

Université de Montréal

**DÉFAILLANCE CARDIAQUE ET MÉCANISMES
DE PROTECTION ET DE RÉPARATION DU MYOCARDE**

Par
Simon Maltais MD PhD FRCSC

Laboratoire de chirurgie expérimentale animale
Département de chirurgie cardiaque

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de
PhD en Sciences Biomédicales (3-484-1-0)

Août 2010

©Simon Maltais, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

DÉFAILLANCE CARDIAQUE ET MÉCANISMES
DE PROTECTION ET DE RÉPARATION DU MYOCARDE

Présenté par :

Simon Maltais

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Martin Sirois, PhD : président-rapporteur

Louis P Perrault, MD PhD : directeur de recherche

Hung Quoc Ly, MD : co-directeur de recherche

Michel Nguyen, MD : membre du jury

Pierre Voisine, examinateur externe

Jacques Billette, représentant du doyen de la FES

Résumé

La cardiomyopathie ischémique et l'insuffisance cardiaque (IC) sont deux des principales causes de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés^{1, 2}. L'IC représente la condition finale résultant de plusieurs pathologies affectant le myocarde. Au Canada, plus de 400 000 personnes souffrent d'IC¹. Malgré la grande variété de traitements disponibles pour prendre en charge ces patients à haut risque de mortalité, l'évolution et le pronostic clinique de cette population demeurent sombres. Les thérapies de régénération par transplantation cellulaire représentent de nouvelles approches pour traiter les patients souffrant d'IC. L'impact de cette approche cellulaire et les mécanismes qui sous-tendent l'application de ce nouveau mode de traitement demeurent obscurs. Les hypothèses proposées dans cette thèse sont les suivantes : 1) l'évolution à long terme des patients qui se présentent en IC grave est nettement défavorable malgré les techniques actuelles de revascularisation chirurgicale à cœur battant; 2) la thérapie cellulaire et, plus spécifiquement, l'injection intracoronaire précoce de milieu de culture cellulaire, permet d'améliorer la récupération fonctionnelle du ventricule gauche suite à un infarctus aigu du myocarde; et 3) la mobilisation de l'axe cœur-moelle osseuse constitue un mécanisme de réponse important lors de la survenue d'un événement ischémique chronique affectant le myocarde.

Mots-clés : insuffisance cardiaque, revascularisation coronarienne, thérapie cellulaire, régénération du myocarde, effet paracrine, axe cœur/moelle osseuse, cellules endothéliales progénitrices

Summary

Congestive heart failure (CHF) remains a leading cause of mortality in the developed world. There are more than 400,000 diagnosed cases of this pathology in Canada¹. Despite the numerous treatment options available for patients presenting with left ventricular dysfunction, the evolution of this population is still dismal. Stem cell transplantation is a potential approach to repopulate the injured myocardium, to treat heart failure, and to restore cardiac function. However, the exact mechanisms underlying the beneficial effects of this approach remain to be elucidated. The hypotheses of this thesis are the following: 1) the long-term evolution of patients undergoing coronary artery bypass graft surgery is still poor, even when considering the use of new innovative surgical strategies such as off-pump coronary revascularization; 2) the intracoronary injection of concentrated biologically active factors secreted by stem cells can achieve early protection of the ischemic myocardium and preserve heart function; and 3) the bone marrow/heart interaction in a critical axis is involved in chronic myocardial repair following persistent ischemic injury.

Key words : heart failure, coronary artery revascularization, cellular therapy, myocardial regeneration, paracrine effect, bone marrow/heart axis, endothelial progenitor cells

Table des matières

Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Listes des annexes.....	xiii
Listes des abréviations.....	xiv
Remerciements.....	xx
Introduction : hypothèses et buts.....	23
Chapitre 1 : Définitions et approches de la cardiomyopathie ischémique sévère.....	24
1.1 Définition de l'insuffisance cardiaque.....	28
1.2 Classification.....	29
1.3 Statistiques récentes et importance clinique.....	30
1.4 Étiologies de l'insuffisance cardiaque.....	31
1.5 Physiologie de l'insuffisance cardiaque.....	33
1.6 Traitement médical.....	35
1.7 Approches chirurgicales.....	37
1.7.1 Revascularisation coronarienne sous CEC.....	38
1.7.2 Résultats de la revascularisation sous CEC.....	39
1.7.3 Revascularisation coronarienne à cœur battant... ..	40
1.7.4 Résultats de la revascularisation à cœur battant... ..	41
1.7.5 Reconstruction ventriculaire.....	42
1.7.6 Thérapie de resynchronisation.....	45

1.7.7	Greffe cardiaque.....	47
1.7.8	Assistance circulatoire à long terme.....	48
Chapitre 2 : Manuscrit #1.....		50
2.1	Avant-propos au Manuscrit #1.....	51
Chapitre 3 : Mécanismes de réparation lors d'un infarctus du myocarde.....		78
3.1	Définition et statistiques récentes.....	79
3.2	Physiopathologie.....	80
3.3	Séquence d'événements suivant la reperfusion du myocarde.....	81
3.4	Physiopathologie : Le remodelage ventriculaire.....	83
3.4.1	Altérations de la biologie des cardiomyocytes.....	86
3.4.2	Altérations propres aux cardiomyocytes.....	91
3.4.3	Libération de cytokines/médiateurs inflammatoires.....	92
3.4.4	Altérations des voies de signalisation.....	93
3.5	Intégration des mécanismes de remodelage.....	96
3.6	Thérapie cellulaire lors d'un infarctus du myocarde.....	98
3.6.1	Sources de cellules potentielles.....	98
3.6.2	Voies d'administration utilisées.....	102
3.6.3	Mécanismes proposés.....	105
3.6.3.1	Fusion/Transdifférenciation.....	105
3.6.3.2	Effets paracrines.....	106
3.6.4	Résumé des études cliniques.....	112
Chapitre 4 : Manuscrit #2.....		114

4.1 Avant-propos au Manuscrit #2.....	115
Chapitre 5 : Manuscrit #3.....	139
5.1 Avant-propos au Manuscrit #3.....	140
Chapitre 6 : Mécanismes cellulaires de réparation chronique.....	174
6.1 Hibernation chronique du myocarde : définition.....	176
6.2 Cellules endothéliales progénitrices, biomarqueurs de la pathologie cardiovasculaire.....	178
6.3 Thérapie cellulaire et mécanismes de réparation chronique.....	180
6.4 Mécanismes de mobilisation des cellules endothéliales progénitrices provenant de la MO.....	182
6.5 Résumé des études cliniques.....	186
Chapitre 7 : Manuscrit #4.....	188
7.1 Avant-propos au Manuscrit #4.....	189
Chapitre 8 : Manuscrit #5.....	209
8.1 Avant-propos au Manuscrit #5.....	210
Chapitre 9 : Discussion.....	239
Chapitre 10 : Conclusion.....	252
Chapitre 11 : Annexes.....	254
11.1 Annexe 1 : Lettre de modification de co-directeur.....	255
11.2 Annexe 2 : Projet REPAIR-ICM.....	256
11.3 Annexe 3 : Articles publiés.....	276
11.4 Annexe 4 : Communications tirées des présentes études.....	277
Chapitre 12 : Références.....	280

Chapitre 13 : Curriculum vitæ.....	312
------------------------------------	-----

Liste des tableaux

Tableau I. Étiologies de l'insuffisance cardiaque chronique.....	32
Tableau II. Demographic characteristics.....	69
Tableau III. Operative Data.....	71
Table IV. Postoperative data.....	72
Tableau V. Multivariate COX regression analysis model for overall survival.....	72
Tableau VI. Résumé des mécanismes impliqués dans le remodelage ventriculaire.....	84
Tableau VII. Effets délétères des médiateurs inflammatoires	96
Tableau VIII. MSC surface markers.....	163
Tableau IX. Echocardiographic data.....	165
Tableau X. Cardiomyocytes apoptosis by TUNEL labeling.....	166
Tableau XI. Detection of secreted factors by protein array.....	167
Tableau XII. Sequences of forward and reverse primers used for RT-PCR.....	173
Tableau XIII. Summary of in vitro and in vivo studies linking EPCs properties, function and statin therapy.....	205
Tableau XIV. Summary of surgical evidences suggesting that EPC levels and their proliferative capacity are increased after CABG surgery.....	207
Tableau XV. Echocardiographic findings.....	230
Tableau XVI. List of primers used for semi-quantitative and RT-PCR.....	238

Liste des figures

Figure 1. Courbe de Kaplan-Meier présentant l'évolution des patients en fonction de la probabilité de survenue de l'issue primaire.....	44
Figure 2. Analyse de survie comparative analysant l'évolution des patients de l'étude.....	49
Figure 3. Survival curve comparing patients with low ejection fraction (<35%) (dashed line) and normal ejection fraction (solid line) after correcting for risk factors.....	74
Figure 4. Freedom from cardiac death survival curve comparing patients with low ejection fraction (<35%) (dashed line) and normal ejection fraction (solid line) after correcting for risk factors.....	75
Figure 5. Major adverse cardiac event-free survival curve comparing patients with low ejection fraction (<35%) (dashed line) and normal ejection fraction (solid line) after correcting for risk factors.....	76
Figure 6. Freedom from cardiac heart failure (CHF) survival curve comparing patients with low ejection fraction (<35%) (dashed line) and normal ejection fraction (solid line) after correcting for risk factors.....	77

Figure 7. Changements morphologiques des cardiomyocytes en réponse à une surcharge hémodynamique de pression ou à une surcharge volémique.....	88
Figure 8. Mécanismes et équilibre impliqués dans l’hypertrophie, l’apoptose et la survie des cardiomyocytes au cours de la transition vers l’insuffisance cardiaque chronique en réponse à un stress biomécanique/ischémique.....	96
Figure 9. Action paracrine des CS et mécanismes potentiels de réparation.....	110
Figure 10. Serum cardiac troponin T elevation at different time points.....	168
Figure 11. Echocardiographic analysis at day 7 to evaluate early cardiac function recovery.....	169
Figure 12. Quantitative evaluation of fibrosis by Verhoff staining of left ventricular sections at 7 days post-treatment.....	170
Figure 13. Masson’s Trichrome staining at 7 days.....	171
Figure 14. Detection of growth factors in the supernatants of cultures MSC.....	172
Figure 15. A schematic representation of the BM-cardiac axis for cell-based myocardial repair and summary of potential changes observed during the progression of HF.....	208

Figure 16. Chronic occlusion of the proximal LAD artery.....	231
Figure 17. Direct fluorescent staining of endothelial progenitor cells from fresh mononuclear cells.....	232
Figure 18. Mean number of PB and BM-derived mononuclear cells according to three time points (0, 45, 90 days) following LAD instrumentation.....	234
Figure 19. Mean number of circulating EPC according to three time points (0, 45, 90 days) following LAD instrumentation.....	235
Figure 20. Migration assays using cultured EPCs.....	236
Figure 21. Changes in the mRNA expression of HIF-1 and SDF-1 in the BM of swines according to three time points following LAD instrumentation.....	242

Liste des annexes

Annexe 1 : Lettre de modification de co-directeur.....	253
Annexe 2 : Projet REPAIR-ICM.....	254
Annexe 3 : Articles publiés.....	276
Annexe 4 : Communications tirées des présentes études.....	277

