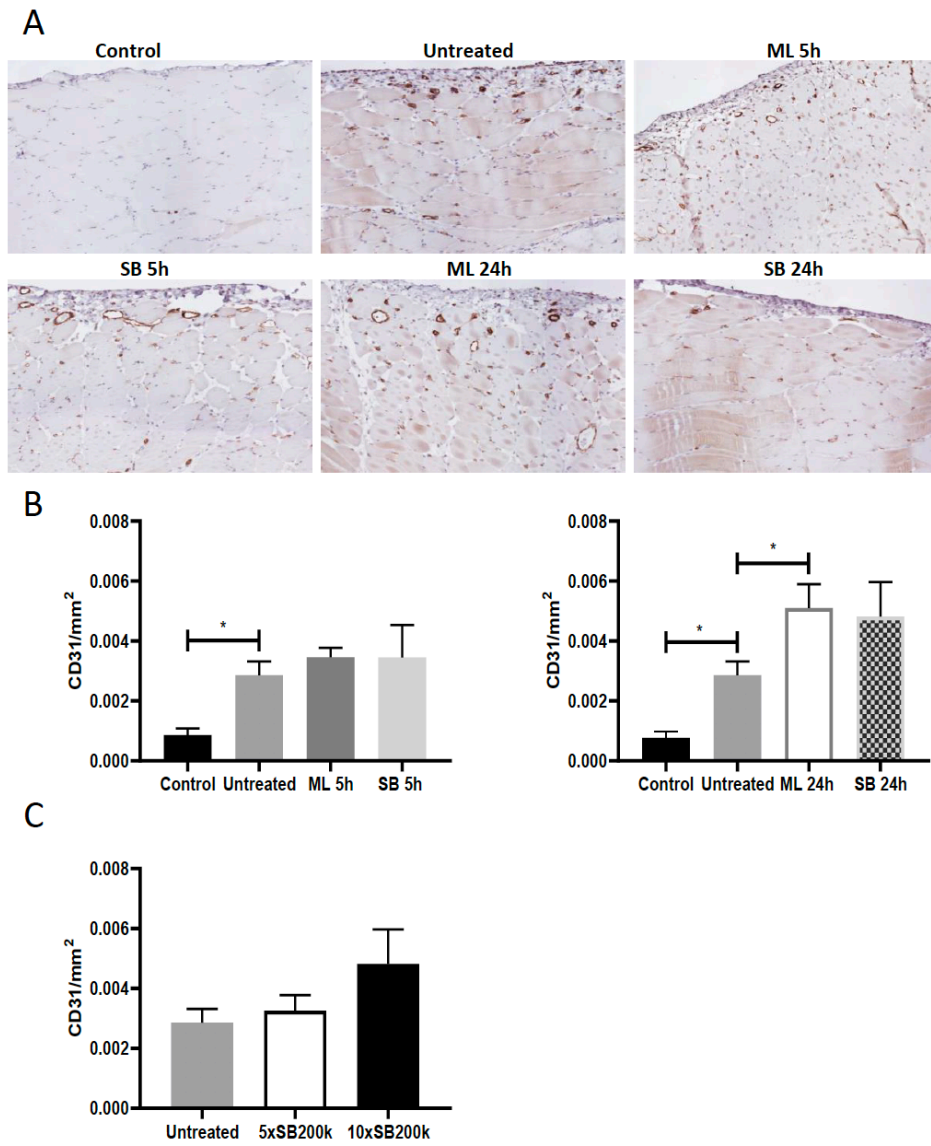
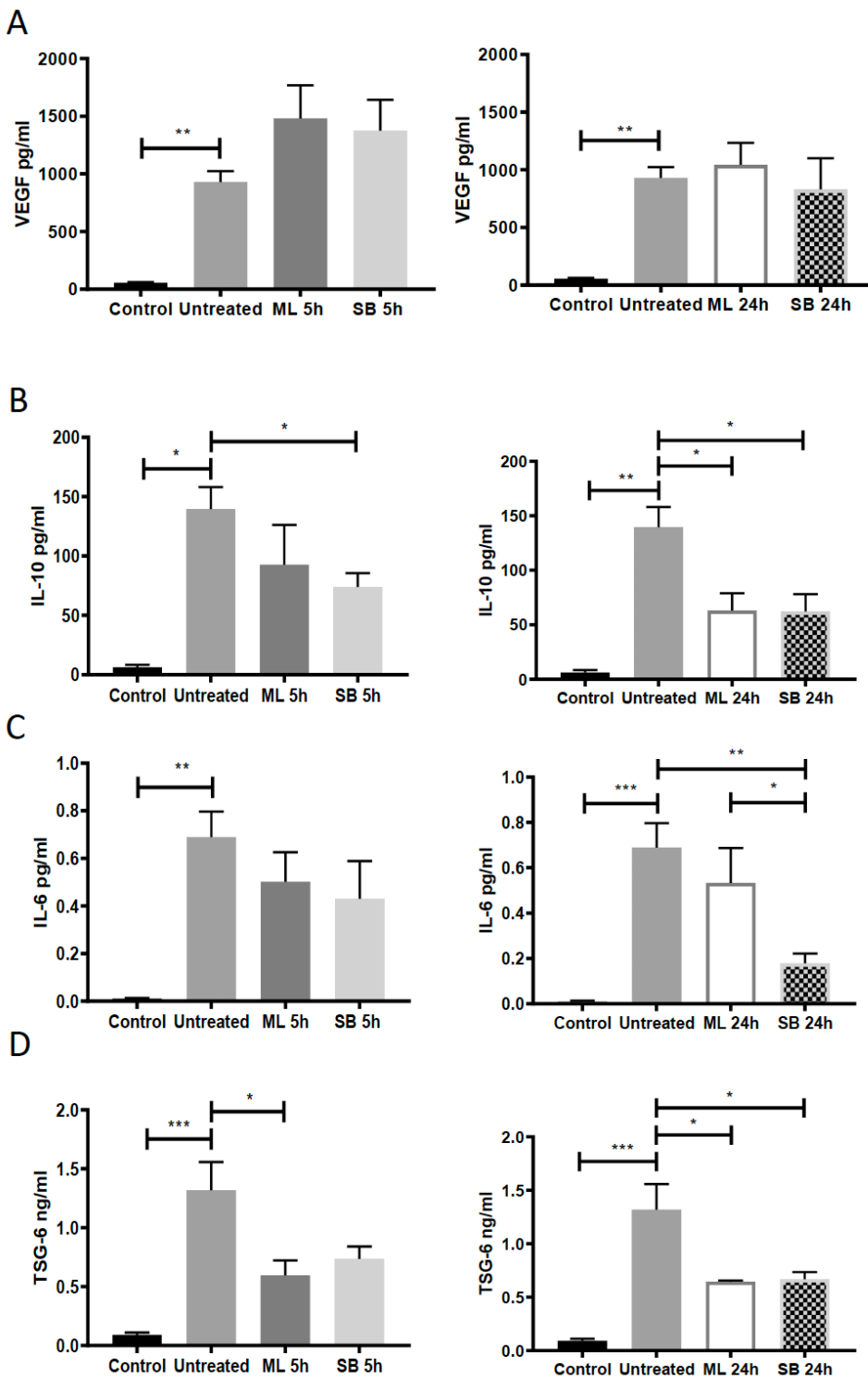


Figure 6 :



Chapitre 11 – Discussion

La prévalence de l'IC demeure très élevée dans le monde : selon la société européenne de cardiologie, elle atteindrait 1 à 2% dans les pays développés. La Fédération Française de Cardiologie évalue à plus d'un million de personnes touchées dans l'Hexagone. Chaque année, on recense près de 70.000 décès liés à l'IC et plus de 150.000 hospitalisations en liens avec l'ampleur du phénomène. En Amérique du Nord, plus de 400.000 Canadiens sont atteints chaque année d'IC. Par ailleurs, le vieillissement de la population et l'explosion des facteurs de risques cardio-vasculaires laissent à penser que l'impact de l'IC serait encore plus important dans le futur.

L'IC correspond à un état où le cœur n'est plus capable d'assurer son rôle de pompe et donc d'alimenter correctement l'organisme en sang. Ce déséquilibre chronique complexe peut affecter le ventricule gauche ou droit. On parle d'IC chronique quand l'ensemble du myocarde est affecté. L'efficacité de nouveaux axes de traitement comme la thérapie cellulaire ou la transplantation à très long terme demeurent obscures.

Tout au long de cette thèse, nous avons pu montrer que 1) les excellents résultats observés chez les patients greffés à très long terme (plus de 20 ans) sont difficiles à reproduire dans le contexte actuel; 2) le cœur artificiel total Syncardia permet d'amener des patients en IC terminale à la transplantation cardiaque; 3) la thérapie cellulaire par ASCs a permis de limiter l'évolution de la MCG après transplantation dans un modèle expérimental; et enfin 4) la diffusion des ASCs par voie sous-cutanée présente un effet modulateur efficace sur le stimulus inflammatoire dans un modèle murin de péritonite.

Résumé et originalité de la thèse

Dans le Chapitre 1, nous avons revu la définition, l'étiologie et l'impact clinique de l'IC ainsi que les limitations des traitements actuels. Nous avons introduit certaines définitions et mécanismes physiologiques importants afin de mieux cerner cette pathologie chronique. Malgré l'évolution des techniques chirurgicales de réparation ou de remplacement, la transplantation cardiaque demeure le traitement de choix de cette population à risque. Peu d'auteurs se sont penchés sur l'évolution de ces patients greffés à très long terme.

Dans le **manuscrit #1** (Chapitre 2), nous avons analysé dans un groupe de 156 patients consécutifs greffés cardiaques, l'évolution à très long terme (>20 ans ou plus) (**groupe 1**) en comparaison aux patients décédés moins de 20 ans après l'intervention (**groupe 2**) entre 1983 et 1995 à l'ICM. Dans ce manuscrit, afin de pouvoir comparer les caractéristiques des patients aux résultats de l'ère actuelle, nous avons évalué l'expérience récente sur 5 ans à l'ICM (**groupe 3** : patients transplantés entre 2010 et 2015), en se focalisant sur les différences de caractéristiques des donneurs et receveurs.

Le **groupe 1** (n = 46, 30 %) incluait des patients plus jeunes (38 ± 11 ans c. 48 ± 8 ans, $p = 0,001$), une proportion plus élevée de femmes (28 % c. 8 %, $p = 0,001$) et la prévalence de maladie cardiaque ischémique y était moindre (42 % c. 65 %, $p = 0,001$) comparativement au **groupe 2** (n = 110, 70 %). Les patients du **groupe 3** (n = 54) étaient plus âgés (52 ± 12 ans c. 38 ± 11 ans, $p = 0,001$), plus malades (taux d'hospitalisation au moment de la transplantation 48 % c. 20 %, $p = 0,001$) et ont reçu le cœur de donneurs plus âgés (42 ± 15 ans c. 29 ± 11 ans, $p = 0,001$) que ceux du groupe 1.

Une survie à très long terme (≥ 20 ans) a été observée chez 30 % des patients ayant reçu leur greffe au cours de la première décennie de notre expérience. Ce résultat sera difficile à reproduire de nos jours étant donné que notre population actuelle est constituée de receveurs plus âgés et avec plus de facteurs de risques cardio-vasculaires, qui reçoivent le cœur de donneurs plus âgés. Ce travail permet d'observer les limites de la transplantation cardiaque chez cette population de patients plus lourds, avec plus de comorbidités dans un contexte de limitation du nombre de donneurs. Cette constatation fait office d'introduction pour les chapitres suivants, qui s'intéressent aux alternatives de traitements de cette population à haut risque, y compris l'assistance mécanique de longue durée et l'émergence de la thérapie cellulaire.

Afin de mieux comprendre les résultats liés à l'assistance de longue durée en cas d'insuffisance cardiaque bi-ventriculaire (classe INTERMACS 1 ou 2), nous avons proposé dans le Chapitre 3, une revue approfondie des différents dispositifs d'assistance mécanique de longue durée en réponse à la pénurie de greffons mondiale.

Ces deux systèmes d'assistance (BiVAD vs Syncardia Cœur Artificiel Total), bien que traitant la même population, conservent des différences majeures en terme de prise en charge. Nous nous sommes intéressés au devenir des patients insuffisants cardiaques bi-ventriculaires traités dans une même région parisienne (Paris, Créteil, France), par ces deux types de supports mécaniques. Un des messages principaux de ce chapitre est que le type de dispositif utilisé n'influence pas la survie post-transplantation. Ces différences de stratégies entre deux hôpitaux (La Pitié-Salpêtrière, Paris et Mondor, Créteil) d'une même région conduisent *in fine* à une survie similaire. L'implantation du CAT ou BiVAD comme pont à la transplantation chez les patients en IC terminale pour lesquels un traitement inotrope optimal a échoué, présentait une survie post transplantation d'environ 75% à 1 an. Ainsi, le choix du support mécanique n'influence ni la survie sous assistance ni après transplantation. Seul un taux extrêmement faible de complications neurologiques dans le groupe CAT par rapport au groupe BiVAD a pu être mis en exergue.

Dans le **manuscrit #2** (Chapitre 4), nous avons analysé l'évolution des patients ayant bénéficié du CAT dans une analyse rétrospective de données récoltées prospectivement de 2004 à 2016 à l'ICM. L'utilisation de ce dispositif d'assistance s'adresse aux patients en IC biventriculaire critique, dont la canulation de l'apex est contre-indiquée, ou pour des raisons anatomiques (ex : pathologies congénitales). Nous avons revu notre expérience avec le CAT à l'heure de l'émergence des pompes à flux axial. Dans ce manuscrit, 13 patients (12 hommes, âge moyen 45 ± 13 ans) ont reçu le CAT pour un choc cardiogénique réfractaire dû à une cardiomyopathie idiopathique (50 %), ischémique (17 %) ou lié à d'autres causes (33 %). Avant l'implantation, la fraction d'éjection était en moyenne de $14 \% \pm 4 \%$, 7 patients (54 %) avaient déjà subi une chirurgie cardiaque, 4 (31 %) étaient sous ventilation mécanique et 3 (23 %) étaient dialysés. La durée médiane du support par CAT a été de 46 ± 40 jours. Trois patients (23 %) sont décédés malgré l'implantation du dispositif après une moyenne d'utilisation de 15 jours. La survie actuarielle pendant l'utilisation du dispositif a été de $77 \% \pm 12 \%$ 30 jours suivant l'implantation. Les complications ont inclus l'accident vasculaire cérébral (n = 1, 8 %), le syndrome de détresse respiratoire aigüe nécessitant une intubation prolongée (n = 5, 38 %) et

l'insuffisance rénale aiguë nécessitant une dialyse temporaire ($n = 5, 38 \%$). Dix patients (77%) ont survécu jusqu'à leur greffe après une moyenne d'utilisation de 52 ± 42 jours. Les taux de survie actuarielle après la greffe ont été de $67 \% \pm 16 \%$ après 1 mois et de $56 \% \pm 17 \%$ après 1 an suivant la greffe. Cette étude décrit de façon rigoureuse l'évolution à long terme des patients ayant bénéficié du CAT à l'ICM. Ce travail permet également d'observer que cette solution de rechange s'accompagne d'une incidence faible de complications neurologiques chez des patients extrêmement fragiles et complexes en attente de greffe cardiaque. Le CAT permet d'offrir une option valide aux patients en IC biventriculaire irréversible ou aux conditions anatomiques particulières. Cette étude a permis de mettre en lumière les limites de traitement des patients en IC. Elle fait office d'introduction pour les chapitres suivants s'intéressant au devenir des patients transplantés, et notamment la survenue d'une des causes de rejet principal à 1 an : la vasculopathie coronaire du greffon.

Dans le Chapitre 5, nous avons introduit la physiopathologie de la maladie coronaire du greffon (MCG) et investigué les différentes hypothèses qui sous-tendent son apparition. La MCG est la première cause de dysfonction chronique du greffon après TC. Nous avons décrit dans ce chapitre les différences entre la MCG et l'athérosclérose coronaire. Les rejets aigus et l'allo-immunisation chronique associés aux troubles métaboliques iatrogènes favoriseraient le remodelage obstructif des vaisseaux coronaires, ainsi que d'autres facteurs lésionnels indépendants comme la mort encéphalique, l'âge du donneur, le phénomène d'ischémie-reperfusion ou l'infection à CMV. Nous avons insisté sur la nécessité d'un dépistage précoce de cette complication silencieuse afin de prévenir les complications de l'ischémie myocardique chronique. Les explorations non invasives (USIV) sont une alternative sensible pour le suivi des lésions coronaires après TC. Cependant, aucun traitement ne permet d'inverser durablement à l'heure actuelle l'évolution de la MCG. Tant le traitement médical (inhibiteurs mTOR, anti rétroviraux...) que le traitement chirurgical (lésions coronaires diffuses difficilement accessibles à une revascularisation myocardique) ont montré leurs limitations face à l'évolution de la MCG. Les inhibiteurs des signaux de prolifération sont recommandés en cas de MCG angiographiquement significative. L'immunomodulation adaptée au profil génétique et l'apparition de thérapies cellulaires pourraient améliorer le pronostic à long terme des transplantés. Ces constatations nous servent d'introduction aux chapitres suivants qui se

focalisent sur la thérapie cellulaire comme nouvelle option de traitement chez les patients transplantés.

Afin de mieux appréhender les mécanismes sous-tendant l'application de la thérapie cellulaire lors d'événement cardiaque ischémique, nous avons revu de façon exhaustive l'impact clinique de l'IDM et les limitations thérapeutiques actuelles au sein du Chapitre 6. Afin de contrer l'atteinte ischémique, différents mécanismes compensateurs inadéquats (physiologique, cellulaire et moléculaire) se mettent en place aboutissant au remodelage ventriculaire. Nous avons décrit de façon exhaustive l'origine biologique des CS (exogènes et endogènes) ainsi que leurs propriétés uniques de modification de la MEC, de modulation des cytokines pro-inflammatoires, de sécrétion des facteurs anti-apoptotiques ou de stimulation de l'angiogenèse.

Ainsi, ces différents mécanismes sont les cibles privilégiées des CS par effet paracrine suite à l'insulte ischémique. Une revue extensive de la littérature a permis de mettre en lumière la pertinence de notre étude notamment par le manque de données existantes sur l'utilisation de la thérapie cellulaire en greffe cardiaque.

Dans le Chapitre 7, nous avons revu en profondeur les propriétés immunosuppressives des CSM et les moyens d'améliorer leurs performances immunes (préconditionnement, hypoxie...) ainsi que les différents modes de délivrance. Le site d'injection, la dose délivrée, le moment de l'injection ainsi que la source de CSM sont déterminants pour assurer un taux de prise de greffe optimal. Ce chapitre introduit les travaux de recherche effectués par le candidat au doctorat dans le manuscrit #3.

Le **manuscrit #3** (Chapitre 8) étudie ces hypothèses à partir d'un modèle translationnel de MCG chez le murin. Dans cet article original, nous présentons une étude utilisant un modèle animal chez le rat permettant le développement de la MCG entre deux souches histo-incompatibles à 14 jours. Nous avons montré qu'un traitement précoce par ASC sphéroïdes au moment de la transplantation permettait de réduire sensiblement la fibrose myocardique, améliorait le remodelage ventriculaire, ainsi qu'une diminution de l'activité neutrophilique et apoptotique (MPO, Caspase 3). Nous avons observé *in vitro* une augmentation des cytokines pro-angiogenèse (VEGF, MCP-1) et immunomodulatrices (IL-6 et IL-8) dans le groupe traité par ASC sphéroïdes comparés aux ASC cultivées en monocouche. Cependant ces résultats prometteurs ne se sont pas manifestés par un effet *in vivo* sur l'activité macrophagique, ni sur l'angiogenèse après transplantation cardiaque. Nous avons également pu démontrer une transmigration des ASC de

l'épicarde vers le cœur transplanté mais également dans une moindre mesure vers le cœur du receveur (marquage IgG anti-mitochondrie humaine et CD90⁺). Enfin, cette étude a pu mettre en évidence une augmentation de TSG-6 dans les conditions standard ou stimulées à 24h.

Cependant, la stimulation à 72h par le TNF α , démontrait des niveaux similaires de TSG-6 entre les cultures 2D ou 3D. Ces constatations nous ont permis d'étudier l'effet paracrine des ASC en transplantation cardiaque et permet d'entrevoir des possibilités de traitement de la thérapie cellulaire chez les patients cardiovasculaires.

Dans le Chapitre 9 de cette thèse de doctorat, nous avons exploré les effets paracrines potentiels des CS sur le myocarde. Les différents médiateurs sécrétés lors du transfert cellulaire ont un effet favorable de réparation du myocarde et de modulation de la réponse inflammatoire après une insulte ischémique. Les mécanismes compensateurs agissant sur la néovascularisation, sur la MEC, sur les phénomènes d'apoptose et sur la fonction endothéliale sont les cibles privilégiées de l'effet paracrine des CS.

Enfin, le dernier **manuscrit #4** présenté au Chapitre 10 intègre les différents concepts introduits dans le manuscrit #3. Dans cette dernière étude, nous avons développé un modèle d'inflammation aigue (péritonite) chez le murin. Celui-ci nous a permis d'étudier les propriétés de réparation et anti-inflammatoires des ASCs sous deux formes différentes, via un mode d'injection sous-cutané. Nous avons démontré un effet sur l'infiltration neutrophilique et macrophagique (diminution de l'expression CD68 et CD206) avec une diminution des facteurs pro-inflammatoires (IL6-10, VEGF et TSG-6 à 24h) au niveau du péritoine des animaux traités. Notamment, nous avons démontré une diminution des taux de neutrophiles au niveau tissulaire ou extravasculaire, en réponse à l'injection d'ASCs sphérocytes 24h après l'injection de toxine (Zymosan). Ces résultats nous ont permis d'entrevoir les stratégies thérapeutiques futures par l'utilisation de méthodes de transfert non invasives mieux adaptées à une application clinique.

Limitations et perspectives futures

Les études présentées dans cette thèse de doctorat possèdent chacune des limitations inhérentes à leur design.

Les deux premiers manuscrits publiés sont exclusivement cliniques. Les données ont été récoltées de manière prospective mais analysées de façon rétrospective.

Dans le **manuscrit #1**, l'évolution à très long terme (>20 ans) après la greffe a été comparée à la survie des patients de <20 ans. Nous avons comparé les différentes caractéristiques de ces populations avec notre expérience la plus récente. Le nombre de patients dans chaque groupe est relativement faible, bien qu'il s'agisse d'une population extrêmement ciblée et dont la survie est remarquable. Dans la première décennie de notre expérience, près d'un tiers de la population greffée a pu atteindre une survie de plus de 20 ans.

Dans le **manuscrit #2**, nous avons étudié de façon rétrospective l'expérience de l'ICM avec le cœur artificiel total chez les patients en insuffisance cardiaque bi-ventriculaire. La limitation est liée au caractère observationnel rétrospectif de notre étude. Ici, l'échantillon de population étudié est relativement faible comparé à d'autres centres. Cette étude représente cependant la plus large expérience au Canada avec ce type d'assistance de longue durée, concernant une population extrêmement malade. La survie actuarielle sous assistance était de $80\pm 12\%$, à 30 jours après implantation. Dix patients (84%) ont survécu jusqu'à la greffe après 52 ± 42 jours de support.. La survie actuarielle après transplantation était de $67\pm 16\%$ à 1 mois et $56\pm 17\%$ à 1 an après la greffe.

Dans le **manuscrit #3**, l'une des limitations est liée au nombre relativement faible d'animaux. Nous n'avons pas pu étudier la corrélation entre l'effet dose et le développement de la MCG. De même, la quantité de CSM injectées au site de transplantation ainsi que la date de sacrifice des animaux demeurent arbitraire bien que basés sur les travaux préliminaires de Montanari et al. En vue de la difficulté de réalisation du modèle et la synchronisation avec l'apport des ASC sphéroïdes, nous n'avons pas pu investiguer les effets *in vitro* de la stimulation des ASC par un milieu cellulaire hypoxémique ou d'autres facteurs de croissance. Bien que nous ayons pu démontrer un enrichissement du secrétome des ASC soumises au $TNF\alpha$, cette hypothèse n'a pu être testée sur les animaux dans notre modèle expérimental. De même, vu l'instabilité hémodynamique de certains animaux, il a été impossible de réaliser des modalités d'imageries par résonance magnétique chez l'ensemble de la population. Enfin, nous n'avons pas pu investiguer les mécanismes moléculaires aboutissant à la réduction de la fibrose et apoptose au niveau myocardique. Par ailleurs, une investigation de la biodistribution des ASCs est nécessaire afin de pouvoir modéliser la transmigration des cellules dans les différents organes cibles. D'autres études translationnelles et expérimentales de ce modèle de transplantation chez le gros

animal seront nécessaires afin de valider l'utilisation clinique potentielle des ASCs et mieux comprendre les mécanismes de réparation cellulaire.

De la même façon, le dernier **manuscrit #4** doit être vu comme une preuve de concept concernant la distribution des ASC dans un milieu inflammatoire hostile. Les différents mécanismes aboutissant à la réduction de l'infiltration de neutrophiles et macrophages n'ont pu être investigués. Par ailleurs, la biodistribution par luciférase des ASC, par exemple, n'a pas été étudié. La transcription de ce type d'étude expérimentale chez le porc est à l'étude afin de pouvoir valider l'effet anti-inflammatoire et immuno-modulateur des CS sur l'inflammation aigue. D'autres voies de distribution doivent également être explorées afin d'obtenir le meilleur taux de rétention de cellules greffées.

Chapitre 12 – Conclusions

Tout au long de cette thèse de doctorat, nous avons développé différents traitements médicaux et chirurgicaux de l'IC. Après avoir cerné les limites du traitement chirurgical de cette pathologie complexe, nous avons revu de façon approfondie les résultats de la greffe cardiaque à l'ICM en nous focalisant sur les résultats à très long terme (>20 ans de survie) et les comparant aux résultats les plus récents. En résumé, nous avons pu démontrer qu'une survie à très long terme (≥ 20 ans) a été observée chez 30 % des patients ayant reçu leur greffe au cours de la première décennie de notre expérience. Ce résultat sera difficile à reproduire de nos jours étant donné que notre population actuelle est constituée de receveurs plus âgés et plus malades, qui reçoivent le cœur de donneurs plus âgés. Ensuite, nous nous sommes intéressés aux résultats uniques au Canada des patients en IC biventriculaire recevant le Cœur artificiel total (CAT) Syncardia à l'ICM. Nous avons pu démontrer que ce type d'assistance de longue durée s'accompagne d'une faible incidence de complications neurologiques, chez des patients pourtant à l'état extrêmement fragile et complexe, en attente d'une greffe cardiaque. Cependant, nous avons également mis en évidence les limites de ce type de traitement avec des taux de survie de 57% à 1 an post transplantation. Malgré les progrès importants réalisés dans le domaine de l'assistance mécanique et de l'immunosuppression, le devenir après greffe cardiaque n'a été que peu modifié, notamment par la survenue de la maladie coronaire du greffon. De cette façon, nous avons introduit le concept de thérapie cellulaire, nouvelle avenue de traitement dans l'insuffisance cardiaque. Nos travaux expérimentaux nous ont permis de démontrer l'effet bénéfique des ASC sur la fibrose et l'apoptose, ainsi que sur le remodelage ventriculaire post transplantation cardiaque chez le murin. Nous avons enfin pu mettre en évidence les propriétés anti-inflammatoires des ASC dans un modèle d'inflammation aigüe chez le murin, avec notamment une diminution de l'infiltrat neutrophile et macrophagique. La thérapie cellulaire représente une nouvelle approche de traitement chez des patients souffrant d'insuffisance cardiaque réfractaire. Une meilleure compréhension des mécanismes de réparation et de régénération des CS demeure indispensable notamment par le développement de nouveaux modèles expérimentaux chez le gros animal.