Liste des abréviations

ACC = American College of Cardiology

AF = atrial fibrillation

AHA = American Heart Association

AMI = acute myocardial infarction

ARN = acide ribonucléique

ARA=antagoniste du récepteur de l'angiotensine

AVC = accident vasculaire cérébral

BM = bone marrow

BMMNC = bone marrow mononuclear cells

BNP = brain natriuretic peptide

CABG = coronary artery bypass grafting

CCT = cardiac cell therapy

CEC = circulation extracorporelle

CEP = cellules endothéliales progénitrices

cDNA = complementary DNA

CHD = congestive heart disease

CHF = congestive heart failure

CHUL = Centre hospitalier de l'Université Laval

CHUM = Centre hospitalier de l'Université de Montréal

CHUQ = Centre hospitalier universitaire de Québec

CI = confidence interval

CIHR = Canadian Institute of Health Research

CMN = cellules mononucléaires

CM or Cmed = Conditioned medium

CMI = cardiomyopathie ischémique

CO = cardiac output

CPB = cardiopulmonary bypass

CS = cellules souches

CSA = cross sectional area

CSH = cellules souches hématopoïétiques

CSM = cellules souches mésenchymateuses

DNA = deoxyribonucleic acid

EF = ejection fraction

ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay

eNOS = endothelial nitric oxide synthase

SV = stroke volume

EKG = electrocardiogram

EPC = endothelial progenitor cells

EPO = erythropoietin

ES = embryonic cells

EDA = end diastolic area

ESA = end systolic area

ETT = échocardiographie transthoracique

FA = fibrillation auriculaire

FAS = fractional area shortening

FÉVG = fraction d'éjection du ventricule gauche

FGF = fibroblast growth factor

FRSQ = Fonds de la recherche en santé du Québec

G-CSF = granulocytes colony-stimulating factor

GFP = green fluorescent protein

HIF-1 = hypoxic-inducible factor 1

HGF = hepatic growth factor

HR = heart rate

IC = insuffisance cardiaque

ICM = Institut de Cardiologie de Montréal

ICU = intensive care unit

IDM = infarctus du myocarde

IECA = inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine

IGF-1 = insulin-like growth factor 1

IHD = ischemic heart disease

IL = interleukine

ITA = internal thoracic artery

IVA = interventriculaire antérieure

KIU = Kallikrein International Unit

LAD = left anterior descending

LV = left ventricle

LVEF = left ventricle ejection fraction

LVEDV = left ventricle end diastolic volume

LVESV = left ventricle end systolic volume

LVOT = left ventricle outflow tract

MACE = major adverse cardiac events

MCP-1 = monocyte chemoattractant protein-1

MEC = matrice extracellulaire

MHI = Montreal Heart Institute

MI = myocardial infarction

MMP = matrix metalloproteinases

MNC = mononuclear nuclear cell

MSC = mesenchymal stem cells

NO = nitric oxide (monoxyde d'azote)

NSTEMI = non-ST elevation myocardial infarction

NYHA = New York Heart Association

ONCAB = on-pump coronary artery bypass

OPCAB = off-pump coronary artery bypass

PBMNC = peripheral blood mononuclear cells

PCI = percutaneous coronary intervention

PCR = polymerase chain reaction

PECAM-1 = platelet endothelial cell adhesion molecule 1

PIGF = placental growth factor

PDGF = platelet-derived growth factor

RL = radicaux libres

ROS = reactive oxygen species

RNA = ribonucleic acid

RT-PCR = reverse transcriptase polymerase chain reaction

SC = stem cells

SCF = stem cell factor

SDF-1 = stromal-derived factor 1

sFRP = secreted frizzled related protein

SKM = skeletal myoblasts

SPC = stem progenitor cells

SVR = surgical ventricular reconstruction

TGF = transforming growth factor

TIMP = tissue inhibitor of metalloproteinases

TNF = tumor necrosis factor

TRC = thérapie de resynchronisation cardiaque

TTE = transthoracic echocardiography

VEGF = vascular endothelial growth factor

VEGFR = vascular endothelial growth factor receptor

VG = ventricule gauche

VTI = velocity times integral

vWF = von Willebrand factor

WMSI = wall motion score index

À la mémoire d'Heidi, notre petit ange qui occupera toujours une place particulière dans nos pensées...

Remerciements

Mes remerciements s'adressent en premier lieu aux membres du jury pour leur travail minutieux et leurs critiques constructives.

J'aimerais ensuite remercier chaleureusement toute l'équipe du laboratoire de chirurgie expérimentale animale de l'Institut de Cardiologie de Montréal pour sa patience, son soutien inconditionnel et sa tolérance envers mes caprices au cours des années qui ont été nécessaires pour compléter cette formation de recherche translationnelle : Marie-Pierre Mathieu et Stéphanie Blanchet, véritables piliers au sein du laboratoire animal, sans qui l'organisation, la mise en place des protocoles expérimentaux et la réalisation des chirurgies n'auraient été possibles; Marie-Claude Aubin, qui m'a permis de développer une grande quantité de réflexes d'analyse en recherche expérimentale; Louis P. Perrault, « mentor » inconditionnel, qui m'a constamment donné la motivation, le soutien financier, la liberté et l'orientation nécessaires à la réalisation de mes objectifs dans une carrière de recherche en chirurgie.

Je remercie également toute l'équipe du laboratoire expérimental du Dr Jean-François Tanguay, sans qui ces résultats n'auraient pu être atteints : Pascale Geoffroy, Julie Lebel et Sandra Guilligan, pour leur expertise en angiographie animale; Dominique Lauzier, pour les coupes tissulaires et l'immunohistochimie; Hortence Makui, pour sa motivation sans bornes et son aide avec les expériences en lien avec la biologie moléculaire. Aussi, un merci particulier à Lara Bou Khzam pour ses conseils précieux

concernant la culture cellulaire et l'étude de la fonction des cellules endothéliales progénitrices.

Je tiens à remercier spécialement Hung Quoc Ly pour son soutien et son rôle continu de guide dans l'élaboration du plan des études nécessaires à l'élaboration de cette thèse de doctorat. Sa motivation et ses conseils judicieux m'ont permis de progresser rapidement dans mes travaux et de développer une méthode de travail efficace.

Je remercie de plus l'équipe de recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal pour son soutien technique et intellectuel au cours des expériences qui ont mené aux résultats présentés : Maya Mamarbashi pour ses conseils en biologie moléculaire, et Louis Villeneuve pour sa grande expertise en immunofluorescence.

Je remercie le département de chirurgie cardiaque de l'Institut de Cardiologie de Montréal pour son appui et sa grande flexibilité dans l'organisation de mon horaire au cours de ces longues années qui m'ont permis d'acquérir les connaissances et compétences requises pour poursuivre une carrière de recherche en chirurgie. Un merci particulier aux Drs Michel Carrier et Raymond Cartier pour leur soutien dans mes travaux de recherche et leur enthousiasme contagieux pour l'avancement des connaissances en chirurgie cardiaque.

Enfin, des remerciements particuliers à mes parents pour avoir fait preuve d'une « force tranquille » au cours de mes études médicales, chirurgicales et scientifiques.

Pour terminer, une pensée spéciale à Manon pour m'avoir soutenu et encouragé au cours de mes déceptions tout au long de ce cheminement. Merci d'être à la fois ma femme et une amie précieuse : je t'aime.

Introduction : avant-propos

La cardiomyopathie ischémique (CMI) et l'insuffisance cardiaque (IC) sont parmi les principales sources de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés^{1, 2}. L'IC représente l'aboutissement de plusieurs maladies pouvant affecter le myocarde. De récentes statistiques publiées par l'American Heart Association (AHA) ont démontré que plus de 5 millions d'Américains souffraient d'IC³. Au Canada, plus de 400 000 personnes souffrent d'IC¹. Malgré plusieurs progrès dans le domaine du traitement et de la prise en charge des patients souffrant d'IC, la prévalence réelle de cette maladie poursuit une croissance exponentielle⁴, de sorte qu'actuellement, près de 10 % de la population américaine âgée de plus de 65 ans est atteinte de cette pathologie³. Plusieurs mécanismes complexes sont à l'origine de l'IC, ce qui explique le succès limité des traitements qui visent à freiner la progression de cette pathologie vers une perte irréversible de la structure et de la fonction du myocarde^{5, 6}. Au cours des dernières années, la thérapie cellulaire a fait des progrès rapides pour tenter d'offrir de nouvelles avenues de traitement aux patients souffrant d'IC systolique terminale^{7, 8}. La relation entre ces nouvelles approches thérapeutiques et l'amélioration de la fonction myocardique demeure néanmoins obscure. C'est donc avec l'objectif principal de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à l'application de la thérapie cellulaire chez les patients qui souffrent d'IC terminale que j'ai entrepris, en 2007, un doctorat à l'Université de Montréal.

Les hypothèses qui sous-tendent cette thèse de doctorat sont les suivantes :

1) l'évolution à long terme des patients qui se présentent en IC grave est nettement défavorable malgré les techniques actuelles de revascularisation 2) la thérapie cellulaire et, plus spécifiquement, l'injection précoce intracoronaire de milieu de culture cellulaire, permet d'améliorer la récupération fonctionnelle du ventricule gauche (VG) suite à un infarctus aigu du myocarde (IDM); et 3) la mobilisation de l'axe cœur-moelle osseuse (MO) constitue un mécanisme de réponse important lors de l'établissement d'un événement ischémique chronique affectant le myocarde.

Cette thèse comprend trois études originales et deux revues de littérature publiées. La première étude amène d'abord le lecteur à cerner, chez un groupe de 1250 patients, les limites actuelles du traitement chirurgical des patients avec dysfonction du VG. En collaboration avec le Dr Raymond Cartier de l'Institut de Cardiologie de Montréal (ICM), nous démontrerons que, malgré l'application systématique de techniques chirurgicales telles que la revascularisation à cœur battant (« off-pump coronary artery bypass » ou OPCAB), l'évolution à long terme des patients qui subissent une revascularisation coronarienne avec dysfonction du VG est encore sous-optimale, en comparaison à celle de patients avec une fonction ventriculaire normale⁹⁻¹¹. La deuxième étude élabore un modèle de recherche translationnelle afin d'étudier de façon reproductible les mécanismes qui sous-tendent la thérapie cellulaire en période aiguë. En préambule, nous présentons une revue approfondie de la littérature sur l'effet paracrine de la thérapie cellulaire et son rôle potentiel dans l'application de nouvelles avenues de traitement en infarctus aigu. L'étude originale sur ce sujet traite de la mise en place d'un

modèle animal chez le porc permettant d'analyser le rôle de cette nouvelle approche paracrine de préservation myocardique. Nous analysons l'effet potentiel à 7 jours de l'injection intracoronaire d'un milieu de culture cellulaire conditionné suivant une lésion ischémique aiguë. Finalement, nous aborderons dans une revue de littérature le rôle de l'axe cœur-MO et son implication dans les mécanismes cellulaires chroniques de réparation. Le rôle de ce mode de thérapie cellulaire sera ensuite évalué dans un modèle ischémique d'hibernation chronique du myocarde chez le porc. Enfin, la discussion portera sur les observations liées à des travaux non inclus dans les chapitres précités, avant de conclure sur les effets cliniques potentiels de ces recherches.

Chapitre 1 : Définitions et approches de la cardiomyopathie ischémique sévère

Dans ce chapitre, nous présenterons la définition, l'importance clinique et les limites actuelles du traitement des patients qui souffrent d'IC grave. Le candidat au doctorat en sciences biomédicales présentera ensuite son premier travail de recherche réalisé en association avec le Dr Raymond Cartier. Cette étude originale, débutée dans le cadre du programme de PhD et axée sur un groupe de patients souffrant de dysfonction du VG, porte sur l'analyse du pronostic à long terme de 1250 patients subissant une revascularisation OPCAB à l'ICM.

1.1 Définition de l'insuffisance cardiaque

L'IC est un syndrome progressif dû à différentes pathologies cardiaques. À l'origine, la définition clinique de l'IC se résumait comme un état où le myocarde n'arrivait plus à perfuser suffisamment les organes périphériques au repos ou à l'effort¹². Plusieurs auteurs ont ensuite démontré que cette définition devait également englober l'intégration des multiples adaptations neuro-hormonales et les modifications du système vasculaire périphérique¹³. Définissant ainsi le modèle hémodynamique de l'IC¹⁴, l'IC résulte donc d'une incapacité du myocarde à subvenir aux différents besoins physiologiques et hémodynamiques de l'organisme, et ce, en association avec une vasoconstriction périphérique réflexe excessive et des pressions de remplissage (conditions de pré-charge) normales¹⁵.

On définit le « syndrome d'IC » comme un ensemble de signes cliniques comprenant principalement une ou plusieurs des manifestations suivantes :

1. Des phénomènes cliniques d'IC qui se caractérisent par une congestion pulmonaire et périphérique excessive se manifestant par un reflux hépato-jugulaire, l'hépatomégalie, et l'accumulation d'œdèmes périphériques¹⁶. On peut aussi observer des phénomènes antérogrades progressifs tels que la fatigue, la dyspnée ou la cachexie.

2. Des signes qui traduisent une diminution de la fonction du myocarde, dont : une diminution progressive de la fraction d'éjection du ventricule gauche (FÉVG), une dilatation des cavités ventriculaires, des changements anormaux dans la réponse diastolique du myocarde, le remodelage du VG¹⁷.
3. Une accentuation des pressions de remplissage diastolique, associée à une diminution du volume minute cardiaque mesuré¹⁸.

1.2 Classification

La New York Heart Association (NYHA) présente une classification progressive de la gravité clinique de l'IC en fonction du degré de symptomatologie clinique¹⁹ :

- NYHA I : insuffisance cardiaque asymptomatique;
- NYHA II : insuffisance cardiaque asymptomatique au repos et qui se manifeste seulement après un effort physique soutenu;
- NYHA III : insuffisance cardiaque asymptomatique au repos et qui survient au moindre effort physique;
- NYHA IV : insuffisance cardiaque symptomatique au repos.

Cette classification nous permet d'évaluer de degré de gravité clinique des patients qui présentent de l'IC. Cette évaluation, ajoutée à la mesure du peptide cérébral natriurétique (BNP), guide le clinicien dans la prise en charge thérapeutique des patients touchés par cette pathologie chronique^{20, 21}.

Stades de défaillance cardiaque

- Stade A
 - Patients à risque élevé de développer de l'IC. Présence de multiples facteurs de risque de maladie cardiovasculaire. Aucune anomalie de structure et aucun symptôme d'IC.
- Stade B
 - Patients qui présentent une anomalie de structure du myocarde associée au développement d'IC. Aucun symptôme apparent d'IC.
- Stade C
 - Patients avec symptômes d'IC avec anomalies de structure du myocarde
- Stade D
 - Patients avec symptômes sévères au repos d'IC et anomalie de structure terminale nécessitant des interventions thérapeutiques spécialisées.

1.3 Statistiques récentes et importance clinique

Au Canada, le taux de mortalité annuel attribuable à l'IC est de 10 % et le taux de survie à cinq ans atteint 50 %²². Entre 40 % et 50 % des personnes atteintes de cette pathologie décèdent moins de cinq ans après que le diagnostic a été posé²². Selon la gravité des symptômes, la degré de dysfonction cardiaque, l'âge et d'autres facteurs, l'insuffisance cardiaque peut être associée à un taux de mortalité annuel variant entre 5 % et 50 %³. En outre, plusieurs facteurs de risques associés à la maladie cardiovasculaire et au développement de l'IC sont en hausse considérable au Canada¹. En effet, entre 1994 et 2008, les taux de pression artérielle élevée chez les Canadiens ont bondi de 77 %, le diabète de 45 % et l'obésité de 18 %¹. Même les plus jeunes connaissent une augmentation du risque d'IC : dans la population âgée de 35 à 49 ans, par exemple, la prévalence de l'hypertension artérielle a augmenté de 127 %, le diabète de 64 %, et l'obésité de 20 %¹. Tous ces facteurs de risque de maladies cardiovasculaires (Stade A), associés à une population vieillissante, constituent des déterminants majeurs de la progression de l'incidence l'IC—des conditions qualifiées de « tempête parfaite » par la Société canadienne de cardiologie en 2010.

En 2009, le coût moyen des dépenses directes et indirectes associées à l'IC tel que rapporté par l'AHA a été d'environ 39 milliards de dollars aux États-Unis seulement²³. Ce montant atteignait près de 2,7 milliards au Canada en 2008²⁴. Les hôpitaux canadiens de soins aigus ont enregistré près de trois millions (2,8 millions) d'hospitalisations en 2008, une croissance constante par rapport à l'année précédente¹.

1.4 Étiologies de l'insuffisance cardiaque

Il y a environ deux décennies, l'hypertension et les maladies valvulaires constituaient les étiologies les plus fréquentes d'IC²⁵; aujourd'hui, c'est principalement la maladie coronarienne progressive qui occupe la première place (60-70 % des patients avec IC)²⁶. Ce changement de paradigme est principalement lié aux stratégies rapides de revascularisation percutanée lors d'un syndrome coronarien aigu. On note ensuite, en ordre décroissant d'importance, la maladie hypertensive (20-30 %), les cardiomyopathies (5-10 %) et les maladies valvulaires (3-10 %). L'investigation de l'étiologie de l'IC est cruciale compte tenu de tous les différents sous-groupes étiologiques, chacun dictant des interventions thérapeutiques spécifiques. Le tableau I présente les principales étiologies possibles d'une IC chronique (avec ou sans diminution de la FÉVG).

Tableau I. Étiologies de l'insuffisance cardiaque chronique

Maladie coronarienne
<ol style="list-style-type: none"> 1. Infarctus du myocarde* 2. Ischémie myocardique*
Surcharge chronique de pression
<ol style="list-style-type: none"> 1. Hypertension artérielle systémique* 2. Maladie valvulaire obstructive*
Surcharge chronique de volume
<ol style="list-style-type: none"> 1. Insuffisance valvulaire chronique 2. Shunt intracardiaque (gauche-droit) 3. Shunt extracardiaque
Cardiomyopathie non ischémique
<ol style="list-style-type: none"> 1. Trouble héréditaire/génétique 2. Maladies infiltratives* 3. Lésions toxiques ou induites par des drogues 4. Troubles métaboliques* 5. Agents viraux ou infectieux
Troubles du rythme
<ol style="list-style-type: none"> 1. Bradyarythmies chroniques 2. Tachyarythmies chroniques
Cœur pulmonaire
Troubles pulmonaires vasculaires
États chroniques de haut débit
Troubles métaboliques
<ol style="list-style-type: none"> 1. Thyrotoxicose 2. Trouble nutritionnel (béribéri)
Besoins excessifs en apport sanguin
<ol style="list-style-type: none"> 1. Shunt artérioveineux systémique 2. Anémie chronique

*Conditions qui peuvent entraîner une IC chronique avec préservation de la FÉVG.

1.5 Physiologie de l'insuffisance cardiaque

Différentes classifications de l'IC sont utilisées. On peut regrouper l'IC en plusieurs sous-catégories qui permettent de caractériser avec plus de précision cette entité clinique : IC aiguë et chronique, IC gauche et droite, IC à haut et bas débit, IC au repos ou à l'effort, et l'IC antégrade/rétrograde²⁷. Dans la présente thèse de doctorat, il est important d'approfondir le type de dysfonction pouvant survenir dans l'IC, soit la dysfonction systolique ou diastolique.

Fonction ventriculaire systolique

Le but premier du système cardiovasculaire est d'amener une perfusion adéquate aux organes périphériques¹². De façon plus approfondie et complète, la fonction myocardique résulte de l'interaction entre plusieurs éléments importants, notamment les caractéristiques propres au myocarde, l'influence des pressions veineuses centrales, l'action des composantes neurogéniques cardiovasculaires et des résistances périphériques, la régulation par les facteurs humoraux, l'état de remplissage et le volume sanguin circulant²⁸. La fonction systolique du ventricule gauche est ainsi étroitement régulée par quatre mécanismes importants²⁹ :

1. La fréquence cardiaque
2. La précharge (mécanisme de Frank Starling)
3. La contractilité

4. La postcharge.

On considère que ces quatre composantes déterminent la fonction systolique du myocarde et permettent au myocarde de s'adapter rapidement aux besoins changeants de l'organisme³⁰.

Fonction ventriculaire diastolique

On considère que la fonction diastolique joue un rôle considérable dans la performance globale du myocarde. La fonction diastolique est influencée par la structure intrinsèque du myocarde et ses caractéristiques influencent directement la réponse du VG aux changements de précharge et de postcharge³¹. L'augmentation du tissu conjonctif cicatriciel au niveau du VG, entres autres, contribue à une perte progressive de l'élasticité et de la compliance du myocarde. On note ainsi une augmentation graduelle des pressions de remplissage du VG ainsi qu'une congestion pulmonaire secondaire. Une diminution de l'apport sanguin au myocarde (ischémie) contribue également à augmenter le degré de dysfonction diastolique³². Chez les patients qui présentent une dysfonction diastolique, les myocytes cardiaques sont hypertrophiés et la matrice extracellulaire prend une proportion relativement plus importante de collagène. Ceci à pour conséquence d'entraîner une augmentation de l'épaisseur de la paroi du VG, un rapport accru entre l'épaisseur de la paroi et la dimension de la chambre et un rapport masse/volume accru dans le VG. On note alors une réduction de la distensibilité du VG et une augmentation de la pression du VG pour tout volume donné. On peut donc résumer la dysfonction

diastolique par la présence de signes cliniques d'IC, par une préservation relative de la fonction systolique du VG, et par la documentation d'une augmentation des pressions de remplissage ventriculaire (témoignant d'une augmentation de la rigidité ventriculaire).

1.6 Traitement médical

Le traitement médical conventionnel après un IDM avec préservation de la fonction ventriculaire gauche comprend les anti-plaquettaires, les statines, les bêta-bloquants et les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA). Ces derniers visent à stabiliser la progression de la pathologie et à prévenir la diminution de la FÉVG. Lorsque la fonction du VG est altérée après un événement ischémique, le traitement médical seul est insuffisant et ne fait que freiner temporairement la progression de la maladie vers l'IC. C'est à ce moment que vont se manifester les différents signes d'insuffisance ventriculaire³³. Puisqu'il existe une interdépendance étroite entre le ventricule gauche et le ventricule droit, une diminution de la fonction ventriculaire gauche aura un impact secondaire sur les cavités droites, ce qui fera apparaître des signes d'insuffisance cardiaque droite (ex. : œdèmes des membres inférieurs)³³. Cette évolution délétère et chronique de la défaillance cardiaque peut être compliquée d'épisodes de décompensation aiguë précipités par diverses causes : un épisode de fibrillation auriculaire (FA), un événement ischémique, un non-respect de la restriction liquidienne (non-compliance), etc.³⁴.

On dénombre actuellement trois classes thérapeutiques de médicaments utilisés pour diminuer la mortalité et le nombre d'hospitalisations chez les patients souffrant de défaillance cardiaque chronique : les bêta-bloquants, les IECA\ARA et les anti-alдостérones³⁵. Les bêta-bloquants vont contribuer à améliorer la qualité de vie et la récupération fonctionnelle des patients, à réduire le nombre d'épisodes de

décompensation aiguë et à augmenter la FÉVG résiduelle. Plusieurs études randomisées appuient l'utilisation rapide des bêta-bloquants dans le but d'améliorer l'évolution des patients en stade II à IV selon la classification de la NYHA^{35, 36}. Les IECA, quant à eux, agissent sur le remodelage et contribuent aussi à augmenter de manière significative la survie des patients atteints d'IC³⁷. Les anti-aldostérones ont permis de démontrer une diminution d'environ 20 % de la mortalité chez les patients avec IC³⁸. Le mécanisme d'action de cette classe thérapeutique demeure néanmoins méconnu. Enfin, il existe d'autres stratégies d'intervention qui sont également prescrites de manière chronique : les diurétiques, les digitaliques, etc. Bien que ces médicaments aient un impact certain sur la qualité de vie des patients et sur le nombre d'hospitalisations pour IC, aucun ne semble diminuer la mortalité³⁹. Une description exhaustive et détaillée du traitement médical de l'IC dépasse les objectifs de cette thèse, mais, en résumé, l'association de ces différents traitements vise à lutter contre l'activation neuro-hormonale chronique et délétère induite par l'altération de la fonction systolique. Bien entendu, il est important de noter que la modification des facteurs de risques et le changement des habitudes de vie demeurent cruciaux dans le traitement de l'IC.

1.7 Approches chirurgicales

L'arsenal thérapeutique chirurgical utilisé pour traiter les patients qui souffrent de dysfonction ventriculaire gauche grave et d'IC terminale est vaste⁴⁰. On peut catégoriser et distinguer les différentes approches de traitement en stratégies de réparation ou de remplacement. Les stratégies de réparation comprennent la revascularisation coronarienne (sous CEC ou à cœur battant), le remplacement ou la réparation mitrale, le traitement chirurgical de la FA, la resynchronisation ventriculaire, les procédures de reconstruction et de remodelage du VG, les assistances circulatoires temporaires en guise de pont vers la récupération, et les supports mécaniques externes. En revanche, les stratégies de remplacement comprennent la transplantation cardiaque, les assistances circulatoires comme thérapie de destination et le cœur artificiel total. Nous aborderons en premier lieu les stratégies de réparation les plus pertinentes en IC terminale dans le contexte de cette thèse, soit : la revascularisation coronarienne, les procédures de reconstruction du VG, les assistances circulatoires comme pont vers la récupération et la resynchronisation ventriculaire. Nous verrons enfin, dans cette portion de chapitre, la transplantation cardiaque à titre de thérapie de remplacement pour introduire l'avènement de la thérapie cellulaire dans le contexte de pathologies ischémiques affectant le myocarde.