Chapitre 13 – Annexes

13.1. Annexe 1 : Chaire Fondation Marcelle et Jean Coutu de traitements chirurgicaux novateurs en insuffisance cardiaque de l'Université de Montréal à l'Institut de cardiologie de Montréal

Créée officiellement le 20 janvier 2015, la **Chaire Fondation Marcelle et Jean Coutu de traitements chirurgicaux novateurs en insuffisance cardiaque de l'Université de Montréal à l'Institut de cardiologie de Montréal** a été mise sur pied grâce à la Fondation de l'Institut de Cardiologie de Montréal qui a mis tout en œuvre pour faire en sorte que cette Chaire voie le jour en sollicitant, entre autres, un don de 1 500 000 \$ de la Fondation Marcelle et Jean-Coutu.

Cette Chaire lancée le 4 février 2015 a pour mission de stimuler la recherche fondamentale et appliquée en thérapie cellulaire, génie tissulaire, transplantation cardiaque et assistance ventriculaire, le développement préclinique et l'introduction clinique d'innovations thérapeutiques dans ces champs d'activité visant à venir en aide aux patients souffrant d'insuffisance cardiaque terminale.

Ses titulaires

1. 2015-03-17 au 2020-03-16: PERRAULT, Louis P. Professeur titulaire, Département de chirurgie, Faculté de médecine.

13.2. Annexe 2 : Articles publiés ou en cours de révision

1. Vistarini N*, Nguyen A*, White M, Racine N, Perrault LP, Ducharme A, Bouchard D, Demers P, Pellerin M, Lamarche Y, El-Hamamsy I, Giraldeau G, Pelletier G, Carrier M. Changes in patient characteristics following cardiac transplantation: the Montreal Heart Institute experience. *Canadian Journal of Surgery*. 2017 Sep;60(5):305-310.
2. Nguyen A, Pellerin M, Perrault LP, White M, Ducharme A, Racine N, Carrier M. Experience with the SynCardia total artificial heart in a Canadian centre. *Canadian Journal of Surgery*. 2017 Dec;60(6):375-379.
3. Nguyen A, Sid-Otmane C, Sirois M, Clavet M, Perrault L, and Ly H. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells cultured as spheroids improve cardiac allograft vasculopathy development in a heart transplantation model. Soumis au *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*
4. Sid-Otmane C*, Nguyen A*, Sirois M, Perrault L and Ly H. Remote delivery of adipose derived stem cells as spheroid bodies versus monolayer to promote anti-inflammatory effect in the setting of peritonitis. Soumis au *Cell Transplantation (CLL), the Regenerative Medicine Journal*

13.3. Annexe 3 : Communications tirées des présentes études

1. 69ème congrès de la SFCTCV, 15-18 juin 2015, (Nantes, France)

Nguyen A, N. Vistarini, Pellerin M, Perrault L, White M, Ducharme A, Racine N, Carrier M. Changes in patient's characteristics and outcome following cardiac transplantation

2. 68ème congrès de la SFCTCV, 10-13 juin 2015, (Nice, France)

Nguyen A, Vistarini N, Pellerin M, Perrault L, White M, Ducharme A, Racine N, Carrier M Canadian Experience with the SynCardia Temporary Total Artificial Heart as bridge to transplantation
Poster (commented)

3. Canadian Cardiovascular Congress 2015, 24-27 October 2015 (Toronto, Canada)

Nguyen A, M Pellerin L Perrault, D Bouchard, P Demers, M White, A Ducharme, N Racine, G Pelletier, M Carrier. Canadian Experience with the SynCardia Temporary Total Artificial Heart as bridge to transplantation. Poster Presentation

4. Société québécoise de transplantation, 5-7 septembre 2015 (Gatineau, Canada)

Nguyen A, Vistarini N, Pellerin M, Perrault L, White M, Ducharme A, Racine N, Carrier M. Le Coeur Artificiel Total Cardiowest: Toujours d'actualité en 2015?
Oral Presentation. Speaker: A. Nguyen

5. Canadian Cardiovascular Congress 2015, 24-27 October 2015 (Toronto, Canada)

Nguyen A, N. Vistarini, Pellerin M, Perrault L, White M, Ducharme A, Racine N, Carrier M. Redo Heart transplant: the Montreal Heart Institute Experience

6. Journée académique de la division de chirurgie cardiaque (UdEM). 19 Mai 2016, (Montréal, Canada)

Nguyen A, Sid-Ottmane C, Perrault L, Ly H. Effets des cellules souches adipeuses humaines sur la maladie coronaire du greffon dans un modèle de transplantation cardiaque. Oral Presentation. Speaker; A. Nguyen

7. Canadian Cardiovascular Congress 2015, 21-23 October 2016 (Montréal, Canada)

Nguyen A, Sid-Ottmane C., Perrault L., Ly H.. Adipose derived stromal cells cultured as spheroids improves cardiac allograft vasculopathy development in a heart transplantation model.

Oral Presentation. Speaker: A. Nguyen

8. 70me congrès de la SFCTCV, 7-9 juin 2017, (Marseilles, France)

Nguyen A, C. Sid-Ottmane, V. Penault-Gagnon, M. Clavet-Lauthier, M. Sirois , L.P. Perrault, H. Ly MD. Cellules souches mésenchymateuses sphéroïdes améliorent l'artériopathie du greffon dans un modèle de transplantation cardiaque

Oral Presentation. Speaker: A. Nguyen

Références bibliographiques

1. Ryan TJ, Antman EM, Brooks NH, Califf RM, Hillis LD, Hiratzka LF, Rapaport E, Riegel B, Russell RO, Smith EE, 3rd, Weaver WD, Gibbons RJ, Alpert JS, Eagle KA, Gardner TJ, Garson A, Jr., Gregoratos G, Ryan TJ and Smith SC, Jr. 1999 update: ACC/AHA guidelines for the management of patients with acute myocardial infarction. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Management of Acute Myocardial Infarction). *J Am Coll Cardiol.* 1999;34:890-911.
2. Krum H. The Task Force for the diagnosis and treatment of chronic heart failure of the European Society of Cardiology. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: full text (update 2005). *Eur Heart J.* 2005;26:2472; author reply 2473-4.
3. Hunt SA, American College of C and American Heart Association Task Force on Practice G. ACC/AHA 2005 guideline update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:e1-82.
4. Gibson CM, Cannon CP, Murphy SA, Ryan KA, Mesley R, Marble SJ, McCabe CH, Van De Werf F and Braunwald E. Relationship of TIMI myocardial perfusion grade to mortality after administration of thrombolytic drugs. *Circulation.* 2000;101:125-30.
5. Giugliano RP, Sabatine MS, Gibson CM, Roe MT, Harrington RA, Murphy SA, Morrow DA, Antman EM and Braunwald E. Combined assessment of thrombolysis in myocardial infarction flow grade, myocardial perfusion grade, and ST-segment resolution to evaluate epicardial and myocardial reperfusion. *Am J Cardiol.* 2004;93:1362-7, A5-6.
6. Gibson CM. Has my patient achieved adequate myocardial reperfusion? *Circulation.* 2003;108:504-7.
7. Jessup M and Brozena S. Heart failure. *N Engl J Med.* 2003;348:2007-18.
8. Lund LH, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Christie JD, Dipchand AI, Dobbels F, Goldfarb SB, Levvey BJ, Meiser B, Yusef RD, Stehlik J, International Society of H and Lung T. The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-first official adult heart transplant report--2014; focus theme: retransplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2014;33:996-1008.
9. Lund LH, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Goldfarb S, Levvey BJ, Meiser B, Rossano JW, Yusef RD and Stehlik J. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-second Official Adult Heart Transplantation Report--2015; Focus Theme: Early Graft Failure. *J Heart Lung Transplant.* 2015;34:1244-54.
10. Yacoub M, Suzuki K and Rosenthal N. The future of regenerative therapy in patients with chronic heart failure. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2006;3 Suppl 1:S133-5.
11. Landmesser U and Drexler H. Chronic heart failure: an overview of conventional treatment versus novel approaches. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2005;2:628-38.
12. Sanchez PL, San Roman JA, Villa A, Fernandez ME and Fernandez-Aviles F. Contemplating the bright future of stem cell therapy for cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2006;3 Suppl 1:S138-51.
13. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, Gonzalez-Juanatey JR, Harjola VP, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GMC, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer P and Group ESCSD. 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. *Eur Heart J.* 2016;37:2129-2200.
14. Ezekowitz JA, O'Meara E, McDonald MA, Abrams H, Chan M, Ducharme A, Giannetti N, Grzeslo A, Hamilton PG, Heckman GA, Howlett JG, Koshman SL, Lepage S, McKelvie RS, Moe GW, Rajda M, Swiggum E, Virani SA, Zieroth S, Al-Hesayen A, Cohen-Solal A, D'Astous M, De S, Estrella-Holder E, Frenes S, Green L, Haddad H, Harkness K, Hernandez AF, Kouz S, LeBlanc MH, Masoudi FA, Ross HJ, Roussin A and Sussex B. 2017 Comprehensive Update of the Canadian Cardiovascular Society Guidelines for the Management of Heart Failure. *Can J Cardiol.* 2017;33:1342-1433.
15. Kalogeropoulos AP, Fonarow GC, Georgiopoulos V, Burkman G, Siwamogsatham S, Patel A, Li S, Papadimitriou L and Butler J. Characteristics and Outcomes of Adult Outpatients With Heart Failure and Improved or Recovered Ejection Fraction. *JAMA Cardiol.* 2016;1:510-8.

16. Moe GW. BNP in the diagnosis and risk stratification of heart failure. *Heart Fail Monit.* 2005;4:116-22.
17. Braunwald E. Biomarkers in heart failure. *N Engl J Med.* 2008;358:2148-59.
18. Bolt CL, Baur L, Stoffers J, Lenderink T and Winkens R. Novel strategies for the detection of systolic and diastolic heart failure. *Curr Cardiol Rev.* 2009;5:112-8.
19. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, de Ferranti S, Despres JP, Fullerton HJ, Howard VJ, Huffman MD, Judd SE, Kissela BM, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Liu S, Mackey RH, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER, 3rd, Moy CS, Muntner P, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Nichol G, Palaniappan L, Pandey DK, Reeves MJ, Rodriguez CJ, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Willey JZ, Woo D, Yeh RW, Turner MB, American Heart Association Statistics C and Stroke Statistics S. Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2015;131:e29-322.
20. Mosterd A and Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart.* 2007;93:1137-46.
21. Redfield MM, Jacobsen SJ, Burnett JC, Jr., Mahoney DW, Bailey KR and Rodeheffer RJ. Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic. *JAMA.* 2003;289:194-202.
22. Bleumink GS, Knetsch AM, Sturkenboom MC, Straus SM, Hofman A, Deckers JW, Witteman JC and Stricker BH. Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure The Rotterdam Study. *Eur Heart J.* 2004;25:1614-9.
23. Maggioni AP, Dahlstrom U, Filippatos G, Chioncel O, Crespo Leiro M, Drozd J, Fruhwald F, Gullestad L, Logeart D, Fabbri G, Urso R, Metra M, Parissis J, Persson H, Ponikowski P, Rauchhaus M, Voors AA, Nielsen OW, Zannad F, Tavazzi L and Heart Failure Association of the European Society of C. EURObservational Research Programme: regional differences and 1-year follow-up results of the Heart Failure Pilot Survey (ESC-HF Pilot). *Eur J Heart Fail.* 2013;15:808-17.
24. Pocock SJ, Ariti CA, McMurray JJ, Maggioni A, Kober L, Squire IB, Swedberg K, Dobson J, Poppe KK, Whalley GA, Doughty RN and Meta-Analysis Global Group in Chronic Heart F. Predicting survival in heart failure: a risk score based on 39 372 patients from 30 studies. *Eur Heart J.* 2013;34:1404-13.
25. Gerber Y, Weston SA, Redfield MM, Chamberlain AM, Manemann SM, Jiang R, Killian JM and Roger VL. A contemporary appraisal of the heart failure epidemic in Olmsted County, Minnesota, 2000 to 2010. *JAMA Intern Med.* 2015;175:996-1004.
26. Davie AP, Francis CM, Caruana L, Sutherland GR and McMurray JJ. Assessing diagnosis in heart failure: which features are any use? *QJM.* 1997;90:335-9.
27. Mant J, Doust J, Roalfe A, Barton P, Cowie MR, Glasziou P, Mant D, McManus RJ, Holder R, Deeks J, Fletcher K, Qume M, Sohanpal S, Sanders S and Hobbs FD. Systematic review and individual patient data meta-analysis of diagnosis of heart failure, with modelling of implications of different diagnostic strategies in primary care. *Health Technol Assess.* 2009;13:1-207, iii.
28. Oudejans I, Mosterd A, Bloemen JA, Valk MJ, van Velzen E, Wielders JP, Zuithoff NP, Rutten FH and Hoes AW. Clinical evaluation of geriatric outpatients with suspected heart failure: value of symptoms, signs, and additional tests. *Eur J Heart Fail.* 2011;13:518-27.
29. Fonseca C. Diagnosis of heart failure in primary care. *Heart Fail Rev.* 2006;11:95-107.
30. Kelder JC, Cramer MJ, van Wijngaarden J, van Tooren R, Mosterd A, Moons KG, Lammers JW, Cowie MR, Grobbee DE and Hoes AW. The diagnostic value of physical examination and additional testing in primary care patients with suspected heart failure. *Circulation.* 2011;124:2865-73.
31. Rutten FH, Moons KG, Cramer MJ, Grobbee DE, Zuithoff NP, Lammers JW and Hoes AW. Recognising heart failure in elderly patients with stable chronic obstructive pulmonary disease in primary care: cross sectional diagnostic study. *BMJ.* 2005;331:1379.
32. Hawkins NM, Petrie MC, Jhund PS, Chalmers GW, Dunn FG and McMurray JJ. Heart failure and chronic obstructive pulmonary disease: diagnostic pitfalls and epidemiology. *Eur J Heart Fail.* 2009;11:130-9.
33. Daniels LB, Clopton P, Bhalla V, Krishnaswamy P, Nowak RM, McCord J, Hollander JE, Duc P, Omland T, Storrow AB, Abraham WT, Wu AH, Steg PG, Westheim A, Knudsen CW, Perez A, Kazanegra R, Herrmann HC, McCullough PA and Maisel AS. How obesity affects the cut-points for B-type natriuretic peptide in the diagnosis of acute heart failure. Results from the Breathing Not Properly Multinational Study. *Am Heart J.* 2006;151:999-1005.
34. Wong CM, Hawkins NM, Jhund PS, MacDonald MR, Solomon SD, Granger CB, Yusuf S, Pfeffer MA, Swedberg K, Petrie MC and McMurray JJ. Clinical characteristics and outcomes of young and very young adults with heart failure: The CHARM programme (Candesartan in Heart Failure Assessment of Reduction in Mortality and Morbidity). *J Am Coll Cardiol.* 2013;62:1845-54.

35. Wong CM, Hawkins NM, Petrie MC, Jhund PS, Gardner RS, Ariti CA, Poppe KK, Earle N, Whalley GA, Squire IB, Doughty RN, McMurray JJ and Investigators M. Heart failure in younger patients: the Meta-analysis Global Group in Chronic Heart Failure (MAGGIC). *Eur Heart J*. 2014;35:2714-21.
36. Thomas JT, Kelly RF, Thomas SJ, Stamos TD, Albasha K, Parrillo JE and Calvin JE. Utility of history, physical examination, electrocardiogram, and chest radiograph for differentiating normal from decreased systolic function in patients with heart failure. *Am J Med*. 2002;112:437-45.
37. van Riet EE, Hoes AW, Limburg A, Landman MA, van der Hoeven H and Rutten FH. Prevalence of unrecognized heart failure in older persons with shortness of breath on exertion. *Eur J Heart Fail*. 2014;16:772-7.
38. Davie AP, Love MP and McMurray JJ. Value of ECGs in identifying heart failure due to left ventricular systolic dysfunction. *BMJ*. 1996;313:300-1.
39. Paulus WJ, Tschope C, Sanderson JE, Rusconi C, Flachskampf FA, Rademakers FE, Marino P, Smiseth OA, De Keulenaer G, Leite-Moreira AF, Borbely A, Edes I, Handoko ML, Heymans S, Pezzali N, Pieske B, Dickstein K, Fraser AG and Brutsaert DL. How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2007;28:2539-50.
40. Marwick TH, Raman SV, Carro I and Bax JJ. Recent developments in heart failure imaging. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2010;3:429-39.
41. Dokainish H, Nguyen JS, Bobek J, Goswami R and Lakkis NM. Assessment of the American Society of Echocardiography-European Association of Echocardiography guidelines for diastolic function in patients with depressed ejection fraction: an echocardiographic and invasive haemodynamic study. *Eur J Echocardiogr*. 2011;12:857-64.
42. Kirkpatrick JN, Vannan MA, Narula J and Lang RM. Echocardiography in heart failure: applications, utility, and new horizons. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:381-96.
43. Nagueh SF, Bhatt R, Vivo RP, Krim SR, Sarvari SI, Russell K, Edvardsen T, Smiseth OA and Estep JD. Echocardiographic evaluation of hemodynamics in patients with decompensated systolic heart failure. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2011;4:220-7.
44. Caballero L, Kou S, Dulgheru R, Gonjilashvili N, Athanassopoulos GD, Barone D, Baroni M, Cardim N, Gomez de Diego JJ, Oliva MJ, Hagendorff A, Hristova K, Lopez T, Magne J, Martinez C, de la Morena G, Popescu BA, Penicka M, Ozyigit T, Rodrigo Carbonero JD, Salustri A, Van De Veire N, Von Bardeleben RS, Vinereanu D, Voigt JU, Zamorano JL, Bernard A, Donal E, Lang RM, Badano LP and Lancellotti P. Echocardiographic reference ranges for normal cardiac Doppler data: results from the NORRE Study. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2015;16:1031-41.
45. Garbi M, McDonagh T, Cosyns B, Bucciarelli-Ducci C, Edvardsen T, Kitsiou A, Nieman K, Lancellotti P and Force EIT. Appropriateness criteria for cardiovascular imaging use in heart failure: report of literature review. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2015;16:147-53.
46. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, Flachskampf FA, Foster E, Goldstein SA, Kuznetsova T, Lancellotti P, Muraru D, Picard MH, Rietzschel ER, Rudski L, Spencer KT, Tsang W and Voigt JU. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2015;16:233-70.
47. Gimelli A, Lancellotti P, Badano LP, Lombardi M, Gerber B, Plein S, Neglia D, Edvardsen T, Kitsiou A, Scholte AJ, Schroder S, Cosyns B, Gargiulo P, Zamorano JL and Perrone-Filardi P. Non-invasive cardiac imaging evaluation of patients with chronic systolic heart failure: a report from the European Association of Cardiovascular Imaging (EACVI). *Eur Heart J*. 2014;35:3417-25.
48. Gonzalez JA and Kramer CM. Role of Imaging Techniques for Diagnosis, Prognosis and Management of Heart Failure Patients: Cardiac Magnetic Resonance. *Curr Heart Fail Rep*. 2015;12:276-83.
49. American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus D, Hundley WG, Bluemke DA, Finn JP, Flamm SD, Fogel MA, Friedrich MG, Ho VB, Jerosch-Herold M, Kramer CM, Manning WJ, Patel M, Pohost GM, Stillman AE, White RD and Woodard PK. ACCF/ACR/AHA/NASCI/SCMR 2010 expert consensus document on cardiovascular magnetic resonance: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents. *Circulation*. 2010;121:2462-508.
50. Kilner PJ, Geva T, Kaemmerer H, Trindade PT, Schwitter J and Webb GD. Recommendations for cardiovascular magnetic resonance in adults with congenital heart disease from the respective working groups of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2010;31:794-805.
51. Moon JC, Messroghli DR, Kellman P, Piechnik SK, Robson MD, Ugander M, Gatehouse PD, Arai AE, Friedrich MG, Neubauer S, Schulz-Menger J, Schelbert EB, Society for Cardiovascular Magnetic Resonance I and

- Cardiovascular Magnetic Resonance Working Group of the European Society of C. Myocardial T1 mapping and extracellular volume quantification: a Society for Cardiovascular Magnetic Resonance (SCMR) and CMR Working Group of the European Society of Cardiology consensus statement. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2013;15:92.
52. American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus D, Hundley WG, Bluemke DA, Finn JP, Flamm SD, Fogel MA, Friedrich MG, Ho VB, Jerosch-Herold M, Kramer CM, Manning WJ, Patel M, Pohost GM, Stillman AE, White RD and Woodard PK. ACCF/ACR/AHA/NASCI/SCMR 2010 expert consensus document on cardiovascular magnetic resonance: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55:2614-62.
53. Yoshida A, Ishibashi-Ueda H, Yamada N, Kanzaki H, Hasegawa T, Takahama H, Amaki M, Asakura M and Kitakaze M. Direct comparison of the diagnostic capability of cardiac magnetic resonance and endomyocardial biopsy in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2013;15:166-75.
54. Windecker S, Kolh P, Alfonso F, Collet JP, Cremer J, Falk V, Filippatos G, Hamm C, Head SJ, Juni P, Kappetein AP, Kastrati A, Knuuti J, Landmesser U, Laufer G, Neumann FJ, Richter DJ, Schauerte P, Uva MS, Stefanini GG, Taggart DP, Torracca L, Valgimigli M, Wijns W, Witkowski A, Grupa Robocza Europejskiego Towarzystwa K, Europejskie Stowarzyszenie Chirurgii Serca i Klatki Piersiowej do spraw rewaskularyzacji miesnia s and European Association for Percutaneous Cardiovascular I. [2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization]. *Kardiol Pol.* 2014;72:1253-379.
55. Task Force M, Montalescot G, Sechtem U, Achenbach S, Andreotti F, Arden C, Budaj A, Bugiardini R, Crea F, Cuisset T, Di Mario C, Ferreira JR, Gersh BJ, Gitt AK, Hulot JS, Marx N, Opie LH, Pfisterer M, Prescott E, Ruschitzka F, Sabate M, Senior R, Taggart DP, van der Wall EE, Vrints CJ, Guidelines ESCCfP, Zamorano JL, Achenbach S, Baumgartner H, Bax JJ, Bueno H, Dean V, Deaton C, Erol C, Fagard R, Ferrari R, Hasdai D, Hoes AW, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, Lancellotti P, Linhart A, Nihoyannopoulos P, Piepoli MF, Ponikowski P, Sirnes PA, Tamargo JL, Tendera M, Torbicki A, Wijns W, Windecker S, Document R, Knuuti J, Valgimigli M, Bueno H, Claey s MJ, Donner-Banzhoff N, Erol C, Frank H, Funck-Brentano C, Gaemperli O, Gonzalez-Juanatey JR, Hamilos M, Hasdai D, Husted S, James SK, Kervinen K, Kolh P, Kristensen SD, Lancellotti P, Maggioni AP, Piepoli MF, Pries AR, Romeo F, Ryden L, Simoons ML, Sirnes PA, Steg PG, Timmis A, Wijns W, Windecker S, Yildirir A and Zamorano JL. 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease: the Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 2013;34:2949-3003.
56. Roffi M, Patrono C, Collet JP, Mueller C, Valgimigli M, Andreotti F, Bax JJ, Borger MA, Brotons C, Chew DP, Gencer B, Hasenfuss G, Kjeldsen K, Lancellotti P, Landmesser U, Mehilli J, Mukherjee D, Storey RF and Windecker S. [2015 ESC guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation]. *Kardiol Pol.* 2015;73:1207-94.
57. Jolicœur EM, Dunning A, Castelvechio S, Dabrowski R, Waclawiw MA, Petrie MC, Stewart R, Jhund PS, Desvigne-Nickens P, Panza JA, Bonow RO, Sun B, San TR, Al-Khalidi HR, Rouleau JL, Velazquez EJ and Cleland JGF. Importance of angina in patients with coronary disease, heart failure, and left ventricular systolic dysfunction: insights from STICH. *J Am Coll Cardiol.* 2015;66:2092-2100.
58. Roberts E, Ludman AJ, Dworzynski K, Al-Mohammad A, Cowie MR, McMurray JJ, Mant J and Failure NGDGfAH. The diagnostic accuracy of the natriuretic peptides in heart failure: systematic review and diagnostic meta-analysis in the acute care setting. *BMJ.* 2015;350:h910.
59. Zaphiriou A, Robb S, Murray-Thomas T, Mendez G, Fox K, McDonagh T, Hardman SM, Dargie HJ and Cowie MR. The diagnostic accuracy of plasma BNP and NTproBNP in patients referred from primary care with suspected heart failure: results of the UK natriuretic peptide study. *Eur J Heart Fail.* 2005;7:537-41.
60. Kelder JC, Cramer MJ, Verweij WM, Grobbee DE and Hoes AW. Clinical utility of three B-type natriuretic peptide assays for the initial diagnostic assessment of new slow-onset heart failure. *J Card Fail.* 2011;17:729-34.
61. Rahimi K, Bennett D, Conrad N, Williams TM, Basu J, Dwight J, Woodward M, Patel A, McMurray J and MacMahon S. Risk prediction in patients with heart failure: a systematic review and analysis. *JACC Heart Fail.* 2014;2:440-6.
62. Ouwerkerk W, Voors AA and Zwinderman AH. Factors influencing the predictive power of models for predicting mortality and/or heart failure hospitalization in patients with heart failure. *JACC Heart Fail.* 2014;2:429-36.
63. Lupon J, de Antonio M, Vila J, Penafiel J, Galan A, Zamora E, Urrutia A and Bayes-Genis A. Development of a novel heart failure risk tool: the barcelona bio-heart failure risk calculator (BCN bio-HF calculator). *PLoS One.* 2014;9:e85466.

64. Levy WC, Mozaffarian D, Linker DT, Sutradhar SC, Anker SD, Cropp AB, Anand I, Maggioni A, Burton P, Sullivan MD, Pitt B, Poole-Wilson PA, Mann DL and Packer M. The Seattle Heart Failure Model: prediction of survival in heart failure. *Circulation*. 2006;113:1424-33.
65. Mozaffarian D, Anker SD, Anand I, Linker DT, Sullivan MD, Cleland JG, Carson PE, Maggioni AP, Mann DL, Pitt B, Poole-Wilson PA and Levy WC. Prediction of mode of death in heart failure: the Seattle Heart Failure Model. *Circulation*. 2007;116:392-8.
66. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Jr., Drazner MH, Fonarow GC, Geraci SA, Horwich T, Januzzi JL, Johnson MR, Kasper EK, Levy WC, Masoudi FA, McBride PE, McMurray JJ, Mitchell JE, Peterson PN, Riegel B, Sam F, Stevenson LW, Tang WH, Tsai EJ, Wilkoff BL, American College of Cardiology F and American Heart Association Task Force on Practice G. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:e147-239.
67. Shah SJ, Kitzman DW, Borlaug BA, van Heerebeek L, Zile MR, Kass DA and Paulus WJ. Phenotype-Specific Treatment of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Multiorgan Roadmap. *Circulation*. 2016;134:73-90.
68. Flather MD, Yusuf S, Kober L, Pfeffer M, Hall A, Murray G, Torp-Pedersen C, Ball S, Pogue J, Moya L and Braunwald E. Long-term ACE-inhibitor therapy in patients with heart failure or left-ventricular dysfunction: a systematic overview of data from individual patients. ACE-Inhibitor Myocardial Infarction Collaborative Group. *Lancet*. 2000;355:1575-81.
69. Cleland JG, Freemantle N, Coletta AP and Clark AL. Clinical trials update from the American Heart Association: REPAIR-AMI, ASTAMI, JELIS, MEGA, REVIVE-II, SURVIVE, and PROACTIVE. *Eur J Heart Fail*. 2006;8:105-10.
70. Rudiger A, Harjola VP, Muller A, Mattila E, Saila P, Nieminen M and Follath F. Acute heart failure: clinical presentation, one-year mortality and prognostic factors. *Eur J Heart Fail*. 2005;7:662-70.
71. Digitalis Investigation G. The effect of digoxin on mortality and morbidity in patients with heart failure. *N Engl J Med*. 1997;336:525-33.
72. Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM and Shusterman NH. The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. *N Engl J Med*. 1996;334:1349-55.
73. Cleland JG, Freemantle N, Erdmann E, Gras D, Kappenberger L, Tavazzi L and Daubert JC. Long-term mortality with cardiac resynchronization therapy in the Cardiac Resynchronization-Heart Failure (CARE-HF) trial. *Eur J Heart Fail*. 2012;14:628-34.
74. Sohaib SM, Finegold JA, Nijjer SS, Hossain R, Linde C, Levy WC, Sutton R, Kanagaratnam P, Francis DP and Whinnett ZI. Opportunity to increase life span in narrow QRS cardiac resynchronization therapy recipients by deactivating ventricular pacing: evidence from randomized controlled trials. *JACC Heart Fail*. 2015;3:327-36.
75. Cleland JG, Calvert MJ, Verboven Y and Freemantle N. Effects of cardiac resynchronization therapy on long-term quality of life: an analysis from the CARDiac Resynchronisation-Heart Failure (CARE-HF) study. *Am Heart J*. 2009;157:457-66.
76. Cleland JG, Mareev Y and Linde C. Reflections on EchoCRT: sound guidance on QRS duration and morphology for CRT? *Eur Heart J*. 2015;36:1948-51.
77. Mentz RJ, Kjeldsen K, Rossi GP, Voors AA, Cleland JG, Anker SD, Gheorghide M, Fiuzat M, Rossignol P, Zannad F, Pitt B, O'Connor C and Felker GM. Decongestion in acute heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2014;16:471-82.
78. Bart BA, Goldsmith SR, Lee KL, Givertz MM, O'Connor CM, Bull DA, Redfield MM, Deswal A, Rouleau JL, LeWinter MM, Ofili EO, Stevenson LW, Semigran MJ, Felker GM, Chen HH, Hernandez AF, Anstrom KJ, McNulty SE, Velazquez EJ, Ibarra JC, Mascette AM, Braunwald E and Heart Failure Clinical Research N. Ultrafiltration in decompensated heart failure with cardiorenal syndrome. *N Engl J Med*. 2012;367:2296-304.
79. Thiele H, Zeymer U, Neumann FJ, Ferenc M, Olbrich HG, Hausleiter J, Richardt G, Hennersdorf M, Empen K, Fuernau G, Desch S, Eitel I, Hambrecht R, Fuhrmann J, Bohm M, Ebelt H, Schneider S, Schuler G, Werdan K and Investigators I-SIT. Intraaortic balloon support for myocardial infarction with cardiogenic shock. *N Engl J Med*. 2012;367:1287-96.
80. Thiele H, Zeymer U, Neumann FJ, Ferenc M, Olbrich HG, Hausleiter J, de Waha A, Richardt G, Hennersdorf M, Empen K, Fuernau G, Desch S, Eitel I, Hambrecht R, Lauer B, Bohm M, Ebelt H, Schneider S, Werdan K, Schuler G and Intraaortic Balloon Pump in cardiogenic shock IIti. Intra-aortic balloon counterpulsation in acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock (IABP-SHOCK II): final 12 month results of a randomised, open-label trial. *Lancet*. 2013;382:1638-45.

81. Blom AS and Acker MA. The surgical treatment of end-stage heart failure. *Curr Probl Cardiol.* 2007;32:553-99.
82. Mickleborough LL, Carson S, Tamariz M and Ivanov J. Results of revascularization in patients with severe left ventricular dysfunction. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000;119:550-7.
83. Holmes DR, Jr., Vlietstra RE, Fisher LD, Smith HC, Mock MB, Faxon DP, Gosselin AJ, Ryan TJ, Judkins MP and Pettinger M. Follow-up of patients from the coronary artery surgery study (CASS) potentially suitable for percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am Heart J.* 1983;106:981-8.
84. Veterans Administration Coronary Artery Bypass Surgery Cooperative Study G. Eleven-year survival in the Veterans Administration randomized trial of coronary bypass surgery for stable angina. *N Engl J Med.* 1984;311:1333-9.
85. Prospective randomised study of coronary artery bypass surgery in stable angina pectoris. Second interim report by the European Coronary Surgery Study Group. *Lancet.* 1980;2:491-5.
86. Velazquez EJ, Lee KL, Deja MA, Jain A, Sopko G, Marchenko A, Ali IS, Pohost G, Gradinac S, Abraham WT, Yii M, Prabhakaran D, Szwed H, Ferrazzi P, Petrie MC, O'Connor CM, Panchavinnin P, She L, Bonow RO, Rankin GR, Jones RH, Rouleau JL and Investigators S. Coronary-artery bypass surgery in patients with left ventricular dysfunction. *N Engl J Med.* 2011;364:1607-16.
87. Velazquez EJ, Lee KL, Jones RH, Al-Khalidi HR, Hill JA, Panza JA, Michler RE, Bonow RO, Doenst T, Petrie MC, Oh JK, She L, Moore VL, Desvigne-Nickens P, Sopko G, Rouleau JL and Investigators S. Coronary-Artery Bypass Surgery in Patients with Ischemic Cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2016;374:1511-20.
88. Struber M, Lange R, Gummert JF, Beyersdorf F, Jurmann M, Schmid C, El Banayosy A, Hoppe UC, Steinbeck G, Reichenspurner H, Liebold A, Franz WM, Ruhparwar A, Schmoeckel M, Working Group for Therapies of End Stage C, Pulmonary D, German Society for T and Cardiocascular S. Alternatives to heart transplantation. Symposium of the "Treatment of End-stage Heart and Lung Failure" working group on October 22, 2005 in Munich. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2007;55 Suppl 2:S147-67.
89. Ennker JC and Ennker IC. Coronary artery surgery: now and in the next decade. *HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth.* 2012;4:217-23.
90. Hausmann H, Topp H, Siniawski H, Holz S and Hetzer R. Decision-making in end-stage coronary artery disease: revascularization or heart transplantation? *Ann Thorac Surg.* 1997;64:1296-301; discussion 1302.
91. Panza JA, Velazquez EJ and Bonow RO. Myocardial Viability and Long-Term Outcomes in Ischemic Cardiomyopathy. Reply. *N Engl J Med.* 2019;381:2374.
92. Petrie MC, Jhund PS, She L, Adlbrecht C, Doenst T, Panza JA, Hill JA, Lee KL, Rouleau JL, Prior DL, Ali IS, Maddury J, Golba KS, White HD, Carson P, Chrzanowski L, Romanov A, Miller AB, Velazquez EJ and Investigators ST. Ten-Year Outcomes After Coronary Artery Bypass Grafting According to Age in Patients With Heart Failure and Left Ventricular Systolic Dysfunction: An Analysis of the Extended Follow-Up of the STICH Trial (Surgical Treatment for Ischemic Heart Failure). *Circulation.* 2016;134:1314-1324.
93. Rylski B and Beyersdorf F. Organ-conserving cardiac surgery. *HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth.* 2013;5:85-8.
94. McGee EC, Gillinov AM and McCarthy PM. Reverse ventricular remodeling: mechanical options. *Curr Opin Cardiol.* 2006;21:215-20.
95. Jones RH, Velazquez EJ, Michler RE, Sopko G, Oh JK, O'Connor CM, Hill JA, Menicanti L, Sadowski Z, Desvigne-Nickens P, Rouleau JL, Lee KL and Investigators SH. Coronary bypass surgery with or without surgical ventricular reconstruction. *N Engl J Med.* 2009;360:1705-17.
96. Smith CR, Leon MB, Mack MJ, Miller DC, Moses JW, Svensson LG, Tuzcu EM, Webb JG, Fontana GP, Makkar RR, Williams M, Dewey T, Kapadia S, Babaliaros V, Thourani VH, Corso P, Pichard AD, Bavaria JE, Herrmann HC, Akin JJ, Anderson WN, Wang D, Pocock SJ and Investigators PT. Transcatheter versus surgical aortic-valve replacement in high-risk patients. *N Engl J Med.* 2011;364:2187-98.
97. Leon MB, Smith CR, Mack M, Miller DC, Moses JW, Svensson LG, Tuzcu EM, Webb JG, Fontana GP, Makkar RR, Brown DL, Block PC, Guyton RA, Pichard AD, Bavaria JE, Herrmann HC, Douglas PS, Petersen JL, Akin JJ, Anderson WN, Wang D, Pocock S and Investigators PT. Transcatheter aortic-valve implantation for aortic stenosis in patients who cannot undergo surgery. *N Engl J Med.* 2010;363:1597-607.
98. Makkar RR, Thourani VH, Mack MJ, Kodali SK, Kapadia S, Webb JG, Yoon SH, Trento A, Svensson LG, Herrmann HC, Szeto WY, Miller DC, Satler L, Cohen DJ, Dewey TM, Babaliaros V, Williams MR, Kereiakes DJ, Zajarias A, Greason KL, Whisenant BK, Hodson RW, Brown DL, Fearon WF, Russo MJ, Pibarot P, Hahn RT, Jaber WA, Rogers E, Xu K, Wheeler J, Alu MC, Smith CR, Leon MB and Investigators P. Five-Year Outcomes of Transcatheter or Surgical Aortic-Valve Replacement. *N Engl J Med.* 2020;382:799-809.

99. Reardon MJ, Adams DH, Kleiman NS, Yakubov SJ, Coselli JS, Deeb GM, Gleason TG, Lee JS, Hermiller JB, Jr., Chetcuti S, Heiser J, Merhi W, Zorn GL, 3rd, Tadros P, Robinson N, Petrossian G, Hughes GC, Harrison JK, Maini B, Mumtaz M, Conte JV, Resar JR, Aharonian V, Pfeffer T, Oh JK, Qiao H and Popma JJ. 2-Year Outcomes in Patients Undergoing Surgical or Self-Expanding Transcatheter Aortic Valve Replacement. *J Am Coll Cardiol.* 2015;66:113-21.
100. Adams DH, Popma JJ and Reardon MJ. Transcatheter aortic-valve replacement with a self-expanding prosthesis. *N Engl J Med.* 2014;371:967-8.
101. Mack MJ and Leon MB. Transcatheter Aortic-Valve Replacement in Low-Risk Patients. Reply. *N Engl J Med.* 2019;381:684-685.
102. Lancellotti P, Tribouilloy C, Hagendorff A, Popescu BA, Edvardsen T, Pierard LA, Badano L, Zamorano JL and Scientific Document Committee of the European Association of Cardiovascular I. Recommendations for the echocardiographic assessment of native valvular regurgitation: an executive summary from the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2013;14:611-44.
103. Chaliki HP, Mohty D, Avierinos JF, Scott CG, Schaff HV, Tajik AJ and Enriquez-Sarano M. Outcomes after aortic valve replacement in patients with severe aortic regurgitation and markedly reduced left ventricular function. *Circulation.* 2002;106:2687-93.
104. Smith PK, Puskas JD, Ascheim DD, Voisine P, Gelijns AC, Moskowitz AJ, Hung JW, Parides MK, Ailawadi G, Perrault LP, Acker MA, Argenziano M, Thourani V, Gammie JS, Miller MA, Page P, Overbey JR, Bagiella E, Dagenais F, Blackstone EH, Kron IL, Goldstein DJ, Rose EA, Moquete EG, Jeffries N, Gardner TJ, O'Gara PT, Alexander JH, Michler RE and Cardiothoracic Surgical Trials Network I. Surgical treatment of moderate ischemic mitral regurgitation. *N Engl J Med.* 2014;371:2178-88.
105. Goldstein D, Moskowitz AJ, Gelijns AC, Ailawadi G, Parides MK, Perrault LP, Hung JW, Voisine P, Dagenais F, Gillinov AM, Thourani V, Argenziano M, Gammie JS, Mack M, Demers P, Atluri P, Rose EA, O'Sullivan K, Williams DL, Bagiella E, Michler RE, Weisel RD, Miller MA, Geller NL, Taddei-Peters WC, Smith PK, Moquete E, Overbey JR, Kron IL, O'Gara PT, Acker MA and Ctsn. Two-Year Outcomes of Surgical Treatment of Severe Ischemic Mitral Regurgitation. *N Engl J Med.* 2016;374:344-53.
106. D'Ascenzo F, Moretti C, Marra WG, Montefusco A, Omede P, Taha S, Castagno D, Gaemperli O, Taramasso M, Frea S, Pidello S, Rudolph V, Franzen O, Braun D, Giannini C, Ince H, Perl L, Zoccai G, Marra S, D'Amico M, Maisano F, Rinaldi M and Gaita F. Meta-analysis of the usefulness of Mitraclip in patients with functional mitral regurgitation. *Am J Cardiol.* 2015;116:325-31.
107. Nickenig G, Estevez-Loureiro R, Franzen O, Tamburino C, Vanderheyden M, Luscher TF, Moat N, Price S, Dall'Ara G, Winter R, Corti R, Grasso C, Snow TM, Jeger R, Blankenberg S, Settergren M, Tiroch K, Balzer J, Petronio AS, Buttner HJ, Etti F, Sievert H, Fiorino MG, Claeys M, Ussia GP, Baumgartner H, Scandura S, Alamgir F, Keshavarzi F, Colombo A, Maisano F, Ebelt H, Aruta P, Lubos E, Plicht B, Schueler R, Pighi M, Di Mario C and Transcatheter Valve Treatment Sentinel Registry Investigators of the ERPotESoC. Percutaneous mitral valve edge-to-edge repair: in-hospital results and 1-year follow-up of 628 patients of the 2011-2012 Pilot European Sentinel Registry. *J Am Coll Cardiol.* 2014;64:875-84.
108. Puls M, Lubos E, Boekstegers P, von Bardeleben RS, Ouarrak T, Butter C, Zuern CS, Bekeredjian R, Sievert H, Nickenig G, Eggebrecht H, Senges J and Schillinger W. One-year outcomes and predictors of mortality after MitraClip therapy in contemporary clinical practice: results from the German transcatheter mitral valve interventions registry. *Eur Heart J.* 2016;37:703-12.
109. Obadia JF, Messika-Zeitoun D, Leurent G, Iung B, Bonnet G, Piriou N, Lefevre T, Piot C, Rouleau F, Carrie D, Nejjari M, Ohlmann P, Leclercq F, Saint Etienne C, Teiger E, Leroux L, Karam N, Michel N, Gilard M, Donal E, Trochu JN, Cormier B, Armoiry X, Boutitie F, Maucort-Boulch D, Barnel C, Samson G, Guerin P, Vahanian A, Mewton N and Investigators M-F. Percutaneous Repair or Medical Treatment for Secondary Mitral Regurgitation. *N Engl J Med.* 2018;379:2297-2306.
110. Stone GW, Lindenfeld J, Abraham WT, Kar S, Lim DS, Mishell JM, Whisenant B, Grayburn PA, Rinaldi M, Kapadia SR, Rajagopal V, Sarembock IJ, Bricke A, Marx SO, Cohen DJ, Weissman NJ, Mack MJ and Investigators C. Transcatheter Mitral-Valve Repair in Patients with Heart Failure. *N Engl J Med.* 2018;379:2307-2318.
111. Iung B, Armoiry X, Vahanian A, Boutitie F, Mewton N, Trochu JN, Lefevre T, Messika-Zeitoun D, Guerin P, Cormier B, Brochet E, Thibault H, Himbert D, Thivolet S, Leurent G, Bonnet G, Donal E, Piriou N, Piot C, Habib G, Rouleau F, Carrie D, Nejjari M, Ohlmann P, Saint Etienne C, Leroux L, Gilard M, Samson G, Rioufol G, Maucort-Boulch D, Obadia JF and Investigators M-F. Percutaneous repair or medical treatment for secondary mitral regurgitation: outcomes at 2 years. *Eur J Heart Fail.* 2019;21:1619-1627.

112. Bunout D, Gattas V, Iturriaga H, Perez C, Pereda T and Ugarte G. Nutritional status of alcoholic patients: it's possible relationship to alcoholic liver damage. *Am J Clin Nutr.* 1983;38:469-73.
113. Vahanian A, Alfieri O, Andreotti F, Antunes MJ, Baron-Esquivias G, Baumgartner H, Borger MA, Carrel TP, De Bonis M, Evangelista A, Falk V, Lung B, Lancellotti P, Pierard L, Price S, Schafers HJ, Schuler G, Stepinska J, Swedberg K, Takkenberg J, Von Oppell UO, Windecker S, Zamorano JL, Zembala M, Guidelines ESCcFP, Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of C and European Association for Cardio-Thoracic S. Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012): the Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur J Cardiothorac Surg.* 2012;42:S1-44.
114. Nishimura RA, Otto CM, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP, 3rd, Guyton RA, O'Gara PT, Ruiz CE, Skubas NJ, Sorajja P, Sundt TM, 3rd, Thomas JD, Anderson JL, Halperin JL, Albert NM, Bozkurt B, Brindis RG, Creager MA, Curtis LH, DeMets D, Guyton RA, Hochman JS, Kovacs RJ, Ohman EM, Pressler SJ, Sellke FW, Shen WK, Stevenson WG, Yancy CW, American College of C, American College of Cardiology/American Heart A and American Heart A. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2014;148:e1-e132.
115. Schmidt M, Burrell A, Roberts L, Bailey M, Sheldrake J, Rycus PT, Hodgson C, Scheinkestel C, Cooper DJ, Thiagarajan RR, Brodie D, Pellegrino V and Pilcher D. Predicting survival after ECMO for refractory cardiogenic shock: the survival after veno-arterial-ECMO (SAVE)-score. *Eur Heart J.* 2015;36:2246-56.
116. Riebandt J, Haberl T, Mahr S, Laufer G, Rajek A, Steinlechner B, Schima H and Zimpfer D. Preoperative patient optimization using extracorporeal life support improves outcomes of INTERMACS Level I patients receiving a permanent ventricular assist device. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2014;46:486-92; discussion 492.
117. O'Neill WW, Kleiman NS, Moses J, Henriques JP, Dixon S, Massaro J, Palacios I, Maini B, Mulukutla S, Dzavik V, Popma J, Douglas PS and Ohman M. A prospective, randomized clinical trial of hemodynamic support with Impella 2.5 versus intra-aortic balloon pump in patients undergoing high-risk percutaneous coronary intervention: the PROTECT II study. *Circulation.* 2012;126:1717-27.
118. Lund LH, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Dipchand AI, Benden C, Christie JD, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, Yusen RD, Stehlik J, International Society for H and Lung T. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirtieth Official Adult Heart Transplant Report--2013; focus theme: age. *J Heart Lung Transplant.* 2013;32:951-64.
119. Kormos RL, Cowger J, Pagani FD, Teuteberg JJ, Goldstein DJ, Jacobs JP, Higgins RS, Stevenson LW, Stehlik J, Atluri P, Grady KL and Kirklin JK. The Society of Thoracic Surgeons Intermaacs database annual report: Evolving indications, outcomes, and scientific partnerships. *J Heart Lung Transplant.* 2019;38:114-126.
120. Trivedi JR, Cheng A, Singh R, Williams ML and Slaughter MS. Survival on the heart transplant waiting list: impact of continuous flow left ventricular assist device as bridge to transplant. *Ann Thorac Surg.* 2014;98:830-4.
121. Slaughter MS, Rogers JG, Milano CA, Russell SD, Conte JV, Feldman D, Sun B, Tatroles AJ, Delgado RM, 3rd, Long JW, Wozniak TC, Ghumman W, Farrar DJ, Frazier OH and HeartMate III. Advanced heart failure treated with continuous-flow left ventricular assist device. *N Engl J Med.* 2009;361:2241-51.
122. Rogers JG, Pagani FD, Tatroles AJ, Bhat G, Slaughter MS, Birks EJ, Boyce SW, Najjar SS, Jeevanandam V, Anderson AS, Gregoric ID, Mallidi H, Leadley K, Aaronson KD, Frazier OH and Milano CA. Intrapericardial Left Ventricular Assist Device for Advanced Heart Failure. *N Engl J Med.* 2017;376:451-460.
123. Miller LW, Pagani FD, Russell SD, John R, Boyle AJ, Aaronson KD, Conte JV, Naka Y, Mancini D, Delgado RM, MacGillivray TE, Farrar DJ, Frazier OH and HeartMate IICI. Use of a continuous-flow device in patients awaiting heart transplantation. *N Engl J Med.* 2007;357:885-96.
124. Kirklin JK, Pagani FD, Kormos RL, Stevenson LW, Blume ED, Myers SL, Miller MA, Baldwin JT, Young JB and Naftel DC. Eighth annual INTERMACS report: Special focus on framing the impact of adverse events. *J Heart Lung Transplant.* 2017;36:1080-1086.
125. Mehra MR, Uriel N, Naka Y, Cleveland JC, Jr., Yuzefpolskaya M, Salerno CT, Walsh MN, Milano CA, Patel CB, Hutchins SW, Ransom J, Ewald GA, Itoh A, Raval NY, Silvestry SC, Cogswell R, John R, Bhimaraj A, Bruckner BA, Lowes BD, Um JY, Jeevanandam V, Sayer G, Mangi AA, Molina EJ, Sheikh F, Aaronson K, Pagani FD, Cotts WG, Tatroles AJ, Babu A, Chomsky D, Katz JN, Tessmann PB, Dean D, Krishnamoorthy A, Chuang J, Topuria I, Sood P, Goldstein DJ and Investigators M. A Fully Magnetically Levitated Left Ventricular Assist Device - Final Report. *N Engl J Med.* 2019;380:1618-1627.
126. Thompson JS, Matlock DD, McIlvennan CK, Jenkins AR and Allen LA. Development of a Decision Aid for Patients With Advanced Heart Failure Considering a Destination Therapy Left Ventricular Assist Device. *JACC Heart Fail.* 2015;3:965-76.

127. Birks EJ, Tansley PD, Hardy J, George RS, Bowles CT, Burke M, Banner NR, Khaghani A and Yacoub MH. Left ventricular assist device and drug therapy for the reversal of heart failure. *N Engl J Med.* 2006;355:1873-84.
128. Dandel M, Knosalla C and Hetzer R. Contribution of ventricular assist devices to the recovery of failing hearts: a review and the Berlin Heart Center Experience. *Eur J Heart Fail.* 2014;16:248-63.
129. Estep JD, Starling RC, Horstmannshof DA, Milano CA, Selzman CH, Shah KB, Loebe M, Moazami N, Long JW, Stehlik J, Kasirajan V, Haas DC, O'Connell JB, Boyle AJ, Farrar DJ, Rogers JG and Investigators RS. Risk Assessment and Comparative Effectiveness of Left Ventricular Assist Device and Medical Management in Ambulatory Heart Failure Patients: Results From the ROADMAP Study. *J Am Coll Cardiol.* 2015;66:1747-1761.
130. Kirklin JK, Naftel DC, Pagani FD, Kormos RL, Stevenson LW, Blume ED, Myers SL, Miller MA, Baldwin JT and Young JB. Seventh INTERMACS annual report: 15,000 patients and counting. *J Heart Lung Transplant.* 2015;34:1495-504.
131. Jorde UP, Kushwaha SS, Tatoes AJ, Naka Y, Bhat G, Long JW, Horstmannshof DA, Kormos RL, Teuteberg JJ, Slaughter MS, Birks EJ, Farrar DJ, Park SJ and HeartMate IICI. Results of the destination therapy post-food and drug administration approval study with a continuous flow left ventricular assist device: a prospective study using the INTERMACS registry (Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support). *J Am Coll Cardiol.* 2014;63:1751-7.
132. Kirsch M, Mazzucotelli JP, Roussel JC, Bouchot O, N'Loga J, Leprince P, Litzler PY, Vincentelli A and Groupe de Reflexion sur l'Assistance M. Survival after biventricular mechanical circulatory support: does the type of device matter? *J Heart Lung Transplant.* 2012;31:501-8.
133. Kirsch ME, Nguyen A, Mastroianni C, Pozzi M, Leger P, Nicolescu M, Varnous S, Pavie A and Leprince P. SynCardia temporary total artificial heart as bridge to transplantation: current results at la pitie hospital. *Ann Thorac Surg.* 2013;95:1640-6.
134. Copeland JG, Smith RG, Arabia FA, Nolan PE, Sethi GK, Tsau PH, McClellan D, Slepian MJ and CardioWest Total Artificial Heart I. Cardiac replacement with a total artificial heart as a bridge to transplantation. *N Engl J Med.* 2004;351:859-67.
135. Banner NR, Bonser RS, Clark AL, Clark S, Cowburn PJ, Gardner RS, Kalra PR, McDonagh T, Rogers CA, Swan L, Parameshwar J, Thomas HL and Williams SG. UK guidelines for referral and assessment of adults for heart transplantation. *Heart.* 2011;97:1520-7.
136. Mehra MR, Kobashigawa J, Starling R, Russell S, Uber PA, Parameshwar J, Mohacsi P, Augustine S, Aaronson K and Barr M. Listing criteria for heart transplantation: International Society for Heart and Lung Transplantation guidelines for the care of cardiac transplant candidates--2006. *J Heart Lung Transplant.* 2006;25:1024-42.
137. Khush KK, Cherikh WS, Chambers DC, Harhay MO, Hayes D, Jr., Hsieh E, Meiser B, Potena L, Robinson A, Rossano JW, Sadavarte A, Singh TP, Zuckermann A, Stehlik J, International Society for H and Lung T. The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-sixth adult heart transplantation report - 2019; focus theme: Donor and recipient size match. *J Heart Lung Transplant.* 2019;38:1056-1066.
138. Costanzo MR. Selection and treatment of candidates for heart transplantation. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 1996;8:113-25.
139. Mehra MR, Canter CE, Hannan MM, Semigran MJ, Uber PA, Baran DA, Danziger-Isakov L, Kirklin JK, Kirk R, Kushwaha SS, Lund LH, Potena L, Ross HJ, Taylor DO, Verschuuren EAM, Zuckermann A, International Society for Heart Lung Transplantation Infectious Diseases P, Heart F and Transplantation C. The 2016 International Society for Heart Lung Transplantation listing criteria for heart transplantation: A 10-year update. *J Heart Lung Transplant.* 2016;35:1-23.
140. Kannel WB. Incidence and epidemiology of heart failure. *Heart Fail Rev.* 2000;5:167-73.
141. Gillum RF. Epidemiology of heart failure in the United States. *Am Heart J.* 1993;126:1042-7.
142. Moayed Y, Alhoussein M, Duero Posada JG, Kozuszko S, Khush KK, Teuteberg JJ, Badiwala MV and Ross HJ. New Horizons on the 50th Anniversary of Heart Transplantation in Canada: "Where There Is Death, There Is Hope". *Can J Cardiol.* 2018;34:694-695.
143. Gibbon JH, Jr. Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery. *Minn Med.* 1954;37:171-85; passim.
144. DeBakey ME. Development of mechanical heart devices. *Ann Thorac Surg.* 2005;79:S2228-31.
145. DeVries WC, Anderson JL, Joyce LD, Anderson FL, Hammond EH, Jarvik RK and Kolff WJ. Clinical use of the total artificial heart. *N Engl J Med.* 1984;310:273-8.