1.7.1 Revascularisation coronarienne sous CEC

Les patients souffrant de maladie coronarienne et qui présentent une dysfonction importante du VG ont une évolution défavorable à court terme par rapport aux patients avec une fonction ventriculaire gauche normale⁴¹. Même si le traitement médical vigoureux de ce groupe de patients amène une amélioration transitoire de la symptomatologie clinique, les experts s'accordent pour dire que ce traitement médical seul est associé à une survie limitée à court terme^{42, 43}. Trois grandes études randomisées prospectives (CASS : Coronary Artery Surgery Study; VA : Veterans Administration Cooperative Study Group; et ECSS : European Coronary Surgery Study) ont bien établi les avantages du traitement chirurgical chez ce groupe de patients à haut risque de mortalité en comparaison avec un traitement médical optimal⁴⁴⁻⁴⁶. Plusieurs autres études ont ensuite démontré la supériorité du traitement chirurgical chez les patients présentant une diminution importante de la FÉVG (en présence de viabilité du territoire ischémique à risque)^{47, 48}.

1.7.2 Résultats de la revascularisation sous CEC

Plusieurs études observationnelles ont démontré une amélioration significative de la fonction du VG, des symptômes liés à l'IC, de la qualité de vie et de la survie suite à une chirurgie de revascularisation du myocarde ischémique^{49, 50}. À ce jour, il n'existe aucune étude prospective randomisée contrôlée traitant de l'évolution des patients qui se présentent avec une dysfonction du VG sans symptômes d'angine en période préopératoire. Seule l'étude STITCH (« Surgical Treatment for Ischemic Heart Failure ») aborde indirectement cette question en décrivant l'évolution des patients qui subissent une revascularisation coronarienne et qui se présentent avec un anévrisme du VG⁵¹. Plusieurs centres ont néanmoins colligé leurs résultats concernant la revascularisation chirurgicale chez cette population de patients⁵². Kron *et coll.* ont ainsi rapporté l'évolution de 39 patients revascularisés avec une FÉVG inférieure à 20 %⁵³. La mortalité rapportée à 3 ans était de 83 %⁵³. L'étude AWESOME (« Angina With Extremely Serious Operative Mortality Evaluation ») a examiné l'évolution de 446 patients avec une FÉVG inférieure à 35 %⁵⁴. La survie moyenne rapportée en postopératoire était de 72 % à 36 mois⁵⁴. En 1997, l'étude prospective randomisée « CABG Patch Trial » a analysé l'évolution de 1429 patients subissant une chirurgie de pontage sous CEC et qui présentaient une FÉVG inférieure à 36 %⁵⁵. Dans ce groupe, la mortalité opératoire des patients avec une FÉVG inférieure à 25 % n'a été que de 5 %⁵⁵. Elefteriades et Edwards ont finalement analysé l'évolution de 188 patients consécutifs ayant une FÉVG inférieure à 30 %⁵⁶. Ces derniers ont observé une survie moyenne à 1, 3, et 5 ans de 88, 77, et 60 %,

respectivement⁵⁶. Malgré ces résultats favorables, l'approche chirurgicale des patients souffrant d'une dysfonction VG grave demeure un défi de taille, et peu de résultats à long terme sont documentés chez cette population.

1.7.3 Revascularisation coronarienne à cœur battant

La chirurgie de pontage sous CEC (« on-pump coronary artery bypass », ou ONCAB) a longtemps été la seule technique de revascularisation utilisée chez les patients présentant une diminution de la FÉVG, et ce, jusqu'au perfectionnement de la chirurgie de revascularisation à cœur battant (« off-pump coronary artery bypass », ou OPCAB). Afin de minimiser les risques associés à la CEC chez ces patients à haut risque, la chirurgie OPCAB a fait d'importants progrès au cours des dernières années^{57, 58}. Plusieurs controverses alimentent encore le choix optimal de la stratégie de revascularisation chez les patients présentant une diminution de la FÉVG. D'un côté, plusieurs chirurgiens préfèrent utiliser la CEC pour diminuer les risques d'instabilité hémodynamique, d'hypotension, d'arythmie ventriculaire, ou d'arrêt cardiaque, phénomènes fréquemment rencontrés dans cette population chirurgicale à haut risque^{9, 10}. En revanche, certains avancent que la CEC pourrait exacerber les dommages au myocarde chez les patients présentant une diminution de la FÉVG. Ces effets pourraient être partiellement causés par l'activation de médiateurs inflammatoires, par la géométrie « non physiologique » du VG au cours de la CEC, ou par la diminution de la fonction du septum interventriculaire post-CEC^{59, 60}.

1.7.4 Résultats de la revascularisation à cœur battant

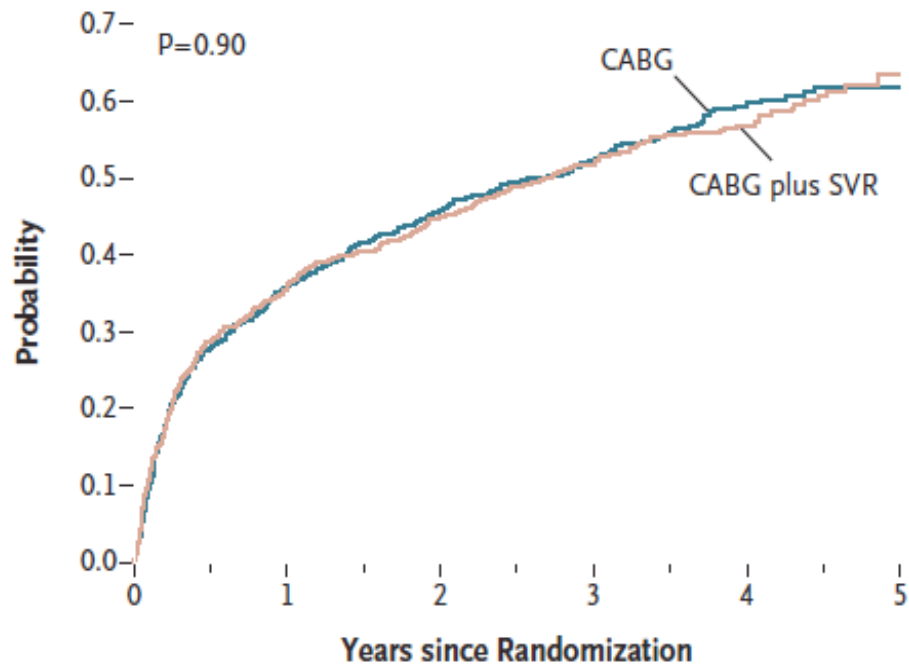
Plusieurs résultats à moyen terme avec la technique OPCAB ont encouragé la population chirurgicale à étendre les indications de cette technique de revascularisation aux patients présentant une dysfonction ventriculaire gauche⁶¹. Plusieurs méta-analyses ont à ce jour examiné les résultats obtenus des différentes études comparant la chirurgie ONCAB à la technique OPCAB. Généralement, les patients qui subissent une revascularisation OPCAB ont une évolution au moins comparable à celle des patients opérés sous CEC en ce qui concerne la mortalité périopératoire, le risque d'AVC, l'incidence postopératoire de FA, le besoin de transfusions sanguines ou la durée d'hospitalisation⁶²⁻⁶⁶. Néanmoins, peu de données se rapportent à l'évolution des patients avec dysfonction du VG qui subissent une chirurgie de revascularisation OPCAB. Suzuki et ses collègues ont rapporté une survie à moyen terme (5 ans) de 60 %, un résultat comparable à ceux obtenus avec la revascularisation ONCAB⁶⁷. Youn *et coll.* ont aussi rapporté une survie à 6 ans supérieure à 65 % dans cette population de patients⁶⁸. L'utilisation de cette technique et l'évolution à long terme des patients avec dysfonction grave du VG demeure, à ce jour, encore à déterminer. Un des déterminants essentiels à la récupération post-revascularisation demeure la démonstration de viabilité du myocarde. À ce titre, Allman *et coll.* ont démontré dans une méta-analyse de 3088 patients (FÉVG ≤ 30%) que la présence de viabilité après une chirurgie de revascularisation amenait une réduction de près de 79% de la mortalité cardiaque à 25 mois⁶⁹.

1.7.5 Reconstruction ventriculaire

Les patients qui présentent un IDM transmural subissent un remodelage ventriculaire progressif et peuvent manifester une dilatation ventriculaire importante, laquelle peut mener à un amincissement de la paroi ventriculaire et à la formation d'un anévrysme du VG⁷⁰. Ces changements produisent une augmentation de la tension murale et une dysfonction ventriculaire gauche par différents mécanismes : 1) une augmentation de la consommation d'oxygène en raison de l'augmentation de la tension murale; 2) une augmentation des cytokines pro-inflammatoires circulantes; 3) une stimulation de la réponse neuro-hormonale et du remodelage ventriculaire; 4) une contraction ventriculaire inefficace et déséquilibrée (« ventricular mismatch »); et 5) une hypoperfusion sous-endocardique⁷⁰. La reconstruction ventriculaire vise à exciser le segment infarcté dyskinétique affectant le myocarde afin de freiner ces mécanismes délétères qui mènent à une perte progressive de fonction du myocarde. La technique de reconstruction dite de « Dor » (d'après Vincent Dor) figure parmi les stratégies les plus fréquemment utilisées pour exciser le myocarde infarcté et reconstruire le ventricule anévrysmal à l'aide d'une pièce de péricarde endoventriculaire⁷¹. De nos jours, on utilise de préférence une technique de Dor modifiée qui consiste en une ventriculotomie partielle et une reconstruction ventriculaire par l'utilisation d'une pièce de péricarde circulaire endoventriculaire⁷². Les résultats les plus probants concernant cette reconstruction nous proviennent de deux études qui s'opposent mutuellement dans leurs conclusions. L'étude rétrospective RESTORE (« Reconstructive Endoventricular Surgery returning Torsion Original Radius Elliptical shape to the left ventricle ») a connu un franc succès suite à sa publication⁷³. De 1998 à 2003, 1198 patients ont subi une chirurgie de reconstruction du

VG pour une dilation anévrysmale du VG. Les résultats publiés ont démontré une amélioration d'environ 10 % de la FÉVG en période postopératoire, associée à une mortalité opératoire de 5,3 %. La mortalité à moyen terme rapportée dans cette étude était de $68,6 \pm 2,8$ %. Malgré ces résultats prometteurs, l'étude prospective randomisée « STITCH », publié par Jones *et coll.* en 2009, a jeté un doute considérable sur l'impact de la chirurgie de reconstruction ventriculaire chez les patients présentant une CMI et un anévrysme du VG⁷⁴. De 2002 à 2006, 1000 patients avec une dysfonction du VG (< 35 %) ont été randomisés en deux groupes : pontages seuls ou pontages avec reconstruction ventriculaire gauche. À cinq ans, aucune différence n'a été observée entre les deux groupes en ce qui concerne la mortalité, le nombre d'hospitalisations, ou le nombre de ré-hospitalisations pour causes cardiaques (figure 1). Ces résultats contradictoires traduisent la difficulté de traitement des patients avec défaillance ventriculaire gauche grave et illustrent bien la nécessité d'explorer de nouvelles avenues de traitement (voir chapitres suivants). Néanmoins, certaines critiques en lien avec la sélection des patients, l'expertise chirurgicale de chacun des centres hospitaliers et la validité de la randomisation des patients sont venues jeter un voile sur les résultats obtenus.

Figure 1.



No. at Risk							
CABG	499	319	270	220	99	23	
CABG plus SVR	501	319	275	216	111	23	

Tiré de Jones *et al.*, 2009⁷⁴. *Courbe de Kaplan-Meier présentant l'évolution des patients en fonction de la probabilité de survenue de l'issue primaire (« STITCH TRIAL »).* Aucune différence n'a été observée en ce qui a trait à l'issue primaire de mortalité ou de ré-hospitalisation 5 ans après randomisation entre une intervention de pontage seul (Coronary Artery Bypass Graft, CABG), ou une chirurgie de pontage combinée à une reconstruction ventriculaire gauche (« Surgical Ventricular Reconstruction », SVR).

1.7.6 Thérapie de resynchronisation

La thérapie de resynchronisation cardiaque (TRC) figure aussi parmi les options thérapeutiques reconnues pour les patients souffrant d'IC réfractaires au traitement médical/chirurgical⁷⁵. Son principe consiste à corriger les conséquences mécaniques de l'asynchronisme ventriculaire rencontré chez de nombreux patients, conduisant à une diminution de l'efficacité de l'éjection systolique, à une altération du remplissage diastolique ainsi qu'à une augmentation de la durée (donc de la gravité) de l'insuffisance mitrale fonctionnelle.