146. Rose EA, Gelijns AC, Moskowitz AJ, Heitjan DF, Stevenson LW, Dembitsky W, Long JW, Ascheim DD, Tierney AR, Levitan RG, Watson JT, Meier P, Ronan NS, Shapiro PA, Lazar RM, Miller LW, Gupta L, Frazier OH, Desvigne-Nickens P, Oz MC, Poirier VL and Randomized Evaluation of Mechanical Assistance for the Treatment of Congestive Heart Failure Study G. Long-term use of a left ventricular assist device for end-stage heart failure. *N Engl J Med.* 2001;345:1435-43.
147. Gregory SD, Timms D, Gaddum NR, McDonald C, Percy MJ and Fraser JF. In vitro evaluation of a compliant inflow cannula reservoir to reduce suction events with extracorporeal rotary ventricular assist device support. *Artif Organs.* 2011;35:765-72.
148. Aissaoui N, Morshuis M, Paluszkiwicz L, Lauenroth V, Borgermann J and Gummert J. Comparison of biventricular and left ventricular assist devices for the management of severe right ventricular dysfunction in patients with end-stage heart failure. *ASAIO J.* 2014;60:400-6.
149. Amsallem M, Aymami M, Hiesinger W, Zeigler S, Moneghetti K, Marques M, Teuteberg J, Ha R, Banerjee D and Haddad F. Right ventricular load adaptability metrics in patients undergoing left ventricular assist device implantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2018.
150. Takeda K, Naka Y, Yang JA, Uriel N, Colombo PC, Jorde UP and Takayama H. Outcome of unplanned right ventricular assist device support for severe right heart failure after implantable left ventricular assist device insertion. *J Heart Lung Transplant.* 2014;33:141-8.
151. Lampert BC and Teuteberg JJ. Right ventricular failure after left ventricular assist devices. *J Heart Lung Transplant.* 2015;34:1123-30.
152. Loforte A, Stepanenko A, Potapov EV, Musumeci F, Dranishnikov N, Schweiger M, Montalto A, Pasic M, Weng Y, Dandel M, Siniawski H, Kukucka M, Krabatsch T and Hetzer R. Temporary right ventricular mechanical support in high-risk left ventricular assist device recipients versus permanent biventricular or total artificial heart support. *Artif Organs.* 2013;37:523-30.
153. Yoshioka D, Takayama H, Garan RA, Topkara VK, Han J, Kurlansky P, Yuzefpolskaya M, Colombo PC, Naka Y and Takeda K. Contemporary outcome of unplanned right ventricular assist device for severe right heart failure after continuous-flow left ventricular assist device insertion. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2017;24:828-834.
154. Cleveland JC, Jr., Naftel DC, Reece TB, Murray M, Antaki J, Pagani FD and Kirklin JK. Survival after biventricular assist device implantation: an analysis of the Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support database. *J Heart Lung Transplant.* 2011;30:862-9.
155. Kirsch M, Vermes E, Damy T, Nakashima K, Senechal M, Boval B, Drouet L and Loisanche D. Single-centre experience with the Thoratec paracorporeal ventricular assist device for patients with primary cardiac failure. *Arch Cardiovasc Dis.* 2009;102:509-18.
156. Slaughter MS, Tsui SS, El-Banayosy A, Sun BC, Kormos RL, Mueller DK, Massey HT, Icenogle TB, Farrar DJ, Hill JD and Group IS. Results of a multicenter clinical trial with the Thoratec Implantable Ventricular Assist Device. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007;133:1573-80.
157. Berman M, Parameshwar J, Jenkins DP, Dhital K, Lewis C, Dempster K, Lincoln P, Sudarshan C, Large SR, Dunning J and Tsui SS. Thoratec implantable ventricular assist device: the Papworth experience. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2010;139:466-73.
158. Leprince P, Bonnet N, Rama A, Leger P, Bors V, Levasseur JP, Szefer J, Vaissier E, Pavie A and Gandjbakhch I. Bridge to transplantation with the Jarvik-7 (CardioWest) total artificial heart: a single-center 15-year experience. *J Heart Lung Transplant.* 2003;22:1296-303.
159. Roussel JC, Senage T, Baron O, Perigaud C, Habash O, Rigal JC, Treilhaud M, Trochu JN, Despins P and Duveau D. CardioWest (Jarvik) total artificial heart: a single-center experience with 42 patients. *Ann Thorac Surg.* 2009;87:124-9; discussion 130.
160. Mazzucotelli JP, Leprince P, Litzler PY, Vincentelli A, Le Guyader A, Kirsch M, Camilleri L, Flecher E and reflection group on mechanical circulatory s. Results of mechanical circulatory support in France. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2011;40:e112-7.
161. Demondion P, Fournel L, Niculescu M, Pavie A and Leprince P. The challenge of home discharge with a total artificial heart: the La Pitie Salpetriere experience. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2013;44:843-8.
162. Ashfaq A, Jaroszewski DE, Pajaro OE and Arabia FA. The role of the total artificial heart in the treatment of post-myocardial infarction ventricular septal defect. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2013;145:e25-6.
163. Copeland JG, Copeland H, Gustafson M, Mineburg N, Covington D, Smith RG and Friedman M. Experience with more than 100 total artificial heart implants. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2012;143:727-34.

164. Ried M, Rupprecht L, Hirt S, Zausig Y, Grube M, Resch M, Hilker M, Hofstadter F and Schmid C. Sequential therapy of primary cardiac lymphoma with cardiectomy, total artificial heart support, and cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2010;29:707-9.
165. Morales DL, Khan MS, Gottlieb EA, Krishnamurthy R, Dreyer WJ and Adachi I. Implantation of total artificial heart in congenital heart disease. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2012;24:142-3.
166. Nguyen A, Pozzi M, Mastroianni C, Leger P, Loisance D, Pavie A, Leprince P and Kirsch M. Bridge to transplantation using paracorporeal biventricular assist devices or the syncardia temporary total artificial heart: is there a difference? *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 2015;56:493-502.
167. Arabia FA, Cantor RS, Koehl DA, Kasirajan V, Gregoric I, Moriguchi JD, Esmailian F, Ramzy D, Chung JS, Czer LS, Kobashigawa JA, Smith RG and Kirklin JK. Interagency registry for mechanically assisted circulatory support report on the total artificial heart. *J Heart Lung Transplant*. 2018;37:1304-1312.
168. Cheng A, Trivedi JR, Van Berkel VH, Massey HT and Slaughter MS. Comparison of total artificial heart and biventricular assist device support as bridge-to-transplantation. *J Card Surg*. 2016;31:648-653.
169. Tsukui H, Teuteberg JJ, Murali S, McNamara DM, Buchanan JR, Winowich S, Stanford E, Mathier MA, Cadaret LM and Kormos RL. Biventricular assist device utilization for patients with morbid congestive heart failure: a justifiable strategy. *Circulation*. 2005;112:165-72.
170. Meyer DM, Rogers JG, Edwards LB, Callahan ER, Webber SA, Johnson MR, Vega JD, Zucker MJ and Cleveland JC, Jr. The future direction of the adult heart allocation system in the United States. *Am J Transplant*. 2015;15:44-54.
171. Smedira NG, Hoercher KJ, Yoon DY, Rajeswaran J, Klingman L, Starling RC and Blackstone EH. Bridge to transplant experience: factors influencing survival to and after cardiac transplant. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2010;139:1295-305, 1305 e1-4.
172. Carpentier A, Latremouille C, Cholley B, Smadja DM, Roussel JC, Boissier E, Trochu JN, Gueffet JP, Treillot M, Bizouarn P, Meleard D, Boughenou MF, Ponzio O, Grimme M, Capel A, Jansen P, Hagege A, Desnos M, Fabiani JN and Duvieu D. First clinical use of a bioprosthetic total artificial heart: report of two cases. *Lancet*. 2015;386:1556-63.
173. Minami K, El-Banayosy A, Sezai A, Arusoglu L, Sarnowsky P, Fey O and Koerfer R. Morbidity and outcome after mechanical ventricular support using Thoratec, Novacor, and HeartMate for bridging to heart transplantation. *Artif Organs*. 2000;24:421-6.
174. Drakos SG, Kfoury AG, Long JW, Stringham JC, Gilbert EM, Moore SA, Campbell BK, Nelson KE, Horne BD and Renlund DG. Effect of mechanical circulatory support on outcomes after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2006;25:22-8.
175. Barnard CN. The operation. A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town. *S Afr Med J*. 1967;41:1271-4.
176. Mehra MR, Crespo-Leiro MG, Dipchand A, Ensminger SM, Hiemann NE, Kobashigawa JA, Madsen J, Parameshwar J, Starling RC and Uber PA. International Society for Heart and Lung Transplantation working formulation of a standardized nomenclature for cardiac allograft vasculopathy-2010. *J Heart Lung Transplant*. 2010;29:717-27.
177. Stehlik J, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Aurora P, Christie JD, Kirk R, Dobbels F, Rahmel AO and Hertz MI. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-seventh official adult heart transplant report--2010. *J Heart Lung Transplant*. 2010;29:1089-103.
178. Carrel A. Latent Life of Arteries. *J Exp Med*. 1910;12:460-86.
179. Bieber CP, Stinson EB, Shumway NE, Payne R and Kosek J. Cardiac transplantation in man. VII. Cardiac allograft pathology. *Circulation*. 1970;41:753-72.
180. Ramzy D, Rao V, Brahm J, Miriuka S, Delgado D and Ross HJ. Cardiac allograft vasculopathy: a review. *Can J Surg*. 2005;48:319-27.
181. Schmauss D and Weis M. Cardiac allograft vasculopathy: recent developments. *Circulation*. 2008;117:2131-41.
182. Tsutsui H, Ziada KM, Schoenhagen P, Iyisoy A, Magyar WA, Crowe TD, Klingensmith JD, Vince DG, Rincon G, Hobbs RE, Yamagishi M, Nissen SE and Tuzcu EM. Lumen loss in transplant coronary artery disease is a biphasic process involving early intimal thickening and late constrictive remodeling: results from a 5-year serial intravascular ultrasound study. *Circulation*. 2001;104:653-7.
183. Aranda JM, Jr. and Hill J. Cardiac transplant vasculopathy. *Chest*. 2000;118:1792-800.
184. Valentine HA. Cardiac allograft vasculopathy: central role of endothelial injury leading to transplant "atheroma". *Transplantation*. 2003;76:891-9.

185. Pethig K, Heublein B, Kutschka I and Haverich A. Systemic inflammatory response in cardiac allograft vasculopathy: high-sensitive C-reactive protein is associated with progressive luminal obstruction. *Circulation*. 2000;102:III233-6.
186. Vassalli G, Gallino A, Weis M, von Scheidt W, Kappenberger L, von Segesser LK, Goy JJ and Working Group Microcirculation of the European Society of C. Alloimmunity and nonimmunologic risk factors in cardiac allograft vasculopathy. *Eur Heart J*. 2003;24:1180-8.
187. Rahmani M, Cruz RP, Granville DJ and McManus BM. Allograft vasculopathy versus atherosclerosis. *Circ Res*. 2006;99:801-15.
188. Konig A, Kilian E, Sohn HY, Rieber J, Schiele TM, Siebert U, Gothe RM, Reichart B and Klaus V. Assessment and characterization of time-related differences in plaque composition by intravascular ultrasound-derived radiofrequency analysis in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2008;27:302-9.
189. Raichlin E, Bae JH, Kushwaha SS, Lennon RJ, Prasad A, Rihal CS and Lerman A. Inflammatory burden of cardiac allograft coronary atherosclerotic plaque is associated with early recurrent cellular rejection and predicts a higher risk of vasculopathy progression. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53:1279-86.
190. Johnson DE, Alderman EL, Schroeder JS, Gao SZ, Hunt S, DeCampi WM, Stinson E and Billingham M. Transplant coronary artery disease: histopathologic correlations with angiographic morphology. *J Am Coll Cardiol*. 1991;17:449-57.
191. Kobashigawa J. What is the optimal prophylaxis for treatment of cardiac allograft vasculopathy? *Curr Control Trials Cardiovasc Med*. 2000;1:166-171.
192. Tanaka M, Sydow K, Gunawan F, Jacobi J, Tsao PS, Robbins RC and Cooke JP. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase overexpression suppresses graft coronary artery disease. *Circulation*. 2005;112:1549-56.
193. Uehara S, Chase CM, Kitchens WH, Rose HS, Colvin RB, Russell PS and Madsen JC. NK cells can trigger allograft vasculopathy: the role of hybrid resistance in solid organ allografts. *J Immunol*. 2005;175:3424-30.
194. Jane-Wit D, Manes TD, Yi T, Qin L, Clark P, Kirkiles-Smith NC, Abrahami P, Devalliere J, Moeckel G, Kulkarni S, Tellides G and Pober JS. Alloantibody and complement promote T cell-mediated cardiac allograft vasculopathy through noncanonical nuclear factor-kappaB signaling in endothelial cells. *Circulation*. 2013;128:2504-16.
195. Chu KE, Ho EK, de la Torre L, Vasilescu ER and Marboe CC. The relationship of nodular endocardial infiltrates (Quilty lesions) to survival, patient age, anti-HLA antibodies, and coronary artery disease following heart transplantation. *Cardiovasc Pathol*. 2005;14:219-24.
196. Stewart S, Winters GL, Fishbein MC, Tazelaar HD, Kobashigawa J, Abrams J, Andersen CB, Angelini A, Berry GJ, Burke MM, Demetris AJ, Hammond E, Itescu S, Marboe CC, McManus B, Reed EF, Reinsmoen NL, Rodriguez ER, Rose AG, Rose M, Suci-Focia N, Zeevi A and Billingham ME. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24:1710-20.
197. Michaels PJ, Espejo ML, Kobashigawa J, Alejos JC, Burch C, Takemoto S, Reed EF and Fishbein MC. Humoral rejection in cardiac transplantation: risk factors, hemodynamic consequences and relationship to transplant coronary artery disease. *J Heart Lung Transplant*. 2003;22:58-69.
198. Bian H and Reed EF. Alloantibody-mediated class I signal transduction in endothelial cells and smooth muscle cells: enhancement by IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol*. 1999;163:1010-8.
199. Reed EF, Hong B, Ho E, Harris PE, Weinberger J and Suci-Foca N. Monitoring of soluble HLA alloantigens and anti-HLA antibodies identifies heart allograft recipients at risk of transplant-associated coronary artery disease. *Transplantation*. 1996;61:566-72.
200. Zhang XP, Kelemen SE and Eisen HJ. Quantitative assessment of cell adhesion molecule gene expression in endomyocardial biopsy specimens from cardiac transplant recipients using competitive polymerase chain reaction. *Transplantation*. 2000;70:505-13.
201. Harris PE, Bian H and Reed EF. Induction of high affinity fibroblast growth factor receptor expression and proliferation in human endothelial cells by anti-HLA antibodies: a possible mechanism for transplant atherosclerosis. *J Immunol*. 1997;159:5697-704.
202. Jindra PT, Jin YP, Rozengurt E and Reed EF. HLA class I antibody-mediated endothelial cell proliferation via the mTOR pathway. *J Immunol*. 2008;180:2357-66.
203. Tambur AR, Pamboukian SV, Costanzo MR, Herrera ND, Dunlap S, Montpetit M and Heroux A. The presence of HLA-directed antibodies after heart transplantation is associated with poor allograft outcome. *Transplantation*. 2005;80:1019-25.
204. Colvin-Adams M and Agnihotri A. Cardiac allograft vasculopathy: current knowledge and future direction. *Clin Transplant*. 2011;25:175-84.

205. Moseley EL, Atkinson C, Sharples LD, Wallwork J and Goddard MJ. Deposition of C4d and C3d in cardiac transplants: a factor in the development of coronary artery vasculopathy. *J Heart Lung Transplant*. 2010;29:417-23.
206. Poelzl G, Ullrich R, Huber A, Ulmer H, Antretter H, Hofer D, Mairinger T, Laufer G, Pachinger O and Schwarzacher S. Capillary deposition of the complement fragment C4d in cardiac allograft biopsies is associated with allograft vasculopathy. *Transpl Int*. 2005;18:313-7.
207. Patel J, Everly M, Chang D, Kittleson M, Reed E and Kobashigawa J. Reduction of alloantibodies via proteasome inhibition in cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2011;30:1320-6.
208. Eckman PM, Hanna M, Taylor DO, Starling RC and Gonzalez-Stawinski GV. Management of the sensitized adult heart transplant candidate. *Clin Transplant*. 2010;24:726-34.
209. Kaczmarek I, Deutsch MA, Kauke T, Beiras-Fernandez A, Schmoeckel M, Vicol C, Sodian R, Reichart B, Spannagl M and Ueberfuhr P. Donor-specific HLA alloantibodies: long-term impact on cardiac allograft vasculopathy and mortality after heart transplant. *Exp Clin Transplant*. 2008;6:229-35.
210. Dunn MJ, Crisp SJ, Rose ML, Taylor PM and Yacoub MH. Anti-endothelial antibodies and coronary artery disease after cardiac transplantation. *Lancet*. 1992;339:1566-70.
211. Zimmer RJ and Lee MS. Transplant coronary artery disease. *JACC Cardiovasc Interv*. 2010;3:367-77.
212. Shah KB and Parameshwar J. Advances in heart transplantation: the year in review. *J Heart Lung Transplant*. 2011;30:241-6.
213. Kemna MS, Valantine HA, Hunt SA, Schroeder JS, Chen YD and Reaven GM. Metabolic risk factors for atherosclerosis in heart transplant recipients. *Am Heart J*. 1994;128:68-72.
214. Kirklin JK, Benza RL, Rayburn BK and McGiffin DC. Strategies for minimizing hyperlipidemia after cardiac transplantation. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2002;2:377-87.
215. Valantine H. Cardiac allograft vasculopathy after heart transplantation: risk factors and management. *J Heart Lung Transplant*. 2004;23:S187-93.
216. Radovancevic B, Poindexter S, Birovljev S, Velebit V, McAllister HA, Duncan JM, Vega D, Lonquist J, Burnett CM and Frazier OH. Risk factors for development of accelerated coronary artery disease in cardiac transplant recipients. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1990;4:309-12; discussion 313.
217. Kutschka I, Pethig K, Struber M, Dieterich C, Harringer W and Haverich A. Homocysteine--a treatable risk factor for allograft vascular disease after heart transplantation? *J Heart Lung Transplant*. 2001;20:743-6.
218. Li H, Tanaka K, Anzai H, Oeser B, Lai D, Kobashigawa JA and Tobis JM. Influence of pre-existing donor atherosclerosis on the development of cardiac allograft vasculopathy and outcomes in heart transplant recipients. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47:2470-6.
219. Stehlik J, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Christie JD, Dipchand AI, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, Hertz MI, International Society of H and Lung T. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 29th official adult heart transplant report--2012. *J Heart Lung Transplant*. 2012;31:1052-64.
220. Szabo G, Buhmann V, Bahrle S, Vahl CF and Hagl S. Brain death impairs coronary endothelial function. *Transplantation*. 2002;73:1846-8.
221. Yamani MH, Starling RC, Cook DJ, Tuzcu EM, Abdo A, Paul P, Powell K, Ratliff NB, Yu Y, McCarthy PM and Young JB. Donor spontaneous intracerebral hemorrhage is associated with systemic activation of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 and subsequent development of coronary vasculopathy in the heart transplant recipient. *Circulation*. 2003;108:1724-8.
222. Fodinger M, Wagner OF, Horl WH and Sunder-Plassmann G. Recent insights into the molecular genetics of the homocysteine metabolism. *Kidney Int Suppl*. 2001;78:S238-42.
223. Costanzo MR, Naftel DC, Pritzker MR, Heilman JK, 3rd, Boehmer JP, Brozena SC, Dec GW, Ventura HO, Kirklin JK, Bourge RC and Miller LW. Heart transplant coronary artery disease detected by coronary angiography: a multiinstitutional study of preoperative donor and recipient risk factors. Cardiac Transplant Research Database. *J Heart Lung Transplant*. 1998;17:744-53.
224. Jonas M, Fang JC, Wang JC, Giri S, Elian D, Har-Zahav Y, Ly H, Seifert PA, Popma JJ and Rogers C. In-stent restenosis and remote coronary lesion progression are coupled in cardiac transplant vasculopathy but not in native coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48:453-61.
225. Crespo-Leiro MG, Rodriguez JA, Portela F, Paniagua MJ, Muniz J, Hermida LF, Vazquez N, Cuenca JJ, Juffe-Stein A and Castro-Beiras A. Coronary artery disease transmitted by donors older than 40 years: prevalence and prognosis. *Transplant Proc*. 1999;31:2542-3.
226. Raichlin E, Kushwaha SS, Daly RC, Kremers WK, Frantz RP, Clavell AL, Rodeheffer RJ, Larson TS, Stegall MD, McGregor C, Pereira NL and Edwards BS. Combined heart and kidney transplantation provides an

- excellent survival and decreases risk of cardiac cellular rejection and coronary allograft vasculopathy. *Transplant Proc.* 2011;43:1871-6.
227. Delgado JF, Reyne AG, de Dios S, Lopez-Medrano F, Jurado A, Juan RS, Ruiz-Cano MJ, Dolores Folgueira M, Gomez-Sanchez MA, Aguado JM and Lumbreras C. Influence of cytomegalovirus infection in the development of cardiac allograft vasculopathy after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2015;34:1112-9.
228. Koskinen PK. The association of the induction of vascular cell adhesion molecule-1 with cytomegalovirus antigenemia in human heart allografts. *Transplantation.* 1993;56:1103-8.
229. Weis M, Kledal TN, Lin KY, Panchal SN, Gao SZ, Valantine HA, Mocarski ES and Cooke JP. Cytomegalovirus infection impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine in transplant arteriosclerosis. *Circulation.* 2004;109:500-5.
230. Lunardi C, Bason C, Corrocher R and Puccetti A. Induction of endothelial cell damage by hCMV molecular mimicry. *Trends Immunol.* 2005;26:19-24.
231. Costanzo MR, Dipchand A, Starling R, Anderson A, Chan M, Desai S, Fedson S, Fisher P, Gonzales-Stawinski G, Martinelli L, McGiffin D, Smith J, Taylor D, Meiser B, Webber S, Baran D, Carboni M, Dengler T, Feldman D, Frigerio M, Kfoury A, Kim D, Kobashigawa J, Shullo M, Stehlik J, Teuteberg J, Uber P, Zuckermann A, Hunt S, Burch M, Bhat G, Canter C, Chinnock R, Crespo-Leiro M, Delgado R, Dobbels F, Grady K, Kao W, Lamour J, Parry G, Patel J, Pini D, Towbin J, Wolfel G, Delgado D, Eisen H, Goldberg L, Hosenpud J, Johnson M, Keogh A, Lewis C, O'Connell J, Rogers J, Ross H, Russell S, Vanhaecke J, International Society of H and Lung Transplantation G. The International Society of Heart and Lung Transplantation Guidelines for the care of heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant.* 2010;29:914-56.
232. Schoenhagen P and Nissen S. Understanding coronary artery disease: tomographic imaging with intravascular ultrasound. *Heart.* 2002;88:91-6.
233. Rickenbacher PR, Pinto FJ, Lewis NP, Hunt SA, Alderman EL, Schroeder JS, Stinson EB, Brown BW and Valantine HA. Prognostic importance of intimal thickness as measured by intracoronary ultrasound after cardiac transplantation. *Circulation.* 1995;92:3445-52.
234. Mehra MR, Ventura HO, Stapleton DD, Smart FW, Collins TC and Ramee SR. Presence of severe intimal thickening by intravascular ultrasonography predicts cardiac events in cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant.* 1995;14:632-9.
235. Kobashigawa JA, Tobis JM, Starling RC, Tuzcu EM, Smith AL, Valantine HA, Yeung AC, Mehra MR, Anzai H, Oeser BT, Abeywickrama KH, Murphy J and Cretin N. Multicenter intravascular ultrasound validation study among heart transplant recipients: outcomes after five years. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45:1532-7.
236. Cassar A, Matsuo Y, Herrmann J, Li J, Lennon RJ, Gulati R, Lerman LO, Kushwaha SS and Lerman A. Coronary atherosclerosis with vulnerable plaque and complicated lesions in transplant recipients: new insight into cardiac allograft vasculopathy by optical coherence tomography. *Eur Heart J.* 2013;34:2610-7.
237. Ichibori Y, Ohtani T, Nakatani D, Tachibana K, Yamaguchi O, Toda K, Akasaka T, Fukushima N, Sawa Y, Komuro I, Kotani J and Sakata Y. Optical coherence tomography and intravascular ultrasound evaluation of cardiac allograft vasculopathy with and without intimal neovascularization. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2016;17:51-8.
238. Dong L, Maehara A, Nazif TM, Pollack AT, Saito S, Rabbani LE, Apfelbaum MA, Dalton K, Moses JW, Jorde UP, Xu K, Mintz GS, Mancini DM and Weisz G. Optical coherence tomographic evaluation of transplant coronary artery vasculopathy with correlation to cellular rejection. *Circ Cardiovasc Interv.* 2014;7:199-206.
239. Fearon WF, Nakamura M, Lee DP, Rezaee M, Vagelos RH, Hunt SA, Fitzgerald PJ, Yock PG and Yeung AC. Simultaneous assessment of fractional and coronary flow reserves in cardiac transplant recipients: Physiologic Investigation for Transplant Arteriopathy (PITA Study). *Circulation.* 2003;108:1605-10.
240. Romeo G, Houyel L, Angel CY, Brenot P, Riou JY and Paul JF. Coronary stenosis detection by 16-slice computed tomography in heart transplant patients: comparison with conventional angiography and impact on clinical management. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45:1826-31.
241. Bogot NR, Durst R, Shaham D and Admon D. Cardiac CT of the transplanted heart: indications, technique, appearance, and complications. *Radiographics.* 2007;27:1297-309.
242. Gregory SA, Ferencik M, Achenbach S, Yeh RW, Hoffmann U, Inglessis I, Cury RC, Nieman K, McNulty IA, Laffan JA, Pomerantsev EV, Brady TJ, Semigran MJ and Jang IK. Comparison of sixty-four-slice multidetector computed tomographic coronary angiography to coronary angiography with intravascular ultrasound for the detection of transplant vasculopathy. *Am J Cardiol.* 2006;98:877-84.
243. Sigurdsson G, Carrascosa P, Yamani MH, Greenberg NL, Perrone S, Lev G, Desai MY and Garcia MJ. Detection of transplant coronary artery disease using multidetector computed tomography with adaptive multisegment reconstruction. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:772-8.