À ce jour, plusieurs études randomisées ont examiné ce mode de thérapie et ont démontré un avantage considérable en termes de réduction de la morbidité, du taux d'hospitalisations et de la mortalité^{76, 77}. Les critères actuellement reconnus par l'ACC/AHA pour la TRC sont la présence d'une insuffisance cardiaque de stade NYHA III ou IV malgré un traitement médical optimal, une dysfonction systolique importante avec une FÉVG inférieure à 30 % et un allongement du QRS (> 120 ms)⁷⁸.

Ces critères se révèlent néanmoins imparfaits dans la mesure où 20 à 30 % des patients traités par TRC ne retirent aucun avantage du traitement⁷⁹. Parmi les raisons retenues pour expliquer la non-réponse au traitement, on sait que l'asynchronisme électrique reflète mal l'asynchronisme mécanique sur lequel agit la TRC. Il a en effet été démontré que seuls 30 à 40 % des patients avec un QRS > 120 ms ne présentaient pas d'asynchronisme de contraction tel que démontrable par échocardiographie⁸⁰. Inversement, un asynchronisme mécanique a été documenté chez 20 à 50 % des patients de même type présentant un QRS fin⁸¹. Plusieurs études récentes ont d'ailleurs ainsi

observé que ces patients bénéficiaient aussi de la TRC, au même titre que ceux ayant un QRS prolongé^{82, 83}. Bien qu'imparfait, ce mode de thérapie est en évolution rapide et représente actuellement une autre option de traitement chez les patients qui présentent une dysfonction grave du VG.

1.7.7 Greffe cardiaque

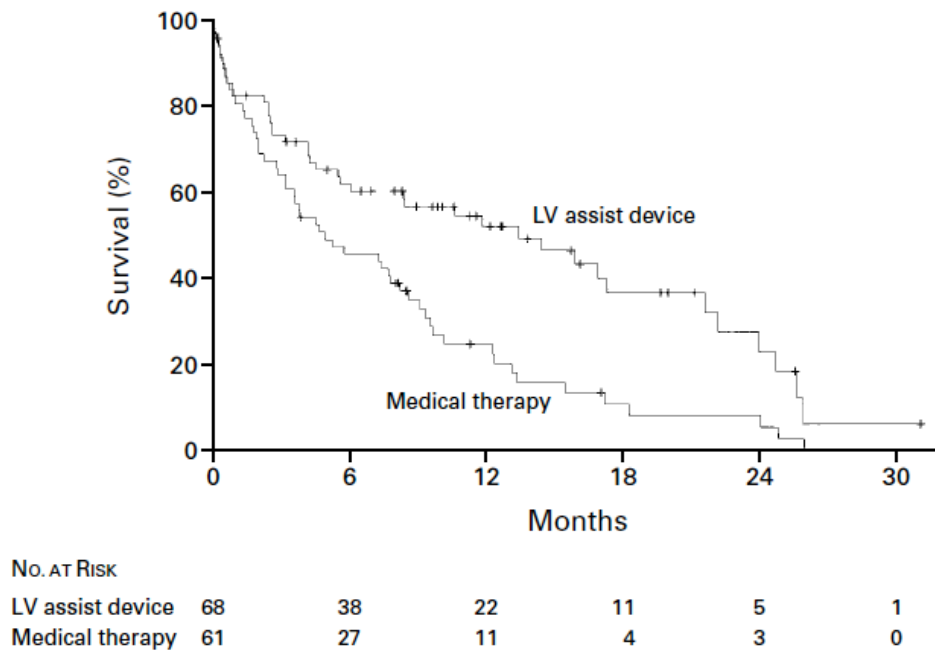
La transplantation cardiaque demeure un traitement très efficace dans les cas d'IC de stade terminal. Les taux de survie après transplantation cardiaque sont encore actuellement d'environ 85 % durant la première année et d'environ 50 % à 10 ans⁸⁴. Malheureusement, il existe toujours un écart important et croissant entre le nombre de patients qui pourraient bénéficier d'une transplantation et le nombre de cœurs de donneurs disponibles. Depuis 20 ans, le nombre de transplantations cardiaques effectuées par année au Canada est demeuré constant, soit de 160-180/année (www.heartandstroke.com). Parallèlement, on a observé que le nombre de patients en attente d'une transplantation cardiaque a considérablement augmenté et on observe un taux de mortalité de 10 à 15 % pendant l'attente d'un cœur d'un donneur (www.heartandstroke.com). Étant donné ces importantes limites, les efforts de recherche se sont multipliés et de nouvelles stratégies de traitement, dont la thérapie de réparation et de protection cellulaire, ont été mises au point avec pour objectif de prendre en charge ces patients souffrant d'IC.

1.7.8 Assistance circulatoire à long terme

Chez les patients atteints de maladie cardiaque au stade terminal et ne répondant pas aux critères de la transplantation cardiaque, l'implantation permanente d'un dispositif d'assistance ventriculaire gauche à titre de thérapie de destination peut procurer un avantage en matière de survie ainsi qu'une amélioration importante de la qualité de vie⁸⁵. Ces dispositifs d'assistance ventriculaire gauche implantables sont aujourd'hui utilisés au Canada et aux États-Unis comme option thérapeutique alternative dans les situations critiques d'IC terminale, lorsque les autres options de traitement ont été épuisées. En 2001, les résultats de l'étude REMATCH (« Randomized Evaluation of Mechanical Assistance for the Treatment of Congestive Heart failure ») ont été publiés⁸⁶. Cette étude visait à étudier si l'assistance circulatoire pouvait amener un avantage significatif en termes de survie par rapport au traitement médical optimal seul. Les auteurs de l'étude ont ainsi démontré une diminution du risque relatif de mortalité d'environ 48 % à un an avec l'utilisation du dispositif HeartMate I VE (Thoratec, Pleasanton, CA) (figure 2). Néanmoins, ces résultats encourageants furent contrebalancés par une augmentation significative du risque d'infections, des saignements et de bris de l'appareil. De nos jours, on utilise des dispositifs d'assistance à rotation axiale moins thrombogéniques (HeartMate II ; Thoratec, Pleasanton, CA) qui permettent d'espérer une diminution des complications liées à l'utilisation de ce support. Ce schisme entre les risques et bienfaits potentiels, ajouté aux coûts importants de cette nouvelle technologie, reflète bien l'étendue des problèmes soulevés par l'émergence de ces approches invasives de traitement. Pour plus de renseignement sur le rôle de cette technologie au Québec, je vous invite à consulter la référence suivante du Réseau québécois de cardiologie tertiaire

(www.rqct.qc.ca).

Figure 2.



Adapté de Rose *et al.* 2001⁸⁶. *Analyse de survie comparative examinant l'évolution des patients de l'étude « REMATCH »*. Les patients traités avec le dispositif d'assistance circulatoire HeartMate I VE (Thoratec, Pleasanton, CA) ont démontré une diminution du risque relatif de mortalité d'environ 48 % à un an (survie actuarielle à un an : 52 vs 25 %, $p = 0,002$).

Chapitre 2 : Manuscrit #1

2.1 Avant-propos au Manuscrit #1

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction précédente, la revascularisation coronarienne chez les patients à haut risque atteints de dysfonction du VG demeure un défi de taille en chirurgie cardiaque. Au cours des dernières années, des progrès considérables ont été apportés à la technique de revascularisation pour tenter d'améliorer le pronostic de ces patients et de pallier les problèmes inhérents liés à l'utilisation de la CEC^{9, 87}. Néanmoins, une revue approfondie de la littérature sur le sujet nous a permis d'observer que peu d'études rapportent l'évolution à long terme de ce type de revascularisation chez les patients qui présentent une diminution importante de la FÉVG. Dans ce premier manuscrit, le candidat au doctorat en sciences biomédicales vise à étudier, dans un groupe de 1250 patients, l'évolution à long terme (10 ans) des patients avec une FÉVG inférieure à 35 % en comparaison avec une population de patients présentant une fonction ventriculaire normale. Ces résultats nous permettront d'observer les limites de la thérapie de revascularisation chez les patients avec dysfonction ventriculaire gauche majeure et de mettre en perspective la suite des travaux présentés dans les deux chapitres portant sur la thérapie cellulaire. Cet article original est soumis au « *European Journal of Cardiothoracic Surgery* » et est actuellement en révision.

The Influence of a Low Ejection Fraction on Long-Term Survival in Systematic Off-Pump Coronary Artery Bypass Surgery

Simon Maltais, M.D., M.Sc.; Raymond Cartier, M.D.

Department of Cardiovascular Surgery, Université de Montréal, Institut de Cardiologie de Montréal, Québec, Canada

Word Count: 3085 (excluding references)

Address correspondence to:

Raymond Cartier, M.D., Department of Cardiovascular Surgery, Institut de Cardiologie de Montréal, Université de Montréal; 5000 Belanger Street, Montreal, Quebec H1T 1C8, Canada. Tel.: 514-376-3330 (ext.2511), Fax: 514-376-1355

ABSTRACT

OBJECTIVE: Poor left ventricular ejection fraction (LVEF) is a recognized operative and long-term risk factor in coronary artery bypass surgery. Over the last decade off-pump coronary artery bypass (OPCAB) surgery has emerged as a new strategy to address myocardial revascularization in poor LVEF patients but few reports have documented long-term results. The aim of this study was to investigate long-term clinical results in OPCAB patients with $\leq 35\%$ LVEF.

METHODS: From September 1996 to August 2006, 1250 patients underwent a single surgeon OPCAB revascularization and were prospectively followed at the Montreal Heart Institute. Among them, 137 patients (pts) had a preoperative LVEF $\leq 35\%$. Follow-up was completed in 97% of patients.

RESULTS: Mean follow-up was 66 ± 34 months. Rate of grafts/pts was comparable in both groups. Overall 30-day mortality was 1.7% (1.5% EF $> 35\%$ pts vs 2.9% in EF $\leq 35\%$ pts; $p=0.19$). Ten-year survival was lower in poor EF patients ($44 \pm 7\%$ vs $76 \pm 2\%$) and remained significantly lower even after adjusting for risk factors ($p=0.04$). Freedom from cardiac death for both groups was also significantly reduced in poor EF patients ($p=0.008$). After adjustment, freedom from combined endpoint of cardiac or sudden death, myocardial infarction, repeat coronary revascularization, unstable angina, and cardiac failure was comparable in both groups ($p=0.48$).

CONCLUSIONS: OPCAB surgery can be performed adequately and safely in poor EF patients. However, overall and cardiac survival was decreased in this subset of patients with a comparable freedom of major cardiac adverse related events.

INTRODUCTION

Ischemic heart disease remains a leading cause of mortality in the developed countries¹. There are currently more than 5 millions diagnosed cases of congestive heart failure (CHF) in North America^{1, 88}. Recent estimates put the incidence at 550 000 new cases every year.⁸⁹ Currently, around 600,000 coronary artery bypass grafting (CABG) are performed worldwide¹. Conventional CABG using cardiopulmonary bypass (CPB) and cardioplegic arrest has been the gold standard to address ischemic heart disease for several decades. The on-pump CABG (ONCAB) strategy, combined with medical and anesthetic improvements, has ensured a low mortality despite an aging and sicker patient population. CABG among patients with reduced myocardial function still remains a daunting surgical challenge. Several studies have shown that patients with severely depressed heart function should be considered high-risk surgical candidates compared to patients with normal ejection fraction⁹⁻¹¹. In an attempt to reduce the potential deleterious effects of CPB, the avoidance of cardiopulmonary bypass has emerged over the last few years as a new strategy to address myocardial revascularization^{57, 58, 90}.

Several controversies surround the choice of the optimal surgical strategy in patients with reduced ejection fraction. Many surgeons prefer using CPB because hemodynamic instability, hypotension induced by ventricular arrhythmias, or cardiac arrests are frequent problems encountered in this specific group of patient. However, it has been speculated that extracorporeal circulation could exacerbate myocardial damage in patients with compromised left ventricles. This could be partly due to the activation of

inflammatory mediators, the non-physiologic ventricular geometry of the empty heart during CPB, or the reduced function of the interventricular septum following CPB^{59, 60}.