244. Schepis T, Achenbach S, Weyand M, Raum P, Marwan M, Pflederer T, Daniel WG, Tandler R, Kondruweit M and Ropers D. Comparison of dual source computed tomography versus intravascular ultrasound for evaluation of coronary arteries at least one year after cardiac transplantation. *Am J Cardiol.* 2009;104:1351-6.
245. Iyengar S, Feldman DS, Cooke GE, Leier CV and Raman SV. Detection of coronary artery disease in orthotopic heart transplant recipients with 64-detector row computed tomography angiography. *J Heart Lung Transplant.* 2006;25:1363-6.
246. Nunoda S, Machida H, Sekikawa A, Shitakura K, Okajima K, Kubo Y, Ueno E and Otsuka K. Evaluation of cardiac allograft vasculopathy by multidetector computed tomography and whole-heart magnetic resonance coronary angiography. *Circ J.* 2010;74:946-53.
247. Pichler P, Loewe C, Roedler S, Syeda B, Stadler A, Aliabadi A, Schukro C, Wolf F, Zuckermann A, Lammer J, Sochor H and Glogar D. Detection of high-grade stenoses with multislice computed tomography in heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant.* 2008;27:310-6.
248. Haddad F, Khazanie P, Deuse T, Weisshaar D, Zhou J, Nam CW, Vu TA, Gomari FA, Skhiri M, Simos A, Schnittger I, Vrotvec B, Hunt SA and Fearon WF. Clinical and functional correlates of early microvascular dysfunction after heart transplantation. *Circ Heart Fail.* 2012;5:759-68.
249. Muehling OM, Panse P, Jerosch-Herold M, Wilson BV, Wilson RF, Wilke NM and Miller LW. Cardiac magnetic resonance perfusion imaging identifies transplant arteriopathy by a reduced endomyocardial resting perfusion. *J Heart Lung Transplant.* 2005;24:1122-3.
250. Machida H, Nunoda S, Okajima K, Shitakura K, Sekikawa A, Kubo Y, Otsuka K, Hirata M, Kojima S and Ueno E. Magnetic resonance assessment of left ventricular diastolic dysfunction for detecting cardiac allograft vasculopathy in recipients of heart transplants. *Int J Cardiovasc Imaging.* 2012;28:555-62.
251. Steen H, Merten C, Refle S, Klingenberg R, Dengler T, Giannitsis E and Katus HA. Prevalence of different gadolinium enhancement patterns in patients after heart transplantation. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52:1160-7.
252. Hognestad A, Endresen K, Wergeland R, Stokke O, Geiran O, Holm T, Simonsen S, Kjekshus JK and Andreassen AK. Plasma C-reactive protein as a marker of cardiac allograft vasculopathy in heart transplant recipients. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:477-82.
253. Kerman RH, Susskind B, Kerman D, Lam M, Gerolami K, Williams J, Kalish R, Campbell M, Katz S, Van Buren CT, Frazier H, Radovancevic B, Fife S and Kahan B. Comparison of PRA-STAT, sHLA-EIA, and anti-human globulin-panel reactive antibody to identify alloreactivity in pretransplantation sera of heart transplant recipients: correlation to rejection and posttransplantation coronary artery disease. *J Heart Lung Transplant.* 1998;17:789-94.
254. Kobashigawa JA. Statins and cardiac allograft vasculopathy after heart transplantation. *Semin Vasc Med.* 2004;4:401-6.
255. Stein W, Schrepfer S, Itoh S, Kimura N, Velotta J, Palmer O, Bartos J, Wang X, Robbins RC and Fischbein MP. Prevention of transplant coronary artery disease by prenylation inhibitors. *J Heart Lung Transplant.* 2011;30:761-9.
256. Kobashigawa JA, Katznelson S, Laks H, Johnson JA, Yeatman L, Wang XM, Chia D, Terasaki PI, Sabad A, Cogert GA and et al. Effect of pravastatin on outcomes after cardiac transplantation. *N Engl J Med.* 1995;333:621-7.
257. Wenke K, Meiser B, Thiery J, Nagel D, von Scheidt W, Krobot K, Steinbeck G, Seidel D and Reichart B. Simvastatin initiated early after heart transplantation: 8-year prospective experience. *Circulation.* 2003;107:93-7.
258. Weis M, Pehlivanli S, Meiser BM and von Scheidt W. Simvastatin treatment is associated with improvement in coronary endothelial function and decreased cytokine activation in patients after heart transplantation. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38:814-8.
259. Bae JH, Rihal CS, Edwards BS, Kushwaha SS, Mathew V, Prasad A, Holmes DR, Jr. and Lerman A. Association of angiotensin-converting enzyme inhibitors and serum lipids with plaque regression in cardiac allograft vasculopathy. *Transplantation.* 2006;82:1108-11.
260. Erinc K, Yamani MH, Starling RC, Crowe T, Hobbs R, Bott-Silverman C, Rincon G, Young JB, Feng J, Cook DJ, Smedira N and Tuzcu EM. The effect of combined Angiotensin-converting enzyme inhibition and calcium antagonism on allograft coronary vasculopathy validated by intravascular ultrasound. *J Heart Lung Transplant.* 2005;24:1033-8.
261. Yousufuddin M, Cook DJ, Starling RC, Abdo A, Paul P, Tuzcu EM, Ratliff NB, McCarthy PM, Young JB and Yamani MH. Angiotensin II receptors from peritransplantation through first-year post-transplantation and the risk of transplant coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43:1565-73.
262. Fearon WF, Okada K, Kobashigawa JA, Kobayashi Y, Luikart H, Sana S, Daun T, Chmura SA, Sinha S, Cohen G, Honda Y, Pham M, Lewis DB, Bernstein D, Yeung AC, Valentine HA and Khush K. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition Early After Heart Transplantation. *J Am Coll Cardiol.* 2017;69:2832-2841.

263. Fang JC, Kinlay S, Beltrame J, Hikiti H, Wainstein M, Behrendt D, Suh J, Frei B, Mudge GH, Selwyn AP and Ganz P. Effect of vitamins C and E on progression of transplant-associated arteriosclerosis: a randomised trial. *Lancet*. 2002;359:1108-13.
264. Kim M, Bergmark BA, Zelniker TA, Mehra MR, Stewart GC, Page DS, Woodcome EL, Smallwood JA, Gabardi S and Givertz MM. Early aspirin use and the development of cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant*. 2017;36:1344-1349.
265. Kaczmarek I, Ertl B, Schmauss D, Sadoni S, Knez A, Daebritz S, Meiser B and Reichart B. Preventing cardiac allograft vasculopathy: long-term beneficial effects of mycophenolate mofetil. *J Heart Lung Transplant*. 2006;25:550-6.
266. Kobashigawa JA, Patel J, Furukawa H, Moriguchi JD, Yeatman L, Takemoto S, Marquez A, Shaw J, Oeser BT, Subherwal S, Wu GW, Kawano J and Laks H. Five-year results of a randomized, single-center study of tacrolimus vs microemulsion cyclosporine in heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant*. 2006;25:434-9.
267. Guethoff S, Meiser BM, Groetzner J, Eifert S, Grininger C, Ueberfuhr P, Reichart B, Hagl C and Kaczmarek I. Ten-year results of a randomized trial comparing tacrolimus versus cyclosporine a in combination with mycophenolate mofetil after heart transplantation. *Transplantation*. 2013;95:629-34.
268. Murphy GJ, Bicknell GR and Nicholson ML. Rapamycin inhibits vascular remodeling in an experimental model of allograft vasculopathy and attenuates associated changes in fibrosis-associated gene expression. *J Heart Lung Transplant*. 2003;22:533-41.
269. Avery RK. Cardiac-allograft vasculopathy. *N Engl J Med*. 2003;349:829-30.
270. Keogh A, Richardson M, Ruygrok P, Spratt P, Galbraith A, O'Driscoll G, Macdonald P, Esmore D, Muller D and Faddy S. Sirolimus in de novo heart transplant recipients reduces acute rejection and prevents coronary artery disease at 2 years: a randomized clinical trial. *Circulation*. 2004;110:2694-700.
271. Eisen HJ, Kobashigawa J, Starling RC, Pauly DF, Kfoury A, Ross H, Wang SS, Cantin B, Van Bakel A, Ewald G, Hirt S, Lehmkuhl H, Keogh A, Rinaldi M, Potena L, Zuckermann A, Dong G, Cornu-Artis C and Lopez P. Everolimus versus mycophenolate mofetil in heart transplantation: a randomized, multicenter trial. *Am J Transplant*. 2013;13:1203-16.
272. Kaczmarek I, Zaruba MM, Beiras-Fernandez A, Reimann R, Nickel T, Grininger C, Sadoni S, Hagl C and Meiser B. Tacrolimus with mycophenolate mofetil or sirolimus compared with calcineurin inhibitor-free immunosuppression (sirolimus/mycophenolate mofetil) after heart transplantation: 5-year results. *J Heart Lung Transplant*. 2013;32:277-84.
273. Bader FM, Kfoury AG, Gilbert EM, Barry WH, Humayun N, Hagan ME, Thomas H and Renlund D. Percutaneous coronary interventions with stents in cardiac transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2006;25:298-301.
274. Simpson L, Lee EK, Hott BJ, Vega DJ and Book WM. Long-term results of angioplasty vs stenting in cardiac transplant recipients with allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24:1211-7.
275. Lee MS, Kobashigawa J and Tobis J. Comparison of percutaneous coronary intervention with bare-metal and drug-eluting stents for cardiac allograft vasculopathy. *JACC Cardiovasc Interv*. 2008;1:710-5.
276. Fernandez-Yanez J, Palomo J, Elizaga J, Moreno J, Sanchez A and Almendral J. Results of percutaneous revascularization in cardiac allograft vascular disease. *Transplant Proc*. 2003;35:1996-8.
277. McKay M, Pinney S, Gorwara S, Burke EM, Sciacca RR, Apfelbaum M, Mancini D, Itescu S and Rabbani LE. Anti-human leukocyte antigen antibodies are associated with restenosis after percutaneous coronary intervention for cardiac allograft vasculopathy. *Transplantation*. 2005;79:1581-7.
278. Wellnhofer E, Hiemann NE, Hug J, Dreysse S, Knosalla C, Graf K, Meyer R, Lehmkuhl HB, Hetzer R and Fleck E. A decade of percutaneous coronary interventions in cardiac transplant recipients: a monocentric study in 160 patients. *J Heart Lung Transplant*. 2008;27:17-25.
279. Patel VS, Radovancevic B, Springer W, Frazier OH, Massin E, Benrey J, Kadipasaoglu K and Cooley DA. Revascularization procedures in patients with transplant coronary artery disease. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1997;11:895-901.
280. Bhama JK, Nguyen DQ, Scolieri S, Teuteberg JJ, Toyoda Y, Kormos RL, McCurry KR, McNamara D and Bermudez CA. Surgical revascularization for cardiac allograft vasculopathy: Is it still an option? *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2009;137:1488-92.
281. Copeland H, Coelho-Anderson R, Mineburg N, McCarthy M and Copeland JG. Elective cardiac retransplantation: a viable option that can be repeated. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2011;141:822-7.
282. Costanzo-Nordin MR. Cardiac allograft vasculopathy: relationship with acute cellular rejection and histocompatibility. *J Heart Lung Transplant*. 1992;11:S90-103.

283. Topkara VK, Dang NC, John R, Cheema FH, Barbato R, Cavallo M, Liu JF, Liang LM, Liberman EA, Argenziano M, Oz MC and Naka Y. A decade experience of cardiac retransplantation in adult recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24:1745-50.
284. Gao SZ, Schroeder JS, Hunt S and Stinson EB. Retransplantation for severe accelerated coronary artery disease in heart transplant recipients. *Am J Cardiol*. 1988;62:876-81.
285. Vassalli G, Fleury S, Li J, Goy JJ, Kappenberger L and von Segesser LK. Gene transfer of cytoprotective and immunomodulatory molecules for prevention of cardiac allograft rejection. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2003;24:794-806.
286. Fedak PW, Rao V, Verma S, Ramzy D, Tumiati L, Miriuka S, Boylen P, Weisel RD and Feindel CM. Combined endothelial and myocardial protection by endothelin antagonism enhances transplant allograft preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005;129:407-15.
287. Deuse T, Hua X, Taylor V, Stubbendorff M, Baluom M, Chen Y, Park G, Velden J, Streichert T, Reichenspurner H, Robbins RC and Schrepfer S. Significant reduction of acute cardiac allograft rejection by selective janus kinase-1/3 inhibition using R507 and R545. *Transplantation*. 2012;94:695-702.
288. Nadig SN, Wieckiewicz J, Wu DC, Warnecke G, Zhang W, Luo S, Schioppa A, Taggart DP and Wood KJ. In vivo prevention of transplant arteriosclerosis by ex vivo-expanded human regulatory T cells. *Nat Med*. 2010;16:809-13.
289. Macphee IA, Fredericks S, Tai T, Syrris P, Carter ND, Johnston A, Goldberg L and Holt DW. Tacrolimus pharmacogenetics: polymorphisms associated with expression of cytochrome p4503A5 and P-glycoprotein correlate with dose requirement. *Transplantation*. 2002;74:1486-9.
290. Deng MC, Eisen HJ, Mehra MR, Billingham M, Marboe CC, Berry G, Kobashigawa J, Johnson FL, Starling RC, Murali S, Pauly DF, Baron H, Wohlgemuth JG, Woodward RN, Klingler TM, Walther D, Lal PG, Rosenberg S, Hunt S and Investigators C. Noninvasive discrimination of rejection in cardiac allograft recipients using gene expression profiling. *Am J Transplant*. 2006;6:150-60.
291. Mehra MR and Uber PA. Genomic biomarkers and heart transplantation. *Heart Fail Clin*. 2007;3:83-6.
292. Pham MX, Deng MC, Kfoury AG, Teuteberg JJ, Starling RC and Valentine H. Molecular testing for long-term rejection surveillance in heart transplant recipients: design of the Invasive Monitoring Attenuation Through Gene Expression (IMAGE) trial. *J Heart Lung Transplant*. 2007;26:808-14.
293. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Jessup M, Konstam MA, Mancini DM, Michl K, Oates JA, Rahko PS, Silver MA, Stevenson LW, Yancy CW, Antman EM, Smith SC, Jr., Adams CD, Anderson JL, Faxon DP, Fuster V, Halperin JL, Hiratzka LF, Jacobs AK, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B, American College of C, American Heart Association Task Force on Practice G, American College of Chest P, International Society for H, Lung T and Heart Rhythm S. ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation*. 2005;112:e154-235.
294. *Health, United States, 2004: With Chartbook on Trends in the Health of Americans* Hyattsville (MD); 2004.
295. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B and Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003;114:763-76.
296. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A and Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001;410:701-5.
297. Wagers AJ and Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell*. 2004;116:639-48.
298. Zipori D. The stem state: plasticity is essential, whereas self-renewal and hierarchy are optional. *Stem Cells*. 2005;23:719-26.
299. Blau HM, Brazelton TR and Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*. 2001;105:829-41.
300. Fuchs E, Tumber T and Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*. 2004;116:769-78.
301. Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, Nolte J, Wolf F, Li M, Engel W and Hasenfuss G. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature*. 2006;440:1199-203.

302. Amidi F, Ataie Nejad N, Agha Hoseini M, Nayernia K, Mazaheri Z, Yamini N and Saeednia S. In vitro differentiation process of human Wharton's jelly mesenchymal stem cells to male germ cells in the presence of gonadal and non-gonadal conditioned media with retinoic acid. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2015;51:1093-101.
303. Hristov M, Keymel S and Weber C. [The therapeutic effect of autologous bone marrow cells in ischemic heart disease]. *Med Klin (Munich).* 2006;101 Suppl 1:186-9.
304. Leri A, Kajstura J and Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev.* 2005;85:1373-416.
305. Fraser JK, Schreiber RE, Zuk PA and Hedrick MH. Adult stem cell therapy for the heart. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36:658-66.
306. Muller P, Beltrami AP, Cesselli D, Pfeiffer P, Kazakov A and Bohm M. Myocardial regeneration by endogenous adult progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;39:377-87.
307. Fukuda K and Yuasa S. Stem cells as a source of regenerative cardiomyocytes. *Circ Res.* 2006;98:1002-13.
308. Caplice NM, Gersh BJ and Alegria JR. Cell therapy for cardiovascular disease: what cells, what diseases and for whom? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2005;2:37-43.
309. Hodgson DM, Behfar A, Zingman LV, Kane GC, Perez-Terzic C, Alekseev AE, Puceat M and Terzic A. Stable benefit of embryonic stem cell therapy in myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287:H471-9.
310. Iglesias-Garcia O, Baumgartner S, Macri-Pellizzeri L, Rodriguez-Madoz JR, Abizanda G, Guruceaga E, Albiasu E, Corbacho D, Benavides-Vallve C, Soriano-Navarro M, Gonzalez-Granero S, Gavira JJ, Krausgrill B, Rodriguez-Manero M, Garcia-Verdugo JM, Ortiz-de-Solorzano C, Halbach M, Hescheler J, Pelacho B and Prosper F. Neuregulin-1beta induces mature ventricular cardiac differentiation from induced pluripotent stem cells contributing to cardiac tissue repair. *Stem Cells Dev.* 2015;24:484-96.
311. Zhang J, Wu Y, Chen A and Zhao Q. Mesenchymal stem cells promote cardiac muscle repair via enhanced neovascularization. *Cell Physiol Biochem.* 2015;35:1219-29.
312. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, Ishino K, Ishida H, Shimizu T, Kangawa K, Sano S, Okano T, Kitamura S and Mori H. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med.* 2006;12:459-65.
313. Kawamoto A, Iwasaki H, Kusano K, Murayama T, Oyamada A, Silver M, Hulbert C, Gavin M, Hanley A, Ma H, Kearney M, Zak V, Asahara T and Losordo DW. CD34-positive cells exhibit increased potency and safety for therapeutic neovascularization after myocardial infarction compared with total mononuclear cells. *Circulation.* 2006;114:2163-9.
314. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G and Wernet P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation.* 2002;106:1913-8.
315. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, Czer LS, Marban L, Mendizabal A, Johnston PV, Russell SD, Schuleri KH, Lardo AC, Gerstenblith G and Marban E. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet.* 2012;379:895-904.
316. Li W, Lu Y, Han R, Yue Q, Song X, Wang F, Wu R, Hou F, Yang L, Xu L, Zhao R and Hu J. Gremlin2 Regulates the Differentiation and Function of Cardiac Progenitor Cells via the Notch Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem.* 2018;47:579-589.
317. Menasche P. Stem cell therapy for heart failure: are arrhythmias a real safety concern? *Circulation.* 2009;119:2735-40.
318. Ventura C, Cantoni S, Bianchi F, Lionetti V, Cavallini C, Scarlata I, Foroni L, Maioli M, Bonsi L, Alviano F, Fossati V, Bagnara GP, Pasquinelli G, Recchia FA and Perbellini A. Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic Acid drive cardiac and endothelial fate in term placenta human mesenchymal stem cells and enhance cardiac repair in infarcted rat hearts. *J Biol Chem.* 2007;282:14243-52.
319. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML and Schneider MD. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:12313-8.
320. Gneocchi M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, Mu H, Melo LG, Pratt RE, Ingwall JS and Dzau VJ. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J.* 2006;20:661-9.
321. Zhang M, Mal N, Kiedrowski M, Chacko M, Askari AT, Popovic ZB, Koc ON and Penn MS. SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. *FASEB J.* 2007;21:3197-207.

322. Ahmed RP, Ashraf M, Buccini S, Shujia J and Haider H. Cardiac tumorigenic potential of induced pluripotent stem cells in an immunocompetent host with myocardial infarction. *Regen Med.* 2011;6:171-8.
323. Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol.* 2002;12:502-8.
324. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S and Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell.* 2001;105:369-77.
325. Bhatia M, Wang JC, Kapp U, Bonnet D and Dick JE. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:5320-5.
326. Spangrude GJ, Heimfeld S and Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science.* 1988;241:58-62.
327. Osawa M, Hanada K, Hamada H and Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science.* 1996;273:242-5.
328. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G and Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science.* 1998;279:1528-30.
329. Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM and Mulligan RC. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature.* 1999;401:390-4.
330. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK and Goodell MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest.* 2001;107:1395-402.
331. Grant MB, May WS, Caballero S, Brown GA, Guthrie SM, Mames RN, Byrne BJ, Vaught T, Spoerri PE, Peck AB and Scott EW. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med.* 2002;8:607-12.
332. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS and Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science.* 1999;284:1168-70.
333. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL and Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med.* 2000;6:1229-34.
334. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A and Anversa P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;938:221-9; discussion 229-30.
335. Fridenshtein A. [Stromal bone marrow cells and the hematopoietic microenvironment]. *Arkh Patol.* 1982;44:3-11.
336. Haynesworth SE, Baber MA and Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone.* 1992;13:69-80.
337. Gronthos S and Simmons PJ. The biology and application of human bone marrow stromal cell precursors. *J Hematother.* 1996;5:15-23.
338. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997;276:71-4.
339. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA and Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 2002;418:41-9.
340. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH and Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest.* 2002;109:337-46.
341. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS and Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest.* 2002;109:1291-302.
342. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A and Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest.* 1999;103:697-705.
343. Hakuno D, Fukuda K, Makino S, Konishi F, Tomita Y, Manabe T, Suzuki Y, Umezawa A and Ogawa S. Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation.* 2002;105:380-6.
344. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S and Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284:143-7.
345. Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, Zhang JJ, Chunhua RZ, Liao LM, Lin S and Sun JP. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2004;94:92-5.
346. Wojakowski W, Tendera M, Michalowska A, Majka M, Kucia M, Maslankiewicz K, Wyderka R, Ochala A and Ratajczak MZ. Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells

- expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2004;110:3213-20.
347. Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, Park KW, Cho HJ, Koo BK, Kim YJ, Soo Lee D, Sohn DW, Han KS, Oh BH, Lee MM and Park YB. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet*. 2004;363:751-6.
348. Bartunek J, Vanderheyden M, Vandekerckhove B, Mansour S, De Bruyne B, De Bondt P, Van Haute I, Lootens N, Heyndrickx G and Wijns W. Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety. *Circulation*. 2005;112:1178-83.
349. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R, Masaki H, Mori Y, Iba O, Tateishi E, Kosaki A, Shintani S, Murohara T, Imaizumi T and Iwasaka T. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation*. 2001;104:1046-52.
350. Lee SH, Hong JH, Cho KH, Noh JW and Cho HJ. Discrepancy between short-term and long-term effects of bone marrow-derived cell therapy in acute myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7:153.
351. Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A, McGann LE and Elliott JA. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology*. 2015;71:181-97.
352. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P and Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13:4279-95.
353. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP and Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7:211-28.
354. Sheykhhasan M, Qomi RT and Ghiasi M. Fibrin Scaffolds Designing in order to Human Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells Differentiation to Chondrocytes in the Presence of TGF-beta3. *Int J Stem Cells*. 2015;8:219-27.
355. Sheykhhasan M, Qomi RT, Kalhor N, Mehdizadeh M and Ghiasi M. Evaluation of the ability of natural and synthetic scaffolds in providing an appropriate environment for growth and chondrogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Indian J Orthop*. 2015;49:561-8.
356. Alvarez-Viejo M, Menendez-Menendez Y and Otero-Hernandez J. CD271 as a marker to identify mesenchymal stem cells from diverse sources before culture. *World J Stem Cells*. 2015;7:470-6.
357. Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A, Slaby O and Michalek J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev*. 2012;21:2724-52.
358. Frese L, Dijkman PE and Hoerstrup SP. Adipose Tissue-Derived Stem Cells in Regenerative Medicine. *Transfus Med Hemother*. 2016;43:268-274.
359. Zack-Williams SD, Butler PE and Kalaskar DM. Current progress in use of adipose derived stem cells in peripheral nerve regeneration. *World J Stem Cells*. 2015;7:51-64.
360. Fathi P and Wu S. Isolation, Detection, and Characterization of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in Clinical Samples. *Open Microbiol J*. 2016;10:57-63.
361. Mundra V, Gerling IC and Mahato RI. Mesenchymal stem cell-based therapy. *Mol Pharm*. 2013;10:77-89.
362. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM and Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm (Lond)*. 2005;2:8.
363. Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, Shang H and Ogle RC. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells*. 2005;23:412-23.
364. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW and Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol*. 2001;189:54-63.
365. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Di Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X and Gimble JM. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*. 2006;24:376-85.
366. Lindroos B, Boucher S, Chase L, Kuokkanen H, Huhtala H, Haataja R, Vemuri M, Suuronen R and Miettinen S. Serum-free, xeno-free culture media maintain the proliferation rate and multipotentiality of adipose stem cells in vitro. *Cytotherapy*. 2009;11:958-72.
367. Parker A, Shang H, Khurgel M and Katz A. Low serum and serum-free culture of multipotential human adipose stem cells. *Cytotherapy*. 2007;9:637-46.

368. Mirabet V, Solves P, Minana MD, Encabo A, Carbonell-Uberos F, Blanquer A and Roig R. Human platelet lysate enhances the proliferative activity of cultured human fibroblast-like cells from different tissues. *Cell Tissue Bank*. 2008;9:1-10.
369. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H and Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006;24:1294-301.
370. Liu S, Zhou J, Zhang X, Liu Y, Chen J, Hu B, Song J and Zhang Y. Strategies to Optimize Adult Stem Cell Therapy for Tissue Regeneration. *Int J Mol Sci*. 2016;17.
371. Zhu P, Liu J, Shi J, Zhou Q, Liu J, Zhang X, Du Z, Liu Q and Guo Y. Melatonin protects ADSCs from ROS and enhances their therapeutic potency in a rat model of myocardial infarction. *J Cell Mol Med*. 2015;19:2232-43.
372. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV and March KL. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004;109:1292-8.
373. Bajek A, Gurtowska N, Olkowska J, Kazmierski L, Maj M and Drewa T. Adipose-Derived Stem Cells as a Tool in Cell-Based Therapies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2016;64:443-454.
374. Pak J, Lee JH, Park KS, Park M, Kang LW and Lee SH. Current use of autologous adipose tissue-derived stromal vascular fraction cells for orthopedic applications. *J Biomed Sci*. 2017;24:9.
375. Lander EB, Berman MH and See JR. Stromal Vascular Fraction Combined with Shock Wave for the Treatment of Peyronie's Disease. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2016;4:e631.
376. Minter DM, Marra KG and Rubin JP. Adipose stem cells: biology, safety, regulation, and regenerative potential. *Clin Plast Surg*. 2015;42:169-79.
377. Golan L, Goker-Alpan O, Holida M, Kantola I, Klopotoski M, Kuusisto J, Linhart A, Musial J, Nicholls K, Gonzalez-Rodriguez D, Sharma R, Vujkovic B, Chang P and Wijatyk A. Evaluation of the efficacy and safety of three dosing regimens of agalsidase alfa enzyme replacement therapy in adults with Fabry disease. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:3435-44.
378. Strem BM, Zhu M, Alfonso Z, Daniels EJ, Schreiber R, Beygui R, MacLellan WR, Hedrick MH and Fraser JK. Expression of cardiomyocytic markers on adipose tissue-derived cells in a murine model of acute myocardial injury. *Cytotherapy*. 2005;7:282-91.
379. van Dijk A, Naaijkens BA, Jurgens WJ, Nalliah K, Sairras S, van der Pijl RJ, Vo K, Vonk AB, van Rossum AC, Paulus WJ, van Milligen FJ and Niessen HW. Reduction of infarct size by intravenous injection of uncultured adipose derived stromal cells in a rat model is dependent on the time point of application. *Stem Cell Res*. 2011;7:219-29.
380. Hamdi H, Planat-Benard V, Bel A, Puymirat E, Geha R, Pidial L, Nematalla H, Bellamy V, Bouaziz P, Peyrard S, Casteilla L, Bruneval P, Hagege AA, Agbulut O and Menasche P. Epicardial adipose stem cell sheets results in greater post-infarction survival than intramyocardial injections. *Cardiovasc Res*. 2011;91:483-91.
381. Otto Beitnes J, Oie E, Shahdadfar A, Karlsen T, Muller RM, Aakhus S, Reinholt FP and Brinckmann JE. Intramyocardial injections of human mesenchymal stem cells following acute myocardial infarction modulate scar formation and improve left ventricular function. *Cell Transplant*. 2012;21:1697-709.
382. Li TS, Cheng K, Malliaras K, Smith RR, Zhang Y, Sun B, Matsushita N, Blusztajn A, Terrovitis J, Kusuoka H, Marban L and Marban E. Direct comparison of different stem cell types and subpopulations reveals superior paracrine potency and myocardial repair efficacy with cardiosphere-derived cells. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59:942-53.
383. Cai L, Johnstone BH, Cook TG, Tan J, Fishbein MC, Chen PS and March KL. IFATS collection: Human adipose tissue-derived stem cells induce angiogenesis and nerve sprouting following myocardial infarction, in conjunction with potent preservation of cardiac function. *Stem Cells*. 2009;27:230-7.
384. Bai X, Yan Y, Song YH, Seidensticker M, Rabinovich B, Metzkele R, Bankson JA, Vykoukal D and Alt E. Both cultured and freshly isolated adipose tissue-derived stem cells enhance cardiac function after acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2010;31:489-501.
385. Ii M, Horii M, Yokoyama A, Shoji T, Mifune Y, Kawamoto A, Asahi M and Asahara T. Synergistic effect of adipose-derived stem cell therapy and bone marrow progenitor recruitment in ischemic heart. *Lab Invest*. 2011;91:539-52.
386. Rigol M, Solanes N, Farre J, Roura S, Roque M, Berruezo A, Bellera N, Novensa L, Tamborero D, Prat-Vidal C, Huzman MA, Batlle M, Hoefsloot M, Sitges M, Ramirez J, Dantas AP, Merino A, Sanz G, Brugada J, Bayes-Genis A and Heras M. Effects of adipose tissue-derived stem cell therapy after myocardial infarction: impact of the route of administration. *J Card Fail*. 2010;16:357-66.

387. Hombach-Klonisch S, Panigrahi S, Rashedi I, Seifert A, Alberti E, Pocar P, Kurpisz M, Schulze-Osthoff K, Mackiewicz A and Los M. Adult stem cells and their trans-differentiation potential--perspectives and therapeutic applications. *J Mol Med (Berl)*. 2008;86:1301-14.
388. Laflamme MA, Myerson D, Saffitz JE and Murry CE. Evidence for cardiomyocyte repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts. *Circ Res*. 2002;90:634-40.
389. Bai X and Alt E. Myocardial regeneration potential of adipose tissue-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;401:321-6.
390. Nakagami H, Maeda K, Morishita R, Iguchi S, Nishikawa T, Takami Y, Kikuchi Y, Saito Y, Tamai K, Ogihara T and Kaneda Y. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:2542-7.
391. Moll G, Ankrum JA, Kamhieh-Milz J, Bieback K, Ringden O, Volk HD, Geissler S and Reinke P. Intravascular Mesenchymal Stromal/Stem Cell Therapy Product Diversification: Time for New Clinical Guidelines. *Trends Mol Med*. 2019;25:149-163.
392. Prockop DJ and Olson SD. Clinical trials with adult stem/progenitor cells for tissue repair: let's not overlook some essential precautions. *Blood*. 2007;109:3147-51.
393. Watanabe M and Yavagal DR. Intra-arterial delivery of mesenchymal stem cells. *Brain Circ*. 2016;2:114-117.
394. Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM and Low WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol*. 2002;174:11-20.
395. Hamidian Jahromi S and Davies JE. Concise Review: Skeletal Muscle as a Delivery Route for Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Transl Med*. 2019;8:456-465.
396. Qazi TH, Mooney DJ, Duda GN and Geissler S. Biomaterials that promote cell-cell interactions enhance the paracrine function of MSCs. *Biomaterials*. 2017;140:103-114.
397. Qazi TH, Duda GN, Ort MJ, Perka C, Geissler S and Winkler T. Cell therapy to improve regeneration of skeletal muscle injuries. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2019;10:501-516.
398. Hanson SE, Bentz ML and Hematti P. Mesenchymal stem cell therapy for nonhealing cutaneous wounds. *Plast Reconstr Surg*. 2010;125:510-6.
399. Magne B, Lataillade JJ and Trouillas M. Mesenchymal Stromal Cell Preconditioning: The Next Step Toward a Customized Treatment For Severe Burn. *Stem Cells Dev*. 2018;27:1385-1405.
400. Braid LR, Wood CA, Wiese DM and Ford BN. Intramuscular administration potentiates extended dwell time of mesenchymal stromal cells compared to other routes. *Cytotherapy*. 2018;20:232-244.
401. Abdul Wahid SF, Ismail NA, Wan Jamaludin WF, Muhamad NA, Abdul Hamid MKA, Harunarashid H and Lai NM. Autologous cells derived from different sources and administered using different regimens for 'no-option' critical lower limb ischaemia patients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;8:CD010747.
402. Han KH, Kim AK and Kim DI. Therapeutic Potential of Human Mesenchymal Stem Cells for Treating Ischemic Limb Diseases. *Int J Stem Cells*. 2016;9:163-168.
403. Soria-Juan B, Escacena N, Capilla-Gonzalez V, Aguilera Y, Llanos L, Tejado JR, Bedoya FJ, Juan V, De la Cuesta A, Ruiz-Salmeron R, Andreu E, Grochowicz L, Prosper F, Sanchez-Guijo F, Lozano FS, Miralles M, Del Rio-Sola L, Castellanos G, Moraleda JM, Sackstein R, Garcia-Arranz M, Garcia-Olmo D, Martin F, Hmadcha A, Soria B and Collaborative Working Group "Noma Project T. Cost-Effective, Safe, and Personalized Cell Therapy for Critical Limb Ischemia in Type 2 Diabetes Mellitus. *Front Immunol*. 2019;10:1151.
404. Lee RT. Adult Cardiac Stem Cell Concept and the Process of Science. *Circulation*. 2018;138:2940-2942.
405. Li Y, He L, Huang X, Bhaloo SI, Zhao H, Zhang S, Pu W, Tian X, Li Y, Liu Q, Yu W, Zhang L, Liu X, Liu K, Tang J, Zhang H, Cai D, Ralf AH, Xu Q, Lui KO and Zhou B. Genetic Lineage Tracing of Nonmyocyte Population by Dual Recombinases. *Circulation*. 2018;138:793-805.
406. Kanelidis AJ, Premer C, Lopez J, Balkan W and Hare JM. 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;120:1139-1150.
407. Yau TM, Pagani FD, Mancini DM, Chang HL, Lala A, Woo YJ, Acker MA, Selzman CH, Soltesz EG, Kern JA, Maltais S, Charbonneau E, Pan S, Marks ME, Moquete EG, O'Sullivan KL, Taddei-Peters WC, McGowan LK, Green C, Rose EA, Jeffries N, Parides MK, Weisel RD, Miller MA, Hung J, O'Gara PT, Moskowitz AJ, Gelijns AC, Bagiella E, Milano CA and Cardiothoracic Surgical Trials N. 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;321:1176-1186.

408. Walker PA, Letourneau PA, Bedi S, Shah SK, Jimenez F and Cox CS, Jr. Progenitor cells as remote "bioreactors": neuroprotection via modulation of the systemic inflammatory response. *World J Stem Cells*. 2011;3:9-18.
409. Kean TJ, Lin P, Caplan AI and Dennis JE. MSCs: Delivery Routes and Engraftment, Cell-Targeting Strategies, and Immune Modulation. *Stem Cells Int*. 2013;2013:732742.
410. Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, Monzon-Posadas WO, Xue H, Savitz SI, Laine GA and Cox CS, Jr. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem Cells Dev*. 2009;18:683-92.
411. Argibay B, Trekker J, Himmelreich U, Beiras A, Topete A, Taboada P, Perez-Mato M, Vieites-Prado A, Iglesias-Rey R, Rivas J, Planas AM, Sobrino T, Castillo J and Campos F. Intraarterial route increases the risk of cerebral lesions after mesenchymal cell administration in animal model of ischemia. *Sci Rep*. 2017;7:40758.
412. Janowski M, Lyczek A, Engels C, Xu J, Lukomska B, Bulte JW and Walczak P. Cell size and velocity of injection are major determinants of the safety of intracarotid stem cell transplantation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013;33:921-7.
413. Guzman R, Janowski M and Walczak P. Intra-Arterial Delivery of Cell Therapies for Stroke. *Stroke*. 2018;49:1075-1082.
414. Katritsis DG, Sotiropoulou PA, Karvouni E, Karabinos I, Korovesis S, Perez SA, Voridis EM and Papamichail M. Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2005;65:321-9.
415. Leistner DM, Fischer-Rasokat U, Honold J, Seeger FH, Schachinger V, Lehmann R, Martin H, Burck I, Urbich C, Dimmeler S, Zeiher AM and Assmus B. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): final 5-year results suggest long-term safety and efficacy. *Clin Res Cardiol*. 2011;100:925-34.
416. Lalu MM, Mazzarello S, Zlepnic J, Dong YYR, Montroy J, McIntyre L, Devereaux PJ, Stewart DJ, David Mazer C, Barron CC, McIsaac DI and Fergusson DA. Safety and Efficacy of Adult Stem Cell Therapy for Acute Myocardial Infarction and Ischemic Heart Failure (SafeCell Heart): A Systematic Review and Meta-Analysis. *Stem Cells Transl Med*. 2018;7:857-866.
417. Moniche F, Gonzalez A, Gonzalez-Marcos JR, Carmona M, Pinero P, Espigado I, Garcia-Solis D, Cayuela A, Montaner J, Boada C, Rosell A, Jimenez MD, Mayol A and Gil-Peralta A. Intra-arterial bone marrow mononuclear cells in ischemic stroke: a pilot clinical trial. *Stroke*. 2012;43:2242-4.
418. Suk KT, Yoon JH, Kim MY, Kim CW, Kim JK, Park H, Hwang SG, Kim DJ, Lee BS, Lee SH, Kim HS, Jang JY, Lee CH, Kim BS, Jang YO, Cho MY, Jung ES, Kim YM, Bae SH and Baik SK. Transplantation with autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells for alcoholic cirrhosis: Phase 2 trial. *Hepatology*. 2016;64:2185-2197.
419. Saad A, Dietz AB, Herrmann SMS, Hickson LJ, Glockner JF, McKusick MA, Misra S, Bjarnason H, Armstrong AS, Gastineau DA, Lerman LO and Textor SC. Autologous Mesenchymal Stem Cells Increase Cortical Perfusion in Renovascular Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28:2777-2785.
420. Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M and Caplan AI. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs*. 2001;169:12-20.
421. Schrepfer S, Deuse T, Reichenspurner H, Fischbein MP, Robbins RC and Pelletier MP. Stem cell transplantation: the lung barrier. *Transplant Proc*. 2007;39:573-6.
422. Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, Semprun-Prieto L, Delafontaine P and Prockop DJ. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell*. 2009;5:54-63.
423. Danielyan L, Beer-Hammer S, Stolzing A, Schafer R, Siegel G, Fabian C, Kahle P, Biedermann T, Lourhmati A, Buadze M, Novakovic A, Proksch B, Gleiter CH, Frey WH and Schwab M. Intranasal delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells, macrophages, and microglia to the brain in mouse models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Cell Transplant*. 2014;23 Suppl 1:S123-39.
424. Hagege AA, Marolleau JP, Vilquin JT, Alheritiere A, Peyrard S, Duboc D, Abergel E, Messas E, Mousseaux E, Schwartz K, Desnos M and Menasche P. Skeletal myoblast transplantation in ischemic heart failure: long-term follow-up of the first phase I cohort of patients. *Circulation*. 2006;114:1108-13.
425. Menasche P. You can't judge a book by its cover. *Circulation*. 2006;113:1275-7.
426. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, Endresen K, Ilebakk A, Mangschau A, Fjeld JG, Smith HJ, Taraldsrud E, Groggaard HK, Bjornerheim R, Brekke M, Muller C, Hopp E, Ragnarsson A, Brinchmann JE and Forfang K. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006;355:1199-209.

427. Assmus B, Honold J, Schachinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, Teupe C, Pistorius K, Martin H, Abolmaali ND, Tonn T, Dimmeler S and Zeiher AM. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006;355:1222-32.
428. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM and Investigators R-A. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006;355:1210-21.
429. Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, Montori VM, Perin EC, Hornung CA, Zuba-Surma EK, Al-Mallah M and Dawn B. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med.* 2007;167:989-97.
430. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A and Drexler H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet.* 2004;364:141-8.
431. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, Kalantzi M, Herbots L, Sinnaeve P, Dens J, Maertens J, Rademakers F, Dymarkowski S, Gheysens O, Van Cleemput J, Bormans G, Nuyts J, Belmans A, Mortelmans L, Boogaerts M and Van de Werf F. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet.* 2006;367:113-21.
432. Ott HC, McCue J and Taylor DA. Cell-based cardiovascular repair--the hurdles and the opportunities. *Basic Res Cardiol.* 2005;100:504-17.
433. Gersh BJ and Simari RD. Cardiac stem cell repair therapy: a clinical perspective. *Indian Heart J.* 2006;58:308-14.
434. Rosenzweig A. Cardiac cell therapy--mixed results from mixed cells. *N Engl J Med.* 2006;355:1274-7.
435. Mazhari R and Hare JM. Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cardiac repair: potential influences on the cardiac stem cell niche. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2007;4 Suppl 1:S21-6.
436. Bartunek J, Vanderheyden M, Wijns W, Timmermans F, Vandekerckhove B, Villa A, Sanchez PL, Arnold R, San Roman JA, Heyndrickx G and Fernandez-Aviles F. Bone-marrow-derived cells for cardiac stem cell therapy: safe or still under scrutiny? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2007;4 Suppl 1:S100-5.
437. Chien KR. Lost and found: cardiac stem cell therapy revisited. *J Clin Invest.* 2006;116:1838-40.
438. Chien KR. Stem cells: lost in translation. *Nature.* 2004;428:607-8.
439. Wollert KC and Drexler H. Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ Res.* 2005;96:151-63.
440. Stamper HB, Jr. and Woodruff JJ. Lymphocyte homing into lymph nodes: in vitro demonstration of the selective affinity of recirculating lymphocytes for high-endothelial venules. *J Exp Med.* 1976;144:828-33.
441. Lee YH, Lee YA, Noh KT, Kim KH, Han JY, Seo SY, Kwon HC, Kim JS and Kim HJ. Homing-associated cell adhesion molecules and cell cycle status on the nucleated cells in the bone marrow, mobilized peripheral blood and cord blood. *J Korean Med Sci.* 2004;19:523-8.
442. Bittner RE, Schofer C, Weipoltshammer K, Ivanova S, Streubel B, Hauser E, Freilinger M, Hoger H, Elbe-Burger A and Wachtler F. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat Embryol (Berl).* 1999;199:391-6.
443. Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC and Chen CC. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells.* 2004;22:1330-7.
444. Whetton AD and Graham GJ. Homing and mobilization in the stem cell niche. *Trends Cell Biol.* 1999;9:233-8.
445. Kronenwett R, Martin S and Haas R. The role of cytokines and adhesion molecules for mobilization of peripheral blood stem cells. *Stem Cells.* 2000;18:320-30.
446. Devine SM and Hoffman R. Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol.* 2000;7:358-63.
447. Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR and Mosca JD. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci.* 2003;10:228-41.
448. Abbott JD, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS and Giordano FJ. Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation.* 2004;110:3300-5.
449. Frangogiannis NG, Smith CW and Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2002;53:31-47.
450. Liesveld JL, Rosell K, Panoskaltsis N, Belanger T, Harbol A and Abboud CN. Response of human CD34+ cells to CXC, CC, and CX3C chemokines: implications for cell migration and activation. *J Hematother Stem Cell Res.* 2001;10:643-55.

451. Lapidot T, Dar A and Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood*. 2005;106:1901-10.
452. Lapidot T and Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol*. 2002;30:973-81.
453. Aicher A, Brenner W, Zuhayra M, Badorff C, Massoudi S, Assmus B, Eckey T, Henze E, Zeiher AM and Dimmeler S. Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling. *Circulation*. 2003;107:2134-9.
454. Iso Y, Spees JL, Serrano C, Bakondi B, Pochampally R, Song YH, Sobel BE, Delafontaine P and Prockop DJ. Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;354:700-6.
455. Leiker M, Suzuki G, Iyer VS, Cauty JM, Jr. and Lee T. Assessment of a nuclear affinity labeling method for tracking implanted mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*. 2008;17:911-22.
456. Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, Menke A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Knapp WH and Drexler H. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation*. 2005;111:2198-202.
457. Price MJ, Chou CC, Frantzen M, Miyamoto T, Kar S, Lee S, Shah PK, Martin BJ, Lill M, Forrester JS, Chen PS and Makkar RR. Intravenous mesenchymal stem cell therapy early after reperfused acute myocardial infarction improves left ventricular function and alters electrophysiologic properties. *Int J Cardiol*. 2006;111:231-9.
458. Kollet O, Shvitiel S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, Kahn J, Spiegel A, Dar A, Samira S, Goichberg P, Kalinkovich A, Arenzana-Seisdedos F, Nagler A, Hardan I, Revel M, Shafritz DA and Lapidot T. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34⁺ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest*. 2003;112:160-9.
459. Robertson P, Means TK, Luster AD and Scadden DT. CXCR4 and CCR5 mediate homing of primitive bone marrow-derived hematopoietic cells to the postnatal thymus. *Exp Hematol*. 2006;34:308-19.
460. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H and Kishimoto T. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*. 1996;382:635-8.
461. Burger JA and Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood*. 2006;107:1761-7.
462. Gneocchi M, Zhang Z, Ni A and Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*. 2008;103:1204-19.
463. Shabbir A, Zisa D, Suzuki G and Lee T. Heart failure therapy mediated by the trophic activities of bone marrow mesenchymal stem cells: a noninvasive therapeutic regimen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;296:H1888-97.
464. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL and Weinberg RA. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 2005;121:335-48.
465. Hare JM, Traverse JH, Henry TD, Dib N, Strumpf RK, Schulman SP, Gerstenblith G, DeMaria AN, Denktas AE, Gammon RS, Hermiller JB, Jr., Reisman MA, Schaer GL and Sherman W. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:2277-86.
466. Ceradini DJ and Gurtner GC. Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue. *Trends Cardiovasc Med*. 2005;15:57-63.
467. Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, Moch H, Oakeley EJ and Krek W. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature*. 2003;425:307-11.
468. Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, Bosch-Marce M, Masuda H, Losordo DW, Isner JM and Asahara T. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation*. 2003;107:1322-8.
469. Levine B and Sodora DL. HIV and CXCR4 in a kiss of autophagic death. *J Clin Invest*. 2006;116:2078-80.
470. Khan MZ, Brandimarti R, Patel JP, Huynh N, Wang J, Huang Z, Fatatis A and Meucci O. Apoptotic and antiapoptotic effects of CXCR4: is it a matter of intrinsic efficacy? Implications for HIV neuropathogenesis. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2004;20:1063-71.
471. Pyo RT, Sui J, Dhume A, Palomeque J, Blaxall BC, Diaz G, Tunstead J, Logothetis DE, Hajjar RJ and Schecter AD. CXCR4 modulates contractility in adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;41:834-44.
472. Ip JE, Wu Y, Huang J, Zhang L, Pratt RE and Dzau VJ. Mesenchymal stem cells use integrin beta1 not CXC chemokine receptor 4 for myocardial migration and engraftment. *Mol Biol Cell*. 2007;18:2873-82.

473. Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS and Dzau VJ. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med.* 2003;9:1195-201.
474. Tolmachov O, Ma YL, Themis M, Patel P, Spohr H, Macleod KT, Ullrich ND, Kienast Y, Coutelle C and Peters NS. Overexpression of connexin 43 using a retroviral vector improves electrical coupling of skeletal myoblasts with cardiac myocytes in vitro. *BMC Cardiovasc Disord.* 2006;6:25.
475. Saito T, Kuang JQ, Bittira B, Al-Khaldi A and Chiu RC. Xenotransplant cardiac chimera: immune tolerance of adult stem cells. *Ann Thorac Surg.* 2002;74:19-24; discussion 24.
476. Rombouts WJ and Ploemacher RE. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia.* 2003;17:160-70.
477. Lee K, Majumdar MK, Buyaner D, Hendricks JK, Pittenger MF and Mosca JD. Human mesenchymal stem cells maintain transgene expression during expansion and differentiation. *Mol Ther.* 2001;3:857-66.
478. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ and Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation.* 2002;105:93-8.
479. Gregory CA, Prockop DJ and Spees JL. Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation. *Exp Cell Res.* 2005;306:330-5.
480. Ji JF, He BP, Dheen ST and Tay SS. Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury. *Stem Cells.* 2004;22:415-27.
481. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI and Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem.* 1997;64:295-312.
482. Okuyama H, Krishnamachary B, Zhou YF, Nagasawa H, Bosch-Marce M and Semenza GL. Expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 in bone marrow-derived mesenchymal cells is dependent on hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 2006;281:15554-63.
483. Yamauchi-Takahara K, Ihara Y, Ogata A, Yoshizaki K, Azuma J and Kishimoto T. Hypoxic stress induces cardiac myocyte-derived interleukin-6. *Circulation.* 1995;91:1520-4.
484. Hamdi H, Boitard SE, Planat-Benard V, Pouly J, Neamatalla H, Joanne P, Perier MC, Bellamy V, Casteilla L, Li Z, Hagege AA, Mericskay M, Menasche P and Agbulut O. Efficacy of epicardially delivered adipose stroma cell sheets in dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res.* 2013;99:640-7.
485. Okayama K, Azuma J, Dosaka N, Iekushi K, Sanada F, Kusunoki H, Iwabayashi M, Rakugi H, Taniyama Y and Morishita R. Hepatocyte growth factor reduces cardiac fibrosis by inhibiting endothelial-mesenchymal transition. *Hypertension.* 2012;59:958-65.
486. Hung SC, Pochampally RR, Hsu SC, Sanchez C, Chen SC, Spees J and Prockop DJ. Short-term exposure of multipotent stromal cells to low oxygen increases their expression of CX3CR1 and CXCR4 and their engraftment in vivo. *PLoS One.* 2007;2:e416.
487. Radeke HH, Ludwig RJ and Boehncke WH. Experimental approaches to lymphocyte migration in dermatology in vitro and in vivo. *Exp Dermatol.* 2005;14:641-66.
488. Zahm JM, Kaplan H, Herard AL, Doriot F, Pierrot D, Somelette P and Puchelle E. Cell migration and proliferation during the in vitro wound repair of the respiratory epithelium. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1997;37:33-43.
489. Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, Nishimura H, Yoon YS, Milliken C, Uchida S, Masuo O, Iwaguro H, Ma H, Hanley A, Silver M, Kearney M, Losordo DW, Isner JM and Asahara T. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation.* 2003;107:461-8.
490. Bevilacqua MP, Nelson RM, Mannori G and Cecconi O. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. *Annu Rev Med.* 1994;45:361-78.
491. Prosper F, Stroncek D, McCarthy JB and Verfaillie CM. Mobilization and homing of peripheral blood progenitors is related to reversible downregulation of alpha4 beta1 integrin expression and function. *J Clin Invest.* 1998;101:2456-67.
492. Muller-Ehmsen J, Krausgrill B, Burst V, Schenk K, Neisen UC, Fries JW, Fleischmann BK, Hescheler J and Schwinger RH. Effective engraftment but poor mid-term persistence of mononuclear and mesenchymal bone marrow cells in acute and chronic rat myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2006;41:876-84.
493. Takahashi M, Li TS, Suzuki R, Kobayashi T, Ito H, Ikeda Y, Matsuzaki M and Hamano K. Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291:H886-93.
494. Brancaccio M, Hirsch E, Notte A, Selvetella G, Lembo G and Tarone G. Integrin signalling: the tug-of-war in heart hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 2006;70:422-33.

495. Hannigan GE, Coles JG and Dedhar S. Integrin-linked kinase at the heart of cardiac contractility, repair, and disease. *Circ Res*. 2007;100:1408-14.
496. Wang HS, Hung Y, Su CH, Peng ST, Guo YJ, Lai MC, Liu CY and Hsu JW. CD44 cross-linking induces integrin-mediated adhesion and transendothelial migration in breast cancer cell line by up-regulation of LFA-1 (alpha L beta2) and VLA-4 (alpha4beta1). *Exp Cell Res*. 2005;304:116-26.
497. Ponta H, Sherman L and Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4:33-45.
498. Naor D, Nedvetzki S, Golan I, Melnik L and Fajtelson Y. CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2002;39:527-79.
499. Greiling D and Clark RA. Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix. *J Cell Sci*. 1997;110 (Pt 7):861-70.
500. Lewinsohn DM, Nagler A, Ginzton N, Greenberg P and Butcher EC. Hematopoietic progenitor cell expression of the H-CAM (CD44) homing-associated adhesion molecule. *Blood*. 1990;75:589-95.
501. Vermeulen M, Le Pesteur F, Gagnerault MC, Mary JY, Sainteny F and Lepault F. Role of adhesion molecules in the homing and mobilization of murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 1998;92:894-900.
502. Wheatley SC, Isacke CM and Crossley PH. Restricted expression of the hyaluronan receptor, CD44, during postimplantation mouse embryogenesis suggests key roles in tissue formation and patterning. *Development*. 1993;119:295-306.
503. Turley EA, Belch AJ, Poppema S and Pilarski LM. Expression and function of a receptor for hyaluronan-mediated motility on normal and malignant B lymphocytes. *Blood*. 1993;81:446-53.
504. Lisignoli G, Cristino S, Piacentini A, Cavallo C, Caplan AI and Facchini A. Hyaluronan-based polymer scaffold modulates the expression of inflammatory and degradative factors in mesenchymal stem cells: Involvement of Cd44 and Cd54. *J Cell Physiol*. 2006;207:364-73.
505. Papakonstantinou E, Karakiulakis G, Tamm M, Perruchoud AP and Roth M. Hypoxia modifies the effect of PDGF on glycosaminoglycan synthesis by primary human lung cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;279:L825-34.
506. Drobnik J, Szczepanowska A and Dabrowski R. Temporary augmentation of glycosaminoglycans content in the heart after left coronary artery ligation. *Pathophysiology*. 2004;11:35-39.
507. Lee JY and Spicer AP. Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr Opin Cell Biol*. 2000;12:581-6.
508. Pure E and Cuff CA. A crucial role for CD44 in inflammation. *Trends Mol Med*. 2001;7:213-21.
509. Toole BP. Hyaluronan is not just a goo! *J Clin Invest*. 2000;106:335-6.
510. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N and Phinney DG. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:8407-11.
511. Wu GD, Nolte JA, Jin YS, Barr ML, Yu H, Starnes VA and Cramer DV. Migration of mesenchymal stem cells to heart allografts during chronic rejection. *Transplantation*. 2003;75:679-85.
512. Zhu H, Mitsuhashi N, Klein A, Barsky LW, Weinberg K, Barr ML, Demetriou A and Wu GD. The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem Cells*. 2006;24:928-35.
513. Bartunek J, Wijns W, Heyndrickx GR and Vanderheyden M. Timing of intracoronary bone-marrow-derived stem cell transplantation after ST-elevation myocardial infarction. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006;3 Suppl 1:S52-6.
514. Hasan NM, Adams GE, Joiner MC, Marshall JF and Hart IR. Hypoxia facilitates tumour cell detachment by reducing expression of surface adhesion molecules and adhesion to extracellular matrices without loss of cell viability. *Br J Cancer*. 1998;77:1799-805.
515. Indovina P, Ferrante A, Rainaldi G and Santini MT. Hypoxia and ionizing radiation: changes in adhesive properties and cell adhesion molecule expression in MG-63 three-dimensional tumor spheroids. *Cell Commun Adhes*. 2006;13:185-98.
516. English K, French A and Wood KJ. Mesenchymal stromal cells: facilitators of successful transplantation? *Cell Stem Cell*. 2010;7:431-42.
517. Cesarz Z and Tamama K. Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int*. 2016;2016:9176357.