There are therefore few reports addressing the long-term evolution of OPCAB revascularization in patients with reduced (<35%) ejection fraction. The objective of this study was to analyze the long-term results of OPCAB surgery in a large contemporary cohort of patients with a reduced ejection fraction, focusing specifically on survival and on the occurrence of major cardiac-related events in this specific population.

METHOD

Study Design

This is a retrospective analysis of prospectively gathered data over a 10-year period (mean follow-up, 66±34 months). From September 1996 to December 2006, 1250 patients underwent OPCAB revascularization by a single surgeon at the Montreal Heart Institute (Montreal, Quebec, Canada). From this group, 14 patients had no preoperative left ventricular ejection fraction evaluation and were excluded from the study. This is a single surgeon experience (R.C.), and this series represents over 97% of all cases of revascularization performed during the same period. Among patients undergoing OPCAB surgery during this time interval, 137 patients (12%) had a preoperative LVEF of 35% or less, as measured using TTE (over 90% of patients), ventriculography or nuclear imaging. Twelve month follow-up was completed in all patients. Follow-up reports were obtained by routine clinic visit, phone interview, or directly from the family physician. When the patients were rehospitalized for cardiac causes in a different hospital, hospitalization reports were requested. This study was approved by the Review Board of the Montreal Heart Institute, and individual consent was obtained for all patients included in this study.

Surgical Technique

Patients were operated under general endotracheal anesthesia using continuous Swan-Ganz catheter monitoring, trans-esophageal echocardiography and arterial pressure monitoring. As previously described, the surgical technique used has been consistent through the years⁶¹. Patients with important preoperative hemodynamic instability, or moderate to severe (3+ to 4+) mitral regurgitation were excluded from this study as they were operated under CPB. All surgeries were performed using a full sternotomy incision. During the first period of the experience, the left internal thoracic artery (ITA) was harvested using a pedicled technique. Since 2000, all patients had their ITA skeletonized. Heparin was administered at a dose of 150 KIU/Kg. A compression-type device (Cor-Vasc Retractor Stabilizer; CoroNéo, Montreal, Quebec) was used for all cases to allow adequate coronary stabilization. In most instances, the culprit lesion was bypassed first. All proximal venous anastomoses were performed with a single side-bite clamping of the ascending aorta while maintaining a systemic blood pressure lower than 85 mmHg. Postoperatively, all patients received aspirin (80 mg, daily), subcutaneous heparin (5,000 KIU, three times a day), and, since 2002, clopidogrel (75 mg, daily) for the first three months on an empirical basis.

Definition of Terms

All data included in this study were prospectively gathered. Patients with a low LVEF were defined as patients with an ejection fraction of lower than 35%. Perioperative myocardial infarction was considered significant when there was a new Q wave on the electrocardiogram in association with a new wall motion abnormality on post-operative echocardiography or myocardial-specific creatinine kinase (CK-MB) levels greater than

100ng/mL. Postoperative renal insufficiency was defined as an increase of 50nm of creatinine levels at any time point during postoperative period. Major adverse cardiac events were defined as a combined endpoint that included cardiac or sudden death, and rehospitalization for myocardial infarction, repeated coronary revascularization, recurrent unstable angina, or congestive heart failure.

Statistical Analysis

Results are expressed as the mean value \pm standard deviation. Data were examined universally by the ANOVA test for continuous variables, while the χ^2 analysis was used for categorical data. Time to mortality or major adverse cardiac events were presented using adjusted survival curves and compared between groups (low versus normal LVEF) using the log-rank test. Cox regression analysis was used to predict the effect of a low (<35%) ejection fraction on mortality and on major adverse cardiac events adjusted for the risks factors that were significant at a 0.05 level in the univariate analysis. Actuarial survival was obtained using the Kaplan-Meier method. Statistical significance was considered at a value of $p < 0.05$. Data were analyzed using the SPSS 13.0 software (SPSS, Chicago, Illinois).

RESULTS

Demographic Characteristics and Preoperative Risk Factors

Table II reports preoperative demographic characteristics of all patients included in this study. As expected, patients in the low LVEF group were generally burdened had more comorbidities than patients in the normal LVEF group. Smoking, chronic pulmonary obstructive disease, chronic renal failure, peripheral vascular disease, stroke history, atrial fibrillation, previous MI (including recent MI), and history of congestive heart failure were significantly more frequent in the low LVEF group. Similarly, patients in the low LVEF group had more unstable angina, had more frequently emergent operations, and had an increased rate of preoperative intra-aortic balloon pump insertion.

Operative Data

Surgical and operative details are reported in Table III. The only statistically significant difference was the percentage of bilateral ITA bypasses performed, which was significantly lower in the low LVEF group (16,9% *versus* 31.9%; $p < 0.0001$). As expected, completeness of revascularization was significantly lower in the low LVEF group ($p < 0.001$), as akinetic or dyskinetic territories are more frequently encountered in this subset of patients. The number of grafts performed was, however, similar between the two groups (low LVEF group 3.09 ± 0.87 *versus* 3.17 ± 0.91 in the normal LVEF group, $p = 0.29$). No significant differences were observed for conversion to CPB, as two patients

(1.5%) were intraoperatively converted to CPB in the low FEVG group, while five patients (0.5%) were converted in the normal FEVG group ($p=0.17$).

Early Postoperative Outcomes

Perioperative morbidity and in-hospital mortality (30 days) are represented in Table IV. There were no statistically significant differences in early in-hospital mortality (low LVEF group 2.9% *versus* 1.5% in the normal LVEF group, $p=0.19$). There were no significant differences in neurological events, postoperative infarction, reoperations for excessive bleeding, acute renal failure, sternal dehiscence, respiratory complications, or insertion of postoperative intra-aortic balloon pump. Postoperative confusion, atrial fibrillation and deep sternal infections were more frequently encountered in the low LVEF group ($p=0.05$, 0.002, and 0.04, respectively). Intensive care unit length of stay was significantly increased in the low LVEF group (3.7 ± 0.3 days *versus* 2.6 ± 0.1 days, $p=0.001$). The hospital length of stay was however similar for both groups (low LVEF group 7.5 ± 0.5 days *versus* 6.5 ± 0.5 in the normal LVEF group, $p=0.10$).

Late clinical outcomes

LONG-TERM SURVIVAL. Non-adjusted adjusted ten-year survival was significantly lower in the low LVEF patients ($44\pm 7\%$ vs $76\pm 2\%$, $p<0.001$), and remained significant lower even after adjusting for risk factors ($p=0.04$) (Figure 3). Similarly, adjusted freedom from cardiac death (defined as death from cardiac or unknown causes) survival curve was

significantly reduced in the low LVEF group compared to the normal LVEF patients ($p=0.008$) (Figure 4). The multivariate cox regression analysis model revealed that preoperative CHF, chronic peripheral vascular disease, stroke history, recent myocardial infarction, renal insufficiency, completeness of revascularization, and low LVEF ($<35\%$) were significant predictors of long term mortality (Table V).

MACE-FREE SURVIVAL. After adjustments for significant differences, survival free of major adverse cardiac events (MACE) combining endpoint of cardiac or sudden death, myocardial infarction, repeated coronary revascularization, unstable angina, and cardiac failure was comparable in both groups (Figure 5; $p=0.48$). The breakdown analysis of events excluding cardiac related deaths showed that patients with a low LVEF had similar long-term rates of myocardial infarction ($p=0.8$), hospitalization for repeated revascularization ($p=0.13$), or readmission for CHF ($p=0.24$) (Figure 6).

DISCUSSION

Considering the enormous growth of interventional cardiology in the recent years, patients undergoing CABG surgery are frequently encountered at the end-stage of their disease, presenting with severely impaired LV function. Despite many advances and innovations in cardiac surgery, the management of patients with impaired LV function still remains a surgical challenge. Conventional surgical revascularization using CPB in patients with severely depressed LV function is associated with a higher postoperative morbidity and mortality compared with patients with normal left ventricular function⁴¹. Good mid-term surgical results reported with OPCAB surgery have increased adoption of this revascularization technique, especially in high-risk patients with poor LV function⁹¹,⁹². Several meta-analyses have been conducted to address outcomes of revascularization with or without CPB. Generally, patients undergoing OPCAB have at least equivalent outcomes in respect to perioperative mortality, stroke, atrial fibrillation, need for blood transfusions, and hospital length of stay^{62, 64-66}. However, reported disadvantages include a possible decrease in the number of grafts performed (complete revascularization), increased technical difficulties, and potential decrease in long-term graft permeability⁹³.

The main focus of this retrospective study was to evaluate the long-term evolution of OPCAB surgery in a large contemporary cohort of patients with a significantly depressed ejection fraction. The present study has several unique features compared to previously published studies: (1) the series comprises a large number of patients with a significantly long-term follow-up, (2) this study focuses not only on survival, but also

addresses the occurrence of major cardiac-related events in this specific population, (3) the number of grafts performed was similar between the two groups, (4) the surgical technique has been consistent through the years and has been extensively described in previously reported studies⁶¹.

In the current study, 1250 patients underwent OPCAB revascularization and were prospectively followed over ten years. Among them, 137 patients had a preoperative LVEF of 35% or less. As expected for this sicker population, patients in the low LVEF group were more likely to have significant history of smoking, chronic pulmonary obstructive disease, chronic renal failure, peripheral vascular disease, stroke, atrial fibrillation, previous MI, congestive heart failure, unstable angina, and preoperative intra-aortic balloon pump insertion than the normal LVEF group. Nevertheless, the in-hospital (30 days) mortality was not significantly different between the two groups (low LVEF group 2.9% *versus* 1.5% in the normal LVEF group, $p=0.19$). These results compare favorably with two recent studies addressing OPCAB surgery in patients with reduced LV function (defined as LVEF lower than 35%), that both yielded similar results with regards to perioperative morbidity (respiratory failure rate, need for inotropes, and need for intra-aortic balloon counterpulsation)^{94, 95}. Arom et al. concluded similarly in a small group of 45 OPCAB patients that multivessel CABG utilizing this approach was applicable in patients with severely depressed LV function (equal to or less than 30%), even when OPCAB postoperative variables were compared to ONCAB patients⁹⁶.

This present report showed as expected that the long-term survival rate in patients with low LVEF were significantly lower than for patients with normal LV function. This difference remained significant even after adjusting for risk factors ($p=0.04$). Corrected freedom from cardiac death survival curve was also significantly reduced in the low LVEF group compared to the normal LVEF patients ($p=0.008$). Youn et al. showed similar mid-term results in patients with depressed LV function as OPCAB revascularization resulted in a survival rate of over 80% at 6 years⁶⁸. Suzuki et al. recently reported comparable mid-term results, as the five-year freedom from death from all causes was 57% in an OPCAB group of patients with a low LVEF. In this same study, the rate of freedom from cardiac death observed was 73%, while the rates of freedom from the combined endpoint of cardiac death, myocardial infarction, repeat coronary intervention, and heart failure requiring treatment was 65%⁹⁷. In our experience, the corrected freedom from major adverse cardiac events combining endpoint of myocardial infarction, sudden death, repeated coronary revascularization, unstable angina, and cardiac failure was comparable for both groups ($p=0.48$). Corrected CHF-free survival was similarly equivalent for both groups although a trend in favor of patients with higher LVEF was observed. This emphasizes the need for a close postoperative medical follow-up in organized CHF clinics for this specific group of patients.

From a technical perspective, achieving good surgical outcomes among patients with compromised LV results from the ability to completely revascularize the ischemic myocardium. OPCAB revascularization of the diseased coronary vessels can only be done under optimum conditions, provided that the quality of vessels is suitable for

grafting. In this retrospective study, the number of grafts performed did not differ between the two groups. To perform a complete revascularization in OPCAB surgery, the heart must be elevated. Previous work by Grundeman et al. showed that coronary blood, especially in the circumflex system, is greatly affected by vertical displacement⁹⁸. We believe that minimizing hemodynamic changes using the Trendelenburg position and deep pericardial traction stitches is the key to achieve complete revascularization, especially in this specific group of high-risk patients with depressed LV function.

LIMITATIONS

This study is limited by its retrospective design. Despite advanced statistical methodology, unknown sources of bias may possibly confound these results. Seven patients were also converted intraoperatively from OPCAB to CPB. However, the incidence of conversion was very low (0.5%) and not significantly different between the two groups. This study is observational in nature, and long-term randomized controlled trials comparing OPCAB and ONCAB surgery could help clarify the role of this procedure. Further limitation associated with the retrospective nature of this study is the non-systematic documentation of viability in patients in the low LVEF group. Hence, viability as been described as key determinant in the recuperation of the myocardium following revascularization⁶⁹. The “timing” of the revascularization is critical to the results observed. Recent MI (<30 days) was more frequently observed in patients in the low LVEF group (46% vs 17%, $p=0.0001$). This could lead to prognostic conditioning in favor of the normal LVEF group. Finally, in this study, the low LVEF had significantly less complete revascularization (83.1% vs 95.3%, $p < 0.0001$). However, the absolute number of bypass was similar between the two groups. The number of revascularized territories defines the completeness of revascularization. Patients with akinetic or dyskinetic territories with associated chronically occluded coronary artery were more frequently encountered in the low LVEF group. Therefore, we observed a significantly lower incidence of complete revascularization in this high-risk population. It is important to note that there were no differences in the use of a single internal mammary artery between the two groups ($p=0.41$).

CONCLUSIONS

There are few reports addressing the long-term evolution of OPCAB revascularization in patients with a depressed LV function. The current study showed that OPCAB surgery could be performed safely in poor EF patients. However, overall and cardiac survival was decreased, while a comparable freedom of major cardiac adverse related events was observed.

CONFLICT OF INTEREST

The senior author (R.C.) is advisor for CoroNéo® Inc. (Montréal, Québec, Canada).

TABLES

TABLE II

Demographic Characteristics

	n=137	n=1099	
	Low LVEF	Normal LVEF	<i>p</i> Value
Age (years)	65.4±10.0	64.4±10.0	0.28
Female	27 (19.7%)	230 (21.0%)	0.41
Hypertension	76 (55.5%)	645 (58.6%)	0.268
Diabetes	49 (35.8%)	318 (29.0%)	0.12
Family history for coronary disease	79 (57.7%)	742 (67.5%)	0.15
Hyperlipidemia	100 (73.0%)	856 (77.8%)	0.123
Obesity	37 (27.0%)	358 (32.5%)	0.111
Smoking	48 (35.0%)	294 (26.7%)	0.02
Chronic pulmonary obstructive disease	27 (19.7%)	128 (11.8%)	0.007
Chronic renal failure	12 (8.8%)	47 (4.3%)	0.024
Peripheral vascular disease	46 (33.6%)	199 (18.1%)	<0.0001
Stroke history	19 (13.9%)	84 (7.6%)	0.014
Previous MI	88 (64.2%)	381 (34.6%)	<0.0001
Recent MI (<30 days)	63 (46.0%)	190 (17.3%)	<0.0001
NYHA class III or IV	135 (98.0%)	1091 (99.1%)	0.68
History congestive heart failure	51 (37.%)	52 (4.7%)	<0.0001
Left ventricular ejection fraction (%)	29.2±5.3	55.6±9.7	<0.0001
Preoperative atrial fibrillation	11 (8,0%)	37 (3.4%)	0.013
Unstable angina	113 (82.5%)	750 (86.9%)	0.01

Emergent operation	26 (11.0%)	45 (4.1%)	<0.0001
Preoperative intra-aortic balloon	33 (24.1%)	56 (5.1%)	<0.0001
No. affected vessels	2.74±0.51	2.67±0.57	0.196
Left main disease	47 (34.3%)	325 (29.5%)	0.148

LVEF=Left ventricular ejection fraction; MI=myocardial infarction; NYHA=New York

Heart Association.

TABLE III

Operative Data

	Low LVEF	Normal LVEF	<i>p</i> Value
Reoperations	8 (5.8%)	71 (6.5%)	0.48
No. of CABG	3.09±0.87	3.17±0.91	0.29
Complete revascularization	113 (83.1%)	1047 (95.3%)	<0.0001
Conversion CPB	2 (1.5%)	5 (0.5%)	0.17
Single ITA	134 (97.8%)	1062 (96.7%)	0.41
Bilateral ITA	23 (16.9%)	351 (31.9%)	<0.0001
Sequential ITA	24 (18.0%)	221 (20.1%)	0.45

CABG=coronary artery bypass graft; CPB=cardiopulmonary bypass; ITA=internal thoracic artery; LVEF=Left ventricular ejection fraction.

TABLE IV

Postoperative Data

	Low LVEF	Normal LVEF	<i>p</i> Value
In-hospital/30-day mortality	4 (2.9%)	16 (1.5%)	0.19
Perioperative MI	3 (2.2%)	19 (1.7%)	0.45
Perioperative NSTEMI	1 (0.7%)	13 (1.2%)	0.53
Confusion	24 (17.5%)	131 (11.9%)	0.05
Reoperation for bleeding	7 (5.1%)	49 (4.5%)	0.428
Atrial fibrillation	52 (38.0%)	281 (25.6%)	0.002
Acute renal failure	33 (24.2%)	303 (27.5%)	0.24
Stroke	1 (0.7%)	9 (0.8%)	0.69
Transient ischemic attack	0 (0%)	1 (0.3%)	0.54
Deep sternal infection	4 (2.9%)	8 (0.7%)	0.04
Sternal dehiscence	0 (0%)	14 (1.3%)	0.19
Respiratory complications	14 (10.2%)	87 (7.9%)	0.22
Postoperative intra-aortic balloon	3 (2.2%)	7 (0.6%)	0.09
ICU stay (days)	3.7±0.3	2.6±0.1	0.001
Mechanical ventilation (hours)	25.9±4.4	16.8±1.0	0.006
Hospital stay (days)	7.5±0.5	6.5±0.5	0.10

ICU=intensive care unit; LVEF=Left ventricular ejection fraction; MI=myocardial infarction; NSTEMI=non-ST-elevation myocardial infarction.

TABLE V

Multivariate Cox Regression Analysis Model for Overall Survival

	Odds ratio (OR)	[95% CI]	<i>p</i> Value
Peripheral vascular disease	1.78	1.31-2.43	<0.0001
Renal insufficiency	2.29	1.46-3.61	<0.0001
Completeness of revascularization	0.50	0.33-0.77	0.002
Stroke history	1.96	1.34-2.88	0.001
Recent myocardial infarction	1.55	1.12-2.15	0.008
History congestive heart failure	1.63	1.09-2.46	0.01
Preoperative low LVEF (<35%)	1.46	1.00-2.15	0.04

CI=confidence interval; LVEF=left ventricular ejection fraction

FIGURES

Figure 3.

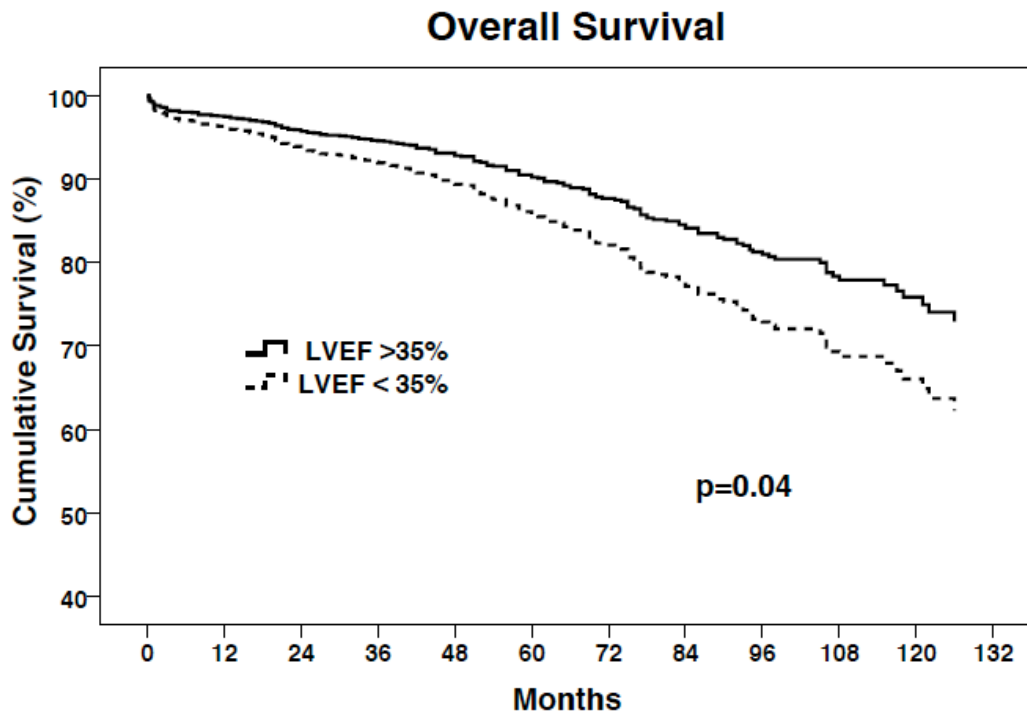


Figure 3. *Survival curve comparing patients with low ejection fraction (<35%) (dashed line) and normal ejection fraction (solid line) after correcting for risk factors. Ten-year survival was significantly lower in the low LVEF patients after adjustment for risk factors (p=0.04).*

Figure 4.

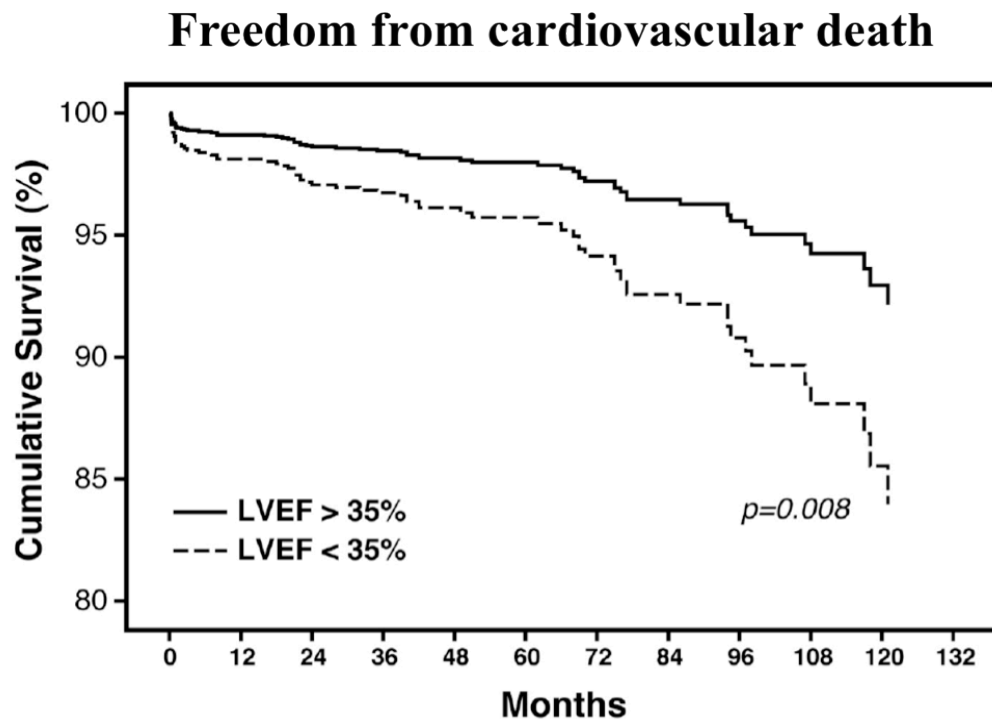


Figure 4. *Freedom from cardiovascular death survival curve comparing patients with low ejection fraction (<35%) (dashed line) and normal ejection fraction (solid line) after correcting for risk factors. Ten-year cardiac-free survival was significantly lower in the low LVEF patients after adjustment for risk factors (p=0.008).*

Figure 5.

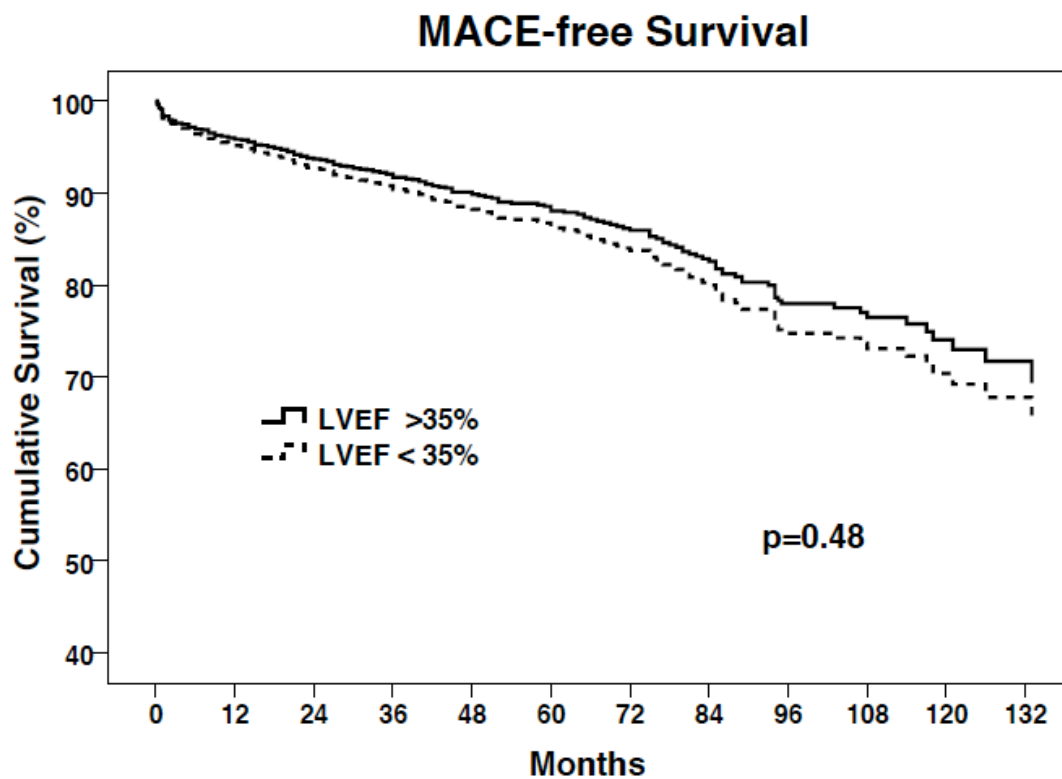


Figure 5. Major adverse cardiac event-free survival curve comparing patients with low ejection fraction (<35%) (dashed line) and normal ejection fraction (solid line) after correcting for risk factors. Ten-year freedom from major adverse cardiac events (MACE) combining endpoint of myocardial infarction, repeat coronary revascularization, unstable angina, and cardiac failure was comparable for both groups (p=0.48).

Figure 6.

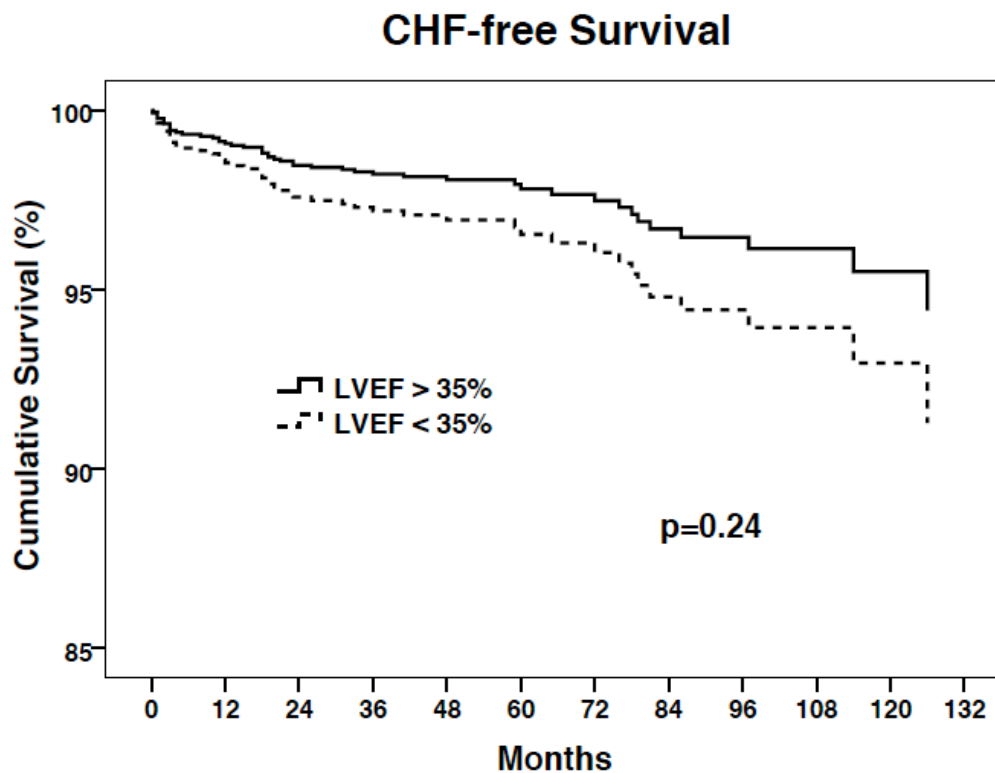


Figure 6. Freedom from cardiac heart failure (CHF) survival curve comparing patients with low ejection fraction (<35%) (dashed line) and normal ejection fraction (solid line) after correcting for risk factors. Ten-year freedom from congestive heart failure (CHF) was comparable for both groups ($p=0.24$).

Chapitre 3 : Mécanismes de réparation lors d'un infarctus du myocarde

3.1 Définition et statistiques récentes

L'infarctus du myocarde (IDM) consiste en une nécrose du muscle cardiaque secondaire à une oblitération aiguë d'une artère coronaire. Le diagnostic de l'infarctus du myocarde repose typiquement sur la présence d'au moins deux des trois critères définis par l'ACC/AHA : une douleur thoracique significative de plus de 30 minutes, des modifications électrocardiographiques avec sus-décalage du segment ST et la libération par le myocarde d'enzymes et de protéines de l'appareil contractile⁹⁹. L'Organisation Mondiale de la Santé clarifie que l'IDM devrait aussi être défini par une angine de poitrine d'apparition récente et de gravité croissante (<http://www.who>).

L'infarctus du myocarde est une manifestation clinique de la maladie athérosclérotique et on estime à 70 000 le nombre de crises cardiaques survenant chaque année au Canada (www.heartandstroke.com). Il s'agit donc d'une pathologie fréquente et grave, responsable chaque année de plus de 17 000 décès au Canada. La plupart de ces décès surviennent hors du milieu hospitalier. Malgré les importants progrès dans le diagnostic et le traitement de cette pathologie, le nombre d'hospitalisations attribuables à l'IDM a augmenté considérablement au cours des dix dernières années (www.heartandstroke.com). Le nombre de Canadiens et de Canadiennes à avoir subi une crise cardiaque augmente avec le vieillissement de la population, de sorte que la prévalence de cette pathologie augmente et est maintenant estimée entre 100 000 et 120 000 cas par an. Suivant l'extension anatomique, on distingue classiquement les infarctus trans-muraux (onde Q, intéressant la totalité de l'épaisseur du muscle

cardiaque), des infarctus non-trans-muraux (non-Q). De plus, on classe l'atteinte ischémique du myocarde en caractérisant l'IDM avec la présence de surélévation du segment ST (ischémie transmurale), ou par sous-décalage du segment ST (ischémie sous-endocardique).

3.2 Physiopathologie

Une description plus approfondie des mécanismes impliqués dans l'IDM s'impose dans la présentation de cette thèse de doctorat. Puisque l'apport d'oxygène au myocarde est directement couplé au flot coronarien, une cessation brusque de la perfusion régionale coronarienne secondaire à une thrombose coronaire occlusive provoque un arrêt du métabolisme aérobie, une diminution de la créatine phosphatase et une activation du métabolisme anaérobie¹⁰⁰. Le phénomène d'occlusion coronaire est partiellement provoqué par le bris d'une plaque d'athérome, lequel induit une activation de l'agrégation plaquettaire par la thromboxane A2. Cette agrégation mène à l'activation de la cascade de coagulation¹⁰¹. Environ 6 heures après cet événement, si cette diminution du flot sanguin coronaire n'est pas corrigée, le muscle cardiaque évolue vers une nécrose cellulaire anoxique¹⁰². Appréhendant les obstacles cliniques inhérents au délai de traitement, il est crucial de prendre rapidement en charge les patients qui subissent un IDM si l'on souhaite limiter la progression de la pathologie vers un phénomène ischémique irréversible. La mort des cardiomyocytes entraîne la libération progressive de protéines spécifiques (créatine kinases, troponines) qui jouent un rôle prépondérant dans le diagnostic et la prise en charge des patients subissant un événement ischémique. La mort des cellules myocardiques est caractérisée par la rupture de la membrane cytoplasmique des cardiomyocytes. La rupture des membranes cytoplasmiques est le résultat d'un œdème cellulaire, d'une accumulation de calcium intracellulaire et de la production de radicaux libres. Des lésions vasculaires apparaissent également, lesquelles provoquent une obstruction progressive de la lumière des vaisseaux. C'est ce que l'on appelle le

phénomène de non-reperfusion (« no-reflow »)¹⁰³. Voir la section suivante pour les mécanismes impliqués dans la reperfusion du myocarde ischémique.

3.3 Séquence d'événements suivant la reperfusion du myocarde

Peu après la survenue d'un événement aigu, le myocarde est affligé de lésions ischémiques qui vont continuer à évoluer au cours de la période post-occlusion (reperfusion). L'intervention de reperfusion précoce (pontage ou dilatation coronarienne percutanée) diminue la charge de stress ischémique imposée au myocarde, mais déclenche plusieurs mécanismes délétères de reperfusion¹⁰⁴. Peu de temps après l'événement ischémique, il se produit une augmentation importante de radicaux libres (RL), ce qui provoque une destruction tissulaire marquée¹⁰⁵. La production de RL endommage directement la membrane des cardiomyocytes et crée une augmentation massive de Ca^{2+} intracellulaire, engendrant une perte de communication intercellulaire et la nécrose/apoptose des cardiomyocytes dans la zone affectée¹⁰⁶. Au même moment se produit une libération considérable des cytokines inflammatoires (TNF, IL-1, IL-8) qui activent la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) par les métalloprotéinases¹⁰⁷. Tel que décrit dans la section sur le remodelage ventriculaire plus loin, ces mécanismes vont mener à l'activation de fibroblastes, qui vont former une cicatrice par la déposition de collagène au niveau du myocarde¹⁰⁸. Ces mécanismes, combinés aux modifications engendrées dans la vasculogénèse, vont permettre une altération de l'environnement extracellulaire, une infiltration par les cellules inflammatoires (neutrophiles, macrophages), l'élimination des débris cellulaires et l'entretien de la réponse inflammatoire¹⁰⁹. Ces événements nous permettent d'identifier un concept central en

thérapie de régénération, soit l'équilibre constant entre le besoin à court terme de stabiliser le myocarde et la nécessité de créer un environnement favorable à la réparation et à la croissance des cardiomyocytes. Tout type cellulaire administré précocement au niveau du myocarde doit donc pouvoir survivre dans un milieu hostile à sa survie¹⁰⁴, c'est-à-dire qu'il doit disposer d'un apport suffisant en oxygène. Ce constat important est essentiel à une compréhension adéquate des mécanismes qui sous-tendent les hypothèses portant sur l'effet paracrine des cellules souches (CS).

De plus, il est important de considérer que la reperfusion du myocarde amène en elle-même des mécanismes délétères qui peuvent influencer la récupération fonctionnelle du myocarde, phénomène que l'on qualifie d'« injury reperfusion ». Ces dommages sont causées quand le myocarde est reperfusé après une période d'ischémie. Le retour de la circulation produit un état inflammatoire important et des dommages oxydatifs significatifs. Entre autres, les leucocytes activés dans le territoire ischémique reperfusé sont amenés à relâcher des substances inflammatoires et des radicaux libres. Ces substances amènent un « cercle vicieux » qui engendre la création de bris cellulaires et membranaires qui entretiennent l'activation inflammatoire locale^{110, 111}. Voir l'excellente revue de littérature sur le sujet par Kharbanda et *coll*¹¹².

3.4 Physiopathologie : Le remodelage ventriculaire

Traditionnellement, l'IC était définie comme une pathologie exclusivement associée à une diminution de la performance du VG. Selon cette définition, l'IC était donc liée à une dysfonction systolique isolée de la contraction du myocarde^{13, 113}. Or, nous savons aujourd'hui que l'IC n'est pas uniquement liée à une diminution de la performance du VG. Au milieu des années 1990, Cohn *et coll.* ont été parmi les premiers à définir le concept plus étendu de *remodelage ventriculaire*¹¹⁴. Le terme 'remodelage' désigne une dynamique biologique se manifestant au sein d'un organe comme le myocarde et qui, à travers des mécanismes à visée le plus souvent adaptative, conduit finalement à une dégradation de sa fonction¹¹⁵. Le remodelage est donc le terme utilisé