518. Bartosh TJ, Ylostalo JH, Mohammadipoor A, Bazhanov N, Coble K, Claypool K, Lee RH, Choi H and Prockop DJ. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:13724-9.
519. Park IS, Rhie JW and Kim SH. A novel three-dimensional adipose-derived stem cell cluster for vascular regeneration in ischemic tissue. *Cytotherapy*. 2014;16:508-22.
520. Potapova IA, Brink PR, Cohen IS and Doronin SV. Culturing of human mesenchymal stem cells as three-dimensional aggregates induces functional expression of CXCR4 that regulates adhesion to endothelial cells. *J Biol Chem*. 2008;283:13100-7.
521. Bhang SH, Lee S, Shin JY, Lee TJ and Kim BS. Transplantation of cord blood mesenchymal stem cells as spheroids enhances vascularization. *Tissue Eng Part A*. 2012;18:2138-47.
522. Cheng NC, Wang S and Young TH. The influence of spheroid formation of human adipose-derived stem cells on chitosan films on stemness and differentiation capabilities. *Biomaterials*. 2012;33:1748-58.
523. Guo L, Zhou Y, Wang S and Wu Y. Epigenetic changes of mesenchymal stem cells in three-dimensional (3D) spheroids. *J Cell Mol Med*. 2014;18:2009-19.
524. Potapova IA, Gaudette GR, Brink PR, Robinson RB, Rosen MR, Cohen IS and Doronin SV. Mesenchymal stem cells support migration, extracellular matrix invasion, proliferation, and survival of endothelial cells in vitro. *Stem Cells*. 2007;25:1761-8.
525. Murphy KC, Fang SY and Leach JK. Human mesenchymal stem cell spheroids in fibrin hydrogels exhibit improved cell survival and potential for bone healing. *Cell Tissue Res*. 2014;357:91-9.
526. Ylostalo JH, Bartosh TJ, Tiblow A and Prockop DJ. Unique characteristics of human mesenchymal stromal/progenitor cells pre-activated in 3-dimensional cultures under different conditions. *Cytotherapy*. 2014;16:1486-1500.
527. Bartosh TJ, Ylostalo JH, Bazhanov N, Kuhlman J and Prockop DJ. Dynamic compaction of human mesenchymal stem/precursor cells into spheres self-activates caspase-dependent IL1 signaling to enhance secretion of modulators of inflammation and immunity (PGE2, TSG6, and STC1). *Stem Cells*. 2013;31:2443-56.
528. Zimmermann JA and McDevitt TC. Pre-conditioning mesenchymal stromal cell spheroids for immunomodulatory paracrine factor secretion. *Cytotherapy*. 2014;16:331-45.
529. Zhang Q, Nguyen AL, Shi S, Hill C, Wilder-Smith P, Krasieva TB and Le AD. Three-dimensional spheroid culture of human gingiva-derived mesenchymal stem cells enhances mitigation of chemotherapy-induced oral mucositis. *Stem Cells Dev*. 2012;21:937-47.
530. Follin B, Juhl M, Cohen S, Pedersen AE, Kastrop J and Ekblond A. Increased Paracrine Immunomodulatory Potential of Mesenchymal Stromal Cells in Three-Dimensional Culture. *Tissue Eng Part B Rev*. 2016;22:322-9.
531. Kusuma GD, Carthew J, Lim R and Frith JE. Effect of the Microenvironment on Mesenchymal Stem Cell Paracrine Signaling: Opportunities to Engineer the Therapeutic Effect. *Stem Cells Dev*. 2017;26:617-631.
532. Wang CC, Chen CH, Hwang SM, Lin WW, Huang CH, Lee WY, Chang Y and Sung HW. Spherically symmetric mesenchymal stromal cell bodies inherent with endogenous extracellular matrices for cellular cardiomyoplasty. *Stem Cells*. 2009;27:724-32.
533. Emmert MY, Wolint P, Wickboldt N, Gemayel G, Weber B, Brokopp CE, Boni A, Falk V, Bosman A, Jaconi ME and Hoerstrup SP. Human stem cell-based three-dimensional microtissues for advanced cardiac cell therapies. *Biomaterials*. 2013;34:6339-54.
534. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Werner N, Haase J, Neuzner J, Germing A, Mark B, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM and Investigators R-A. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J*. 2006;27:2775-83.
535. Traverse JH, Henry TD, Ellis SG, Pepine CJ, Willerson JT, Zhao DX, Forder JR, Byrne BJ, Hatzopoulos AK, Penn MS, Perin EC, Baran KW, Chambers J, Lambert C, Raveendran G, Simon DI, Vaughan DE, Simpson LM, Gee AP, Taylor DA, Cogle CR, Thomas JD, Silva GV, Jorgenson BC, Olson RE, Bowman S, Francescon J, Geither C, Handberg E, Smith DX, Baraniuk S, Piller LB, Loghin C, Aguilar D, Richman S, Zierold C, Bettencourt J, Sayre SL, Vojvodic RW, Skarlatos SI, Gordon DJ, Ebert RF, Kwak M, Moye LA, Simari RD and Cardiovascular Cell Therapy R. Effect of intracoronary delivery of autologous bone marrow mononuclear cells 2 to 3 weeks following acute myocardial infarction on left ventricular function: the LateTIME randomized trial. *JAMA*. 2011;306:2110-9.
536. Perin EC, Silva GV, Henry TD, Cabreira-Hansen MG, Moore WH, Coulter SA, Herlihy JP, Fernandes MR, Cheong BY, Flamm SD, Traverse JH, Zheng Y, Smith D, Shaw S, Westbrook L, Olson R, Patel D, Gahremanpour A, Canales J, Vaughn WK and Willerson JT. A randomized study of transendocardial injection of autologous bone

- marrow mononuclear cells and cell function analysis in ischemic heart failure (FOCUS-HF). *Am Heart J*. 2011;161:1078-87 e3.
537. Perin EC, Willerson JT, Pepine CJ, Henry TD, Ellis SG, Zhao DX, Silva GV, Lai D, Thomas JD, Kronenberg MW, Martin AD, Anderson RD, Traverse JH, Penn MS, Anwaruddin S, Hatzopoulos AK, Gee AP, Taylor DA, Cogle CR, Smith D, Westbrook L, Chen J, Handberg E, Olson RE, Geither C, Bowman S, Francescon J, Baraniuk S, Piller LB, Simpson LM, Loghin C, Aguilar D, Richman S, Zierold C, Bettencourt J, Sayre SL, Vojvodic RW, Skarlatos SI, Gordon DJ, Ebert RF, Kwak M, Moye LA, Simari RD and Cardiovascular Cell Therapy Research N. Effect of transendocardial delivery of autologous bone marrow mononuclear cells on functional capacity, left ventricular function, and perfusion in chronic heart failure: the FOCUS-CCTRN trial. *JAMA*. 2012;307:1717-26.
538. Raynaud CM and Yacoub MH. Clinical trials of bone marrow derived cells for ischemic heart failure. Time to move on? TIME, SWISS-AMI, CELLWAVE, POSEIDON and C-CURE. *Glob Cardiol Sci Pract*. 2013;2013:207-11.
539. Mielewicz M, Cole GD, Nowbar AN, Schilling R, Whinnett ZI, Bordachar P, Wilmshurst P, Chambers JC, Olshansky B, Morgan J, Israel C, Sethi AS, van Houwelingen M, Cleland JG, Schmidt G and Francis DP. The C-CURE Randomized Clinical Trial (Cardioprotective stem Cell therapy in heart failURE). *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:2453.
540. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC and Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 2003;75:389-97.
541. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, Santarlasci V, Mazzinghi B, Pizzolo G, Vinante F, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S and Annunziato F. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006;24:386-98.
542. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, Zhao RC and Shi Y. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*. 2008;2:141-50.
543. Chabannes D, Hill M, Merieau E, Rossignol J, Brion R, Soulillou JP, Anegon I and Cuturi MC. A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. *Blood*. 2007;110:3691-4.
544. Uccelli A, Moretta L and Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:726-36.
545. Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, Ottonello L and Pistoia V. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells*. 2008;26:151-62.
546. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD and Mao N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2005;105:4120-6.
547. Aggarwal S and Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105:1815-22.
548. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC and Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*. 2008;111:1327-33.
549. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V and Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006;107:367-72.
550. Traggiai E, Volpi S, Schena F, Gattorno M, Ferlito F, Moretta L and Martini A. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce both polyclonal expansion and differentiation of B cells isolated from healthy donors and systemic lupus erythematosus patients. *Stem Cells*. 2008;26:562-9.
551. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A and Hoffman R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*. 2002;30:42-8.
552. Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M, Fouillard L, Young RG, Frick J, Demarquay C, Cuvelier F, Mathieu E, Trompier F, Dudoignon N, Germain C, Mazurier C, Aigueperse J, Borneman J, Gorin NC, Gourmelon P and Thierry D. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med*. 2003;5:1028-38.
553. Le Blanc K, Frasson F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B, Bernardo ME, Remberger M, Dini G, Egeler RM, Bacigalupo A, Fibbe W, Ringden O, Developmental Committee of the European Group for B and Marrow T. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008;371:1579-86.

554. Huang XP, Sun Z, Miyagi Y, McDonald Kinkaid H, Zhang L, Weisel RD and Li RK. Differentiation of allogeneic mesenchymal stem cells induces immunogenicity and limits their long-term benefits for myocardial repair. *Circulation*. 2010;122:2419-29.
555. Quevedo HC, Hatzistergos KE, Oskouei BN, Feigenbaum GS, Rodriguez JE, Valdes D, Pattany PM, Zambrano JP, Hu Q, McNiece I, Heldman AW and Hare JM. Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:14022-7.
556. Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskouei BN, Hu Q, Feigenbaum GS, Margitich IS, Mazhari R, Boyle AJ, Zambrano JP, Rodriguez JE, Dulce R, Pattany PM, Valdes D, Revilla C, Heldman AW, McNiece I and Hare JM. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ Res*. 2010;107:913-22.
557. Ren G, Zhao X, Wang Y, Zhang X, Chen X, Xu C, Yuan ZR, Roberts AI, Zhang L, Zheng B, Wen T, Han Y, Rabson AB, Tischfield JA, Shao C and Shi Y. CCR2-dependent recruitment of macrophages by tumor-educated mesenchymal stromal cells promotes tumor development and is mimicked by TNFalpha. *Cell Stem Cell*. 2012;11:812-24.
558. Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, Robey PG, Leelahavanichkul K, Koller BH, Brown JM, Hu X, Jelinek I, Star RA and Mezey E. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med*. 2009;15:42-9.
559. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN and Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*. 2006;24:74-85.
560. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC and Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*. 2006;107:1484-90.
561. Mougiakakos D, Jitschin R, Johansson CC, Okita R, Kiessling R and Le Blanc K. The impact of inflammatory licensing on heme oxygenase-1-mediated induction of regulatory T cells by human mesenchymal stem cells. *Blood*. 2011;117:4826-35.
562. Svobodova E, Krulova M, Zajicova A, Pokorna K, Prochazkova J, Trosan P and Holan V. The role of mouse mesenchymal stem cells in differentiation of naive T-cells into anti-inflammatory regulatory T-cell or proinflammatory helper T-cell 17 population. *Stem Cells Dev*. 2012;21:901-10.
563. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E and Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*. 2003;101:3722-9.
564. Ren G, Su J, Zhang L, Zhao X, Ling W, L'Huillie A, Zhang J, Lu Y, Roberts AI, Ji W, Zhang H, Rabson AB and Shi Y. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells*. 2009;27:1954-62.
565. Inoue S, Popp FC, Koehl GE, Piso P, Schlitt HJ, Geissler EK and Dahlke MH. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat organ transplant model. *Transplantation*. 2006;81:1589-95.
566. Sudres M, Norol F, Trenado A, Gregoire S, Charlotte F, Levacher B, Lataillade JJ, Bourin P, Holy X, Vernant JP, Klatzmann D and Cohen JL. Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice. *J Immunol*. 2006;176:7761-7.
567. Rafei M, Birman E, Former K and Galipeau J. Allogeneic mesenchymal stem cells for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol Ther*. 2009;17:1799-803.
568. Wu J, Sun Z, Sun HS, Wu J, Weisel RD, Keating A, Li ZH, Feng ZP and Li RK. Intravenously administered bone marrow cells migrate to damaged brain tissue and improve neural function in ischemic rats. *Cell Transplant*. 2008;16:993-1005.
569. Crisostomo PR, Wang M, Wairiuko GM, Morrell ED, Terrell AM, Seshadri P, Nam UH and Meldrum DR. High passage number of stem cells adversely affects stem cell activation and myocardial protection. *Shock*. 2006;26:575-80.
570. Ren G, Zhao X, Zhang L, Zhang J, L'Huillier A, Ling W, Roberts AI, Le AD, Shi S, Shao C and Shi Y. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J Immunol*. 2010;184:2321-8.
571. Blesson S, Thiery J, Gaudin C, Stancou R, Kolb JP, Moreau JL, Theze J, Mami-Chouaib F and Chouaib S. Analysis of the mechanisms of human cytotoxic T lymphocyte response inhibition by NO. *Int Immunol*. 2002;14:1169-78.
572. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*. 2001;2:907-16.

573. Staykova MA, Berven LA, Cowden WB, Willenborg DO and Crouch MF. Nitric oxide induces polarization of actin in encephalitogenic T cells and inhibits their in vitro trans-endothelial migration in a p70S6 kinase-independent manner. *FASEB J.* 2003;17:1337-9.
574. Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, Muroi K and Ozawa K. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood.* 2007;109:228-34.
575. Bouffi C, Bony C, Courties G, Jorgensen C and Noel D. IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PLoS One.* 2010;5:e14247.
576. Rafei M, Campeau PM, Aguilar-Mahecha A, Buchanan M, Williams P, Birman E, Yuan S, Young YK, Boivin MN, Forner K, Basik M and Galipeau J. Mesenchymal stromal cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting CD4 Th17 T cells in a CC chemokine ligand 2-dependent manner. *J Immunol.* 2009;182:5994-6002.
577. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W and Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood.* 2004;103:4619-21.
578. Mellor AL and Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:762-74.
579. Oh JY, Lee RH, Yu JM, Ko JH, Lee HJ, Ko AY, Roddy GW and Prockop DJ. Intravenous mesenchymal stem cells prevented rejection of allogeneic corneal transplants by aborting the early inflammatory response. *Mol Ther.* 2012;20:2143-52.
580. Roddy GW, Oh JY, Lee RH, Bartosh TJ, Ylostalo J, Coble K, Rosa RH, Jr. and Prockop DJ. Action at a distance: systemically administered adult stem/progenitor cells (MSCs) reduce inflammatory damage to the cornea without engraftment and primarily by secretion of TNF-alpha stimulated gene/protein 6. *Stem Cells.* 2011;29:1572-9.
581. Choi H, Lee RH, Bazhanov N, Oh JY and Prockop DJ. Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF-kappaB signaling in resident macrophages. *Blood.* 2011;118:330-8.
582. Nasef A, Mathieu N, Chapel A, Frick J, Francois S, Mazurier C, Boutarfa A, Bouchet S, Gorin NC, Thierry D and Fouillard L. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G. *Transplantation.* 2007;84:231-7.
583. Gieseke F, Bohringer J, Bussolari R, Dominici M, Handgretinger R and Muller I. Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells. *Blood.* 2010;116:3770-9.
584. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F and Moretta L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood.* 2009;113:6576-83.
585. Fiorina P, Jurewicz M, Augello A, Vergani A, Dada S, La Rosa S, Selig M, Godwin J, Law K, Placidi C, Smith RN, Capella C, Rodig S, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH and Abdi R. Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes. *J Immunol.* 2009;183:993-1004.
586. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galun E and Rachmilewitz J. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood.* 2005;105:2214-9.
587. Groh ME, Maitra B, Szekely E and Koc ON. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Exp Hematol.* 2005;33:928-34.
588. Rasmuson I, Ringden O, Sundberg B and Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res.* 2005;305:33-41.
589. Xu G, Zhang L, Ren G, Yuan Z, Zhang Y, Zhao RC and Shi Y. Immunosuppressive properties of cloned bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Res.* 2007;17:240-8.
590. Le Blanc K, Rasmuson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M and Ringden O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet.* 2004;363:1439-41.
591. Kuo YR, Goto S, Shih HS, Wang FS, Lin CC, Wang CT, Huang EY, Chen CL, Wei FC, Zheng XX and Lee WP. Mesenchymal stem cells prolong composite tissue allotransplant survival in a swine model. *Transplantation.* 2009;87:1769-77.
592. Renner P, Eggenhofer E, Rosenauer A, Popp FC, Steinmann JF, Slowik P, Geissler EK, Piso P, Schlitt HJ and Dahlke MH. Mesenchymal stem cells require a sufficient, ongoing immune response to exert their immunosuppressive function. *Transplant Proc.* 2009;41:2607-11.

593. Chan JL, Tang KC, Patel AP, Bonilla LM, Pierobon N, Ponzio NM and Rameshwar P. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood*. 2006;107:4817-24.
594. Francois M, Romieu-Mourez R, Stock-Martineau S, Boivin MN, Bramson JL and Galipeau J. Mesenchymal stromal cells cross-present soluble exogenous antigens as part of their antigen-presenting cell properties. *Blood*. 2009;114:2632-8.
595. Sarkar D, Vemula PK, Zhao W, Gupta A, Karnik R and Karp JM. Engineered mesenchymal stem cells with self-assembled vesicles for systemic cell targeting. *Biomaterials*. 2010;31:5266-74.
596. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM and Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*. 2001;7:430-6.
597. Wang CH, Cherng WJ, Yang NI, Kuo LT, Hsu CM, Yeh HI, Lan YJ, Yeh CH and Stanford WL. Late-outgrowth endothelial cells attenuate intimal hyperplasia contributed by mesenchymal stem cells after vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:54-60.
598. Constantin G, Marconi S, Rossi B, Angiari S, Calderan L, Anghileri E, Gini B, Bach SD, Martinello M, Bifari F, Galie M, Turano E, Budui S, Sbarbati A, Krampera M and Bonetti B. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem Cells*. 2009;27:2624-35.
599. Yabana T, Arimura Y, Tanaka H, Goto A, Hosokawa M, Nagaishi K, Yamashita K, Yamamoto H, Adachi Y, Sasaki Y, Isobe M, Fujimiya M, Imai K and Shinomura Y. Enhancing epithelial engraftment of rat mesenchymal stem cells restores epithelial barrier integrity. *J Pathol*. 2009;218:350-9.
600. Sutton EJ, Boddington SE, Nedopil AJ, Henning TD, Demos SG, Baehner R, Sennino B, Lu Y and Daldrop-Link HE. An optical imaging method to monitor stem cell migration in a model of immune-mediated arthritis. *Opt Express*. 2009;17:24403-13.
601. Shi M, Li J, Liao L, Chen B, Li B, Chen L, Jia H and Zhao RC. Regulation of CXCR4 expression in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: role in homing efficiency in NOD/SCID mice. *Haematologica*. 2007;92:897-904.
602. Sordi V, Malosio ML, Marchesi F, Mercalli A, Melzi R, Giordano T, Belmonte N, Ferrari G, Leone BE, Bertuzzi F, Zerbini G, Allavena P, Bonifacio E and Piemonti L. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood*. 2005;106:419-27.
603. Zonta S, De Martino M, Bedino G, Piotti G, Rampino T, Gregorini M, Frassoni F, Dal Canton A, Dionigi P and Alessiani M. Which is the most suitable and effective route of administration for mesenchymal stem cell-based immunomodulation therapy in experimental kidney transplantation: endovenous or arterial? *Transplant Proc*. 2010;42:1336-40.
604. Freyman T, Polin G, Osman H, Crary J, Lu M, Cheng L, Palasis M and Wilensky RL. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2006;27:1114-22.
605. Lu D, Li Y, Wang L, Chen J, Mahmood A and Chopp M. Intraarterial administration of marrow stromal cells in a rat model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2001;18:813-9.
606. Walczak P, Zhang J, Gilad AA, Kedziorek DA, Ruiz-Cabello J, Young RG, Pittenger MF, van Zijl PC, Huang J and Bulte JW. Dual-modality monitoring of targeted intraarterial delivery of mesenchymal stem cells after transient ischemia. *Stroke*. 2008;39:1569-74.
607. Karp JM and Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell*. 2009;4:206-16.
608. Muschler GF, Nakamoto C and Griffith LG. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am*. 2004;86:1541-58.
609. Chang YK, Chen MH, Chiang YH, Chen YF, Ma WH, Tseng CY, Soong BW, Ho JH and Lee OK. Mesenchymal stem cell transplantation ameliorates motor function deterioration of spinocerebellar ataxia by rescuing cerebellar Purkinje cells. *J Biomed Sci*. 2011;18:54.
610. Castelo-Branco MT, Soares ID, Lopes DV, Buongusto F, Martinusso CA, do Rosario A, Jr., Souza SA, Gutfilen B, Fonseca LM, Elia C, Madi K, Schanaider A, Rossi MI and Souza HS. Intraperitoneal but not intravenous cryopreserved mesenchymal stromal cells home to the inflamed colon and ameliorate experimental colitis. *PLoS One*. 2012;7:e33360.
611. Chan J, Waddington SN, O'Donoghue K, Kurata H, Guillot PV, Gotherstrom C, Themis M, Morgan JE and Fisk NM. Widespread distribution and muscle differentiation of human fetal mesenchymal stem cells after intrauterine transplantation in dystrophic mdx mouse. *Stem Cells*. 2007;25:875-84.

612. Duijvestein M, Wildenberg ME, Welling MM, Hennink S, Molendijk I, van Zuylen VL, Bosse T, Vos AC, de Jonge-Muller ES, Roelofs H, van der Weerd L, Verspaget HW, Fibbe WE, te Velde AA, van den Brink GR and Hommes DW. Pretreatment with interferon-gamma enhances the therapeutic activity of mesenchymal stromal cells in animal models of colitis. *Stem Cells*. 2011;29:1549-58.
613. Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M and Chopp M. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 2001;32:1005-11.
614. Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, Kitsis RN and Walsh K. Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation*. 2000;101:660-7.
615. Schmeckpeper J, Verma A, Yin L, Beigi F, Zhang L, Payne A, Zhang Z, Pratt RE, Dzau VJ and Mirosou M. Inhibition of Wnt6 by Sfrp2 regulates adult cardiac progenitor cell differentiation by differential modulation of Wnt pathways. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;85:215-25.
616. Golpanian S, Wolf A, Hatzistergos KE and Hare JM. Rebuilding the Damaged Heart: Mesenchymal Stem Cells, Cell-Based Therapy, and Engineered Heart Tissue. *Physiol Rev*. 2016;96:1127-68.
617. Di Siena S, Gimmelli R, Nori SL, Barbagallo F, Campolo F, Dolci S, Rossi P, Venneri MA, Giannetta E, Gianfrilli D, Feigenbaum L, Lenzi A, Naro F, Cianflone E, Mancuso T, Torella D, Isidori AM and Pellegrini M. Activated c-Kit receptor in the heart promotes cardiac repair and regeneration after injury. *Cell Death Dis*. 2016;7:e2317.
618. Reinecke H and Murry CE. Taking the death toll after cardiomyocyte grafting: a reminder of the importance of quantitative biology. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34:251-3.
619. Heil M, Ziegelhoeffer T, Mees B and Schaper W. A different outlook on the role of bone marrow stem cells in vascular growth: bone marrow delivers software not hardware. *Circ Res*. 2004;94:573-4.
620. Fedak PW, Verma S, Weisel RD, Skrtic M and Li RK. Cardiac remodeling and failure: from molecules to man (Part III). *Cardiovasc Pathol*. 2005;14:109-19.
621. Fedak PW, Verma S, Weisel RD and Li RK. Cardiac remodeling and failure From molecules to man (Part II). *Cardiovasc Pathol*. 2005;14:49-60.
622. Gneocchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, Noiseux N, Zhang L, Pratt RE, Ingwall JS and Dzau VJ. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med*. 2005;11:367-8.
623. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S and Epstein SE. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*. 2004;109:1543-9.
624. Uemura R, Xu M, Ahmad N and Ashraf M. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. *Circ Res*. 2006;98:1414-21.
625. Kardami E, Banerji S, Doble BW, Dang X, Fandrich RR, Jin Y and Cattini PA. PKC-dependent phosphorylation may regulate the ability of connexin43 to inhibit DNA synthesis. *Cell Commun Adhes*. 2003;10:293-7.
626. Hinrichsen R, Haunso S and Busk PK. Different regulation of p27 and Akt during cardiomyocyte proliferation and hypertrophy. *Growth Factors*. 2007;25:132-40.
627. Bersell K, Arab S, Haring B and Kuhn B. Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury. *Cell*. 2009;138:257-70.
628. Cote GM, Sawyer DB and Chabner BA. ERBB2 inhibition and heart failure. *N Engl J Med*. 2012;367:2150-3.
629. Przybyt E, Krenning G, Brinker MG and Harmsen MC. Adipose stromal cells primed with hypoxia and inflammation enhance cardiomyocyte proliferation rate in vitro through STAT3 and Erk1/2. *J Transl Med*. 2013;11:39.
630. Heo SC, Lee KO, Shin SH, Kwon YW, Kim YM, Lee CH, Kim YD, Lee MK, Yoon MS and Kim JH. Periostin mediates human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell-stimulated tumor growth in a xenograft lung adenocarcinoma model. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813:2061-70.
631. Kuhn B, del Monte F, Hajjar RJ, Chang YS, Lebeche D, Arab S and Keating MT. Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair. *Nat Med*. 2007;13:962-9.
632. Ladage D, Yaniz-Galende E, Rapti K, Ishikawa K, Tilemann L, Shapiro S, Takewa Y, Muller-Ehmsen J, Schwarz M, Garcia MJ, Sanz J, Hajjar RJ and Kawase Y. Stimulating myocardial regeneration with periostin Peptide in large mammals improves function post-myocardial infarction but increases myocardial fibrosis. *PLoS One*. 2013;8:e59656.
633. Zhao S, Wu H, Xia W, Chen X, Zhu S, Zhang S, Shao Y, Ma W, Yang D and Zhang J. Periostin expression is upregulated and associated with myocardial fibrosis in human failing hearts. *J Cardiol*. 2014;63:373-8.

634. Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, Yamagishi M, Mori H, Kangawa K and Kitamura S. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287:H2670-6.
635. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL and Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*. 2004;428:668-73.
636. Rehman J, Li J, Orschell CM and March KL. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*. 2003;107:1164-9.
637. Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Fujii T, Uematsu M, Ohgushi H, Yamagishi M, Tokudome T, Mori H, Miyatake K and Kitamura S. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2005;112:1128-35.
638. Yoon YS, Wecker A, Heyd L, Park JS, Tkebuchava T, Kusano K, Hanley A, Scadova H, Qin G, Cha DH, Johnson KL, Aikawa R, Asahara T and Losordo DW. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest*. 2005;115:326-38.
639. Markel TA, Wang Y, Herrmann JL, Crisostomo PR, Wang M, Novotny NM, Herring CM, Tan J, Lahm T and Meldrum DR. VEGF is critical for stem cell-mediated cardioprotection and a crucial paracrine factor for defining the age threshold in adult and neonatal stem cell function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295:H2308-14.
640. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S and Epstein SE. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res*. 2004;94:678-85.
641. Fedak PW, Verma S, Weisel RD and Li RK. Cardiac remodeling and failure: from molecules to man (Part I). *Cardiovasc Pathol*. 2005;14:1-11.
642. Formigli L, Perna AM, Meacci E, Cinci L, Margheri M, Nistri S, Tani A, Silvertown J, Orlandini G, Porciani C, Zecchi-Orlandini S, Medin J and Bani D. Paracrine effects of transplanted myoblasts and relaxin on post-infarction heart remodelling. *J Cell Mol Med*. 2007;11:1087-100.
643. Payne TR, Oshima H, Okada M, Momoi N, Tobita K, Keller BB, Peng H and Huard J. A relationship between vascular endothelial growth factor, angiogenesis, and cardiac repair after muscle stem cell transplantation into ischemic hearts. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:1677-84.
644. Yau TM, Kim C, Li G, Zhang Y, Fazel S, Spiegelstein D, Weisel RD and Li RK. Enhanced angiogenesis with multimodal cell-based gene therapy. *Ann Thorac Surg*. 2007;83:1110-9.
645. Di Santo S, Yang Z, Wyler von Ballmoos M, Voelzmann J, Diehm N, Baumgartner I and Kalka C. Novel cell-free strategy for therapeutic angiogenesis: in vitro generated conditioned medium can replace progenitor cell transplantation. *PLoS One*. 2009;4:e5643.
646. Urbich C, Aicher A, Heeschen C, Dernbach E, Hofmann WK, Zeiher AM and Dimmeler S. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;39:733-42.
647. Etoh T, Joffs C, Deschamps AM, Davis J, Dowdy K, Hendrick J, Baicu S, Mukherjee R, Manhaini M and Spinale FG. Myocardial and interstitial matrix metalloproteinase activity after acute myocardial infarction in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281:H987-94.
648. Oyagi S, Hirose M, Kojima M, Okuyama M, Kawase M, Nakamura T, Ohgushi H and Yagi K. Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow mesenchymal cells into CCl4-injured rats. *J Hepatol*. 2006;44:742-8.
649. Ninichuk V, Gross O, Segerer S, Hoffmann R, Radomska E, Buchstaller A, Huss R, Akis N, Schlondorff D and Anders HJ. Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen4A3-deficient mice. *Kidney Int*. 2006;70:121-9.
650. Ohnishi S, Yasuda T, Kitamura S and Nagaya N. Effect of hypoxia on gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mononuclear cells. *Stem Cells*. 2007;25:1166-77.
651. Xu X, Xu Z, Xu Y and Cui G. Effects of mesenchymal stem cell transplantation on extracellular matrix after myocardial infarction in rats. *Coron Artery Dis*. 2005;16:245-55.
652. Ohnishi S, Sumiyoshi H, Kitamura S and Nagaya N. Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions. *FEBS Lett*. 2007;581:3961-6.
653. Fedak PW, Szmítko PE, Weisel RD, Altamentova SM, Nili N, Ohno N, Verma S, Fazel S, Strauss BH and Li RK. Cell transplantation preserves matrix homeostasis: a novel paracrine mechanism. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005;130:1430-9.

654. Murtuza B, Suzuki K, Bou-Gharios G, Beauchamp JR, Smolenski RT, Partridge TA and Yacoub MH. Transplantation of skeletal myoblasts secreting an IL-1 inhibitor modulates adverse remodeling in infarcted murine myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:4216-21.
655. He W, Zhang L, Ni A, Zhang Z, Mirotso M, Mao L, Pratt RE and Dzau VJ. Exogenously administered secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) reduces fibrosis and improves cardiac function in a rat model of myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:21110-5.
656. Mastri M, Shah Z, Hsieh K, Wang X, Wooldridge B, Martin S, Suzuki G and Lee T. Secreted Frizzled-related protein 2 as a target in antifibrotic therapeutic intervention. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2014;306:C531-9.
657. Singla DK and McDonald DE. Factors released from embryonic stem cells inhibit apoptosis of H9c2 cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293:H1590-5.
658. Bolli R, Chugh AR, D'Amario D, Loughran JH, Stoddard MF, Ikram S, Beache GM, Wagner SG, Leri A, Hosoda T, Sanada F, Elmore JB, Goichberg P, Cappetta D, Solankhi NK, Fahsah I, Rokosh DG, Slaughter MS, Kajstura J and Anversa P. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet*. 2011;378:1847-57.
659. Chugh AR, Beache GM, Loughran JH, Mewton N, Elmore JB, Kajstura J, Pappas P, Tatoes A, Stoddard MF, Lima JA, Slaughter MS, Anversa P and Bolli R. Administration of cardiac stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy: the SCIPIO trial: surgical aspects and interim analysis of myocardial function and viability by magnetic resonance. *Circulation*. 2012;126:S54-64.
660. Tang XL, Rokosh G, Sanganalmath SK, Yuan F, Sato H, Mu J, Dai S, Li C, Chen N, Peng Y, Dawn B, Hunt G, Leri A, Kajstura J, Tiwari S, Shirk G, Anversa P and Bolli R. Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction. *Circulation*. 2010;121:293-305.
661. Hong KU, Guo Y, Li QH, Cao P, Al-Maqtari T, Vajravelu BN, Du J, Book MJ, Zhu X, Nong Y, Bhatnagar A and Bolli R. c-kit⁺ Cardiac stem cells alleviate post-myocardial infarction left ventricular dysfunction despite poor engraftment and negligible retention in the recipient heart. *PLoS One*. 2014;9:e96725.
662. Mourkioti F and Rosenthal N. IGF-1, inflammation and stem cells: interactions during muscle regeneration. *Trends Immunol*. 2005;26:535-42.
663. Engels MC, Rajarajan K, Feistritz R, Sharma A, Nielsen UB, Schlij MJ, de Vries AA, Pijnappels DA and Wu SM. Insulin-like growth factor promotes cardiac lineage induction in vitro by selective expansion of early mesoderm. *Stem Cells*. 2014;32:1493-502.
664. Nakanishi C, Yamagishi M, Yamahara K, Hagino I, Mori H, Sawa Y, Yagihara T, Kitamura S and Nagaya N. Activation of cardiac progenitor cells through paracrine effects of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;374:11-6.
665. Laflamme MA and Murry CE. Regenerating the heart. *Nat Biotechnol*. 2005;23:845-56.
666. Fazel S, Cimini M, Chen L, Li S, Angoulvant D, Fedak P, Verma S, Weisel RD, Keating A and Li RK. Cardioprotective c-kit⁺ cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines. *J Clin Invest*. 2006;116:1865-77.
667. Hodgkinson CP, Naidoo V, Patti KG, Gomez JA, Schmeckpeper J, Zhang Z, Davis B, Pratt RE, Mirotso M and Dzau VJ. Abi3bp is a multifunctional autocrine/paracrine factor that regulates mesenchymal stem cell biology. *Stem Cells*. 2013;31:1669-82.
668. Hodgkinson CP, Gomez JA, Payne AJ, Zhang L, Wang X, Dal-Pra S, Pratt RE and Dzau VJ. Abi3bp regulates cardiac progenitor cell proliferation and differentiation. *Circ Res*. 2014;115:1007-16.
669. Koglin J, Glysing-Jensen T, Mudgett JS and Russell ME. Exacerbated transplant arteriosclerosis in inducible nitric oxide-deficient mice. *Circulation*. 1998;97:2059-65.
670. Iwata A, Sai S, Moore M, Nyhuis J, de Fries-Hallstrand R, Quetingco GC and Allen MD. Gene therapy of transplant arteriopathy by liposome-mediated transfection of endothelial nitric oxide synthase. *J Heart Lung Transplant*. 2000;19:1017-28.
671. Discher DE, Mooney DJ and Zandstra PW. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science*. 2009;324:1673-7.
672. Williams AR and Hare JM. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res*. 2011;109:923-40.
673. Dayan V, Yannarelli G, Billia F, Filomeno P, Wang XH, Davies JE and Keating A. Mesenchymal stromal cells mediate a switch to alternatively activated monocytes/macrophages after acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2011;106:1299-310.
674. van den Akker F, de Jager SC and Sluijter JP. Mesenchymal stem cell therapy for cardiac inflammation: immunomodulatory properties and the influence of toll-like receptors. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:181020.

675. Yla-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I and Hartikainen J. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49:1015-26.
676. Hattori K, Dias S, Heissig B, Hackett NR, Lyden D, Tateno M, Hicklin DJ, Zhu Z, Witte L, Crystal RG, Moore MA and Rafii S. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 2001;193:1005-14.
677. Hiasa K, Egashira K, Kitamoto S, Ishibashi M, Inoue S, Ni W, Zhao Q, Nagata S, Katoh M, Sata M and Takeshita A. Bone marrow mononuclear cell therapy limits myocardial infarct size through vascular endothelial growth factor. *Basic Res Cardiol*. 2004;99:165-72.
678. Zarnegar R and Michalopoulos GK. The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. *J Cell Biol*. 1995;129:1177-80.
679. Nakamura T, Mizuno S, Matsumoto K, Sawa Y, Matsuda H and Nakamura T. Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF. *J Clin Invest*. 2000;106:1511-9.
680. Niagara MI, Haider H, Jiang S and Ashraf M. Pharmacologically preconditioned skeletal myoblasts are resistant to oxidative stress and promote angiomyogenesis via release of paracrine factors in the infarcted heart. *Circ Res*. 2007;100:545-55.
681. Boros P and Miller CM. Hepatocyte growth factor: a multifunctional cytokine. *Lancet*. 1995;345:293-5.
682. Miyagawa S, Sawa Y, Taketani S, Kawaguchi N, Nakamura T, Matsuura N and Matsuda H. Myocardial regeneration therapy for heart failure: hepatocyte growth factor enhances the effect of cellular cardiomyoplasty. *Circulation*. 2002;105:2556-61.
683. Duan HF, Wu CT, Wu DL, Lu Y, Liu HJ, Ha XQ, Zhang QW, Wang H, Jia XX and Wang LS. Treatment of myocardial ischemia with bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing hepatocyte growth factor. *Mol Ther*. 2003;8:467-74.
684. Urbanek K, Torella D, Sheikh F, De Angelis A, Nurzynska D, Silvestri F, Beltrami CA, Bussani R, Beltrami AP, Quaini F, Bolli R, Leri A, Kajstura J and Anversa P. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:8692-7.
685. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*. 1998;338:436-45.
686. Murphy PM. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. *N Engl J Med*. 2001;345:833-5.
687. Schutyser E, Su Y, Yu Y, Gouwy M, Zaja-Milatovic S, Van Damme J and Richmond A. Hypoxia enhances CXCR4 expression in human microvascular endothelial cells and human melanoma cells. *Eur Cytokine Netw*. 2007;18:59-70.
688. Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M, Rovner A, Ellis SG, Thomas JD, DiCorleto PE, Topol EJ and Penn MS. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet*. 2003;362:697-703.
689. Heldin CH, Westermark B and Wasteson A. Platelet-derived growth factor. Isolation by a large-scale procedure and analysis of subunit composition. *Biochem J*. 1981;193:907-13.
690. Raines EW and Ross R. Platelet-derived growth factor. I. High yield purification and evidence for multiple forms. *J Biol Chem*. 1982;257:5154-60.
691. Raines EW. PDGF and cardiovascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15:237-54.
692. Sarzani R, Arnaldi G and Chobanian AV. Hypertension-induced changes of platelet-derived growth factor receptor expression in rat aorta and heart. *Hypertension*. 1991;17:888-95.
693. Edelberg JM, Lee SH, Kaur M, Tang L, Feirt NM, McCabe S, Bramwell O, Wong SC and Hong MK. Platelet-derived growth factor-AB limits the extent of myocardial infarction in a rat model: feasibility of restoring impaired angiogenic capacity in the aging heart. *Circulation*. 2002;105:608-13.
694. Zheng J, Shin JH, Xaymardan M, Chin A, Duignan I, Hong MK and Edelberg JM. Platelet-derived growth factor improves cardiac function in a rodent myocardial infarction model. *Coron Artery Dis*. 2004;15:59-64.
695. Xaymardan M, Tang L, Zagreda L, Pallante B, Zheng J, Chazen JL, Chin A, Duignan I, Nahirney P, Rafii S, Mikawa T and Edelberg JM. Platelet-derived growth factor-AB promotes the generation of adult bone marrow-derived cardiac myocytes. *Circ Res*. 2004;94:E39-45.
696. Hao X, Mansson-Broberg A, Blomberg P, Dellgren G, Siddiqui AJ, Grinnemo KH, Wardell E and Sylven C. Angiogenic and cardiac functional effects of dual gene transfer of VEGF-A165 and PDGF-BB after myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;322:292-6.
697. Hao X, Mansson-Broberg A, Gustafsson T, Grinnemo KH, Blomberg P, Siddiqui AJ, Wardell E and Sylven C. Angiogenic effects of dual gene transfer of bFGF and PDGF-BB after myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;315:1058-63.

698. Schweigerer L, Neufeld G, Friedman J, Abraham JA, Fiddes JC and Gospodarowicz D. Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. *Nature*. 1987;325:257-9.
699. Schumacher B, Pecher P, von Specht BU and Stegmann T. Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors: first clinical results of a new treatment of coronary heart disease. *Circulation*. 1998;97:645-50.
700. Henry TD, Grines CL, Watkins MW, Dib N, Barbeau G, Moreadith R, Andrasfay T and Engler RL. Effects of Ad5FGF-4 in patients with angina: an analysis of pooled data from the AGENT-3 and AGENT-4 trials. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:1038-46.
701. Lu H, Xu X, Zhang M, Cao R, Brakenhielm E, Li C, Lin H, Yao G, Sun H, Qi L, Tang M, Dai H, Zhang Y, Su R, Bi Y, Zhang Y and Cao Y. Combinatorial protein therapy of angiogenic and arteriogenic factors remarkably improves collateralogenesis and cardiac function in pigs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:12140-5.
702. Padua RR and Kardami E. Increased basic fibroblast growth factor (bFGF) accumulation and distinct patterns of localization in isoproterenol-induced cardiomyocyte injury. *Growth Factors*. 1993;8:291-306.
703. Kardami E. Stimulation and inhibition of cardiac myocyte proliferation in vitro. *Mol Cell Biochem*. 1990;92:129-35.
704. Sakakibara Y, Nishimura K, Tambara K, Yamamoto M, Lu F, Tabata Y and Komeda M. Prevascularization with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor enhances the benefits of cardiomyocyte transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002;124:50-6.
705. Baker J, Liu JP, Robertson EJ and Efstratiadis A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*. 1993;75:73-82.
706. Werner H and Le Roith D. The insulin-like growth factor-I receptor signaling pathways are important for tumorigenesis and inhibition of apoptosis. *Crit Rev Oncog*. 1997;8:71-92.
707. Ishii DN and Lupien SB. Insulin-like growth factors protect against diabetic neuropathy: effects on sensory nerve regeneration in rats. *J Neurosci Res*. 1995;40:138-44.
708. Arsenijevic Y, Weiss S, Schneider B and Aebischer P. Insulin-like growth factor-I is necessary for neural stem cell proliferation and demonstrates distinct actions of epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2. *J Neurosci*. 2001;21:7194-202.
709. de Pablo F and de la Rosa EJ. The developing CNS: a scenario for the action of proinsulin, insulin and insulin-like growth factors. *Trends Neurosci*. 1995;18:143-50.
710. Urbanek K, Rota M, Cascapera S, Bearzi C, Nascimbene A, De Angelis A, Hosoda T, Chimenti S, Baker M, Limana F, Nurzynska D, Torella D, Rotatori F, Rastaldo R, Musso E, Quaini F, Leri A, Kajstura J and Anversa P. Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival. *Circ Res*. 2005;97:663-73.
711. Border WA and Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med*. 1994;331:1286-92.
712. Blobel GC, Schiemann WP and Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med*. 2000;342:1350-8.
713. Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, Kulkarni AB, Karlsson S and Akhurst RJ. Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development*. 1995;121:1845-54.
714. Oshima M, Oshima H and Taketo MM. TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol*. 1996;179:297-302.
715. Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, Amlot P, Gazdar AF, King SW, Letarte M, Vitetta ES and Thorpe PE. Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res*. 1995;1:1623-34.
716. Bartram U, Molin DG, Wisse LJ, Mohamad A, Sanford LP, Doetschman T, Speer CP, Poelmann RE and Gittenberger-de Groot AC. Double-outlet right ventricle and overriding tricuspid valve reflect disturbances of looping, myocardialization, endocardial cushion differentiation, and apoptosis in TGF-beta(2)-knockout mice. *Circulation*. 2001;103:2745-52.
717. Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P and ten Dijke P. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J*. 2002;21:1743-53.
718. Li J, Hampton T, Morgan JP and Simons M. Stretch-induced VEGF expression in the heart. *J Clin Invest*. 1997;100:18-24.
719. Li TS, Hayashi M, Ito H, Furutani A, Murata T, Matsuzaki M and Hamano K. Regeneration of infarcted myocardium by intramyocardial implantation of ex vivo transforming growth factor-beta-preprogrammed bone marrow stem cells. *Circulation*. 2005;111:2438-45.

Chapitre 14 – Curriculum Vitae

Lieu de naissance : Paris (France)

Lieu de pratique actuel : Chirurgien cardiaque (CHR Liège)

Adresse : Boulevard du Douzième de Ligne 1, 4000 Liège, Belgique

Téléphone : +32 486386187

EXPÉRIENCE PROFESSIONNELLE

Docteur en médecine : 2004 (ULB, Belgique)

Chirurgien cardiovasculaire et thoracique : 2010 (ULB, Belgique)

Chef de Clinique en chirurgie cardiaque : 2010-2012 (Hôpital La Pitié-Salpêtrière, Paris, France)

Chef de Clinique en chirurgie cardiaque : 2012-2013 (Hôpital Bichat, Paris, France)

Fellowship clinique et de recherche : 2013-2016 (Institut de cardiologie de Montréal, Montréal, Canada)

Chirurgien cardiaque : 2016-2018 (GHDC, Gilly, Belgique)

Chirurgien cardiaque (Chef de Service f.f) : 2019-2020 (CHR Liège, Liège, Belgique)

ÉDUCATION

M.D., Université Libre de Bruxelles	1997-2004
Résidence en chirurgie cardiaque adulte, Université Libre de Bruxelles	2004-2010
M.Sc. Sciences chirurgicales, Université de Paris Est	2012-2013
Ph.D Sciences Biomédicales, Université de Montréal	2014-2021
Fellowship clinique et de recherche (ICM Montréal, Canada):	2013-2016

PUBLICATIONS ET RESUMES

1. **Nguyen A**, Jansens J-L, De Cannière D..Robotic Thoracoscopy and Minimally Invasive Cardiac Surgery: Is It Really Useful? Acta Chirurgica Belgica 2006, 106
2. **Nguyen A**, Sokolow Y., Nyst B., Baize A., Rondelet B., Cappello M. Predictive Factors of Morbidity and Mortality in Oncologic Thoracic Surgery: Retrospective study about 409 cases. Acta Chirurgica Belgica 2006, 106

3. **Nguyen A**, El Oumeiri B., Astarci P., Verhelst B., Lacroix V. Abdominal Aortic Aneurysm and synchronous colic neoplasia : Surgical Strategy? *Acta Chirurgica Belgica*, 2008, 104
4. **Nguyen A**, De Loecker I, Schraeverus P. Double Wires reduces infection risk in CABG patients when bilateral thoracic artery are used *J Cardiovasc Surg* 2009; 45:2
5. **Nguyen A**, Amond L, Remy Ph., d'Hont Ch, Massin H. Laparoscopic Aorto Iliac Bypass for LCIA Aneurysm *Acta Chirurgica Belgica*, 2009, 102.
6. **Nguyen A**, Pozzi M, Mastroianni C, Leprince P, Pavie A, Leger P, Kirsch M. Bridge to transplant using BIVAD or total artificial heart: is there a survival difference? *J Cardiovasc Surg* 2012; 53:5
7. **Nguyen A**, Pozzi M, Mastroianni C, Leprince P, Pavie A, Leger P, Kirsch M. Bridge to transplant using BIVAD or total artificial heart: is there a survival difference? *J Heart Lung Transplant* 2012; 31:S109-S110.
8. **Nguyen A**, Pozzi M, Mastroianni C, Pavie A, Leger P, Leprince P, Kirsch M. Bridge to transplant using BIVAD or total artificial heart: is there a survival difference? 7th ESAO Winter School 2012. New emerging technology in organ failure: artificial organ vs. transplantation. Catania, 2 - 4 Février 2012.
9. Pozzi M, Quessard A, **Nguyen A**, Mastroianni C, Niculescu M, Pavie A, Leprince P. Impella LP 5.0 as bridge to long-term mechanical circulatory support. 7th ESAO Winter School 2012. New emerging technology in organ failure: artificial organ vs. transplantation. Catania, 2 - 4 Février 2012.
10. Mastroianni C, Quessard A, **Nguyen A**, Pozzi M, Pavie A, Leprince P. Pitié-Salpêtrière experience with Abiomed Impella LP 5.0. 7th ESAO Winter School 2012. New emerging technology in organ failure: artificial organ vs. transplantation. Catania, 2 - 4 Février 2012.
11. Pozzi M, **Nguyen A**, Kirsch M. Virtual collapsed true lumen in acute type A aortic dissection. *Asian Cardiovasc Thoracic Ann* July 9, doi: 10.1177/0218492312463568.
12. Touma Y, **Nguyen A**, Iannino N, Assayag P, Kirsch M. Traitement de la coarctation native de l'aorte chez l'adulte. *Presse Med* 2013 Apr 17. pii: S0755-4982(13)00504-6 (Review)

13. Kirsch M, **Nguyen A**, Mastroianni C, Pozzi M, Léger P, Nicolescu M, Varnous S, Pavie A, Leprince P. SynCardia temporary total artificial heart as bridge to transplantation: current results at La Pitié hospital. *Ann Thorac Surg* 2013 May;95(5):1640-6 (AO)
14. Pozzi M, Quessard A, **Nguyen A**, Mastroianni C, Nicolescu M, Pavie A, Leprince P Using the Impella 5.0 with a right axillary artery approach as bridge to long-term mechanical circulatory assistance. *Int J Artif Organs*. 2013 Aug 2:0. doi: 10.5301/ijao.5000237 (AO)
15. Lenoir M, Quessard A, **Nguyen A**, Kirsch M. Simplified temporary right ventricular support after LVAD implantation. *Heart Surg Forum*. 2013 Jun 1;16(3): E152-4. doi: 10.1532/HSF98.20131003. (Review)
16. Pozzi M, Barreda E, D'Alessandro C, **Nguyen A**, Leprince P, Pavie A. Unusual heart transplantation for iterative disinsertion of mitral prosthesis *Asian Cardiovasc Thoracic Ann* published online 9 July 2013 DOI:10.1177/0218492312463916 (AO)
17. Pozzi M, d'Alessandro C, Fernandez F, **Nguyen A**, Pavie A, Leprince P, Varnous S, Kirsch M. Who gets a second heart? Current picture of cardiac retransplantation *Transplant Proc*. 2014 Jan-Feb;46(1):202-7. doi: 10.1016/j.transproceed.2013.08.109. (AO)
18. **Nguyen A**, Fortin W, Mazine A, Carrier M, Cartier R, El Hamamsy I, Lamarche Y, Pellerin M, Perrault L, Bouchard D, Demers P. Sutureless Aortic Valve Replacement Using the Perceval S Prosthesis: Should Bicuspid Disease Be a Contraindication? *Canadian Journal of Cardiology*. Volume 30, Issue 10, Supplement, Page S238, October 2014
19. **Nguyen A**, Pozzi M, Mastroianni C, Léger P, Pavie A, Loisanche D, Leprince P, Kirsch M. Bridge to transplantation using paracorporeal biventricular assist devices or the Syncardia temporary total artificial heart: is there a difference? *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2015 Jun;56(3):493-502 (AO)
20. **Nguyen A**, Dorent R, Louedec L, Nicoletti A, Ly H, Perrault L, Nataf P, Michel JB. Cardiomyocyte cell targets of humoral rejection in cardiac transplantation *J Heart Lung Transplant* April 2015; Vol 34, No 4S-826
21. **Nguyen A**, M. Pellerin. Complex Mitral Valve endocarditis treated by minimally invasive approach; *ATS Mitral Conclave, NY 2015, Supplement*

22. **Nguyen A**, Fortin W, Mazine M, Bouchard D, Carrier M, El Hamamsy I, Lamarche Y, Demers P. Sutureless aortic valve replacement in patients who have bicuspid aortic valve. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2015 OCT ;150(4): 851-7
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jtcvs.2015.05.071> (AO) With editorial of : Mattia Glauber, Matteo Ferrarini, Antonio Lio, Antonio Miceli Dealing with a stenotic bicuspid aortic valve: Is this still an off-label procedure for a sutureless valve? *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2015 Oct ;150(4) :858-9Published online: July 18, 2015 (EC)
23. Forcillo F, Bouchard D, **Nguyen A**, Perrault L, Cartier R, Pellerin M, Demers D, Stevens LM; Carrier M Perioperative Outcomes with the sutureless versus stented biological aortic valves in elderlies *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2016 Jun ;151(6) :1629-36 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtcvs.2015.12.056> (AO)
24. **Nguyen A**, C. Sid-Ottmane, L. Perrault, H. Ly. Adipose derived stromal cells cultured as spheroids improves cardiac allograft vasculopathy development in a heart transplantation model. *Canadian Journal of Cardiology*, Vol. 32, Issue 10, S171. Published in issue: October 2016
25. **Nguyen A**, Pellerin M, Perrault LP, White M, Ducharme A, Racine N, Carrier M. Experience with the SynCardia total artificial heart in a Canadian centre. *Can J Surg.* 2017 Dec;60(6):375-379.
26. Vistarini N, **Nguyen A**, White M, Racine N, Perrault LP, Ducharme A, Bouchard D, Demers P, Pellerin M, Lamarche Y, El-Hamamsy I, Giraldeau G, Pelletier G, Carrier M. Changes in patient characteristics following cardiac transplantation: the Montreal Heart Institute experience. *Can J Surg.* 2017 Sep;60(5):305-310.
27. Hamad R, **Nguyen A**, Laliberté É, Bouchard D, Lamarche Y, El-Hamamsy I, Demers P. Comparison of del Nido Cardioplegia With Blood Cardioplegia in Adult Combined Surgery. *Innovations (Phila).* 2017 Sep/Oct;12(5):356-362.
28. **Nguyen A**, Stevens LM, Bouchard D, Demers P, Perrault LP, Carrier M. Early Outcomes with Rapid-deployment vs Stented Biological Valves: A Propensity-match Analysis. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2018 Spring;30(1):16-23. doi: 10.1053/j.semtcvs.2017.09.002. Epub 2017 Sep 8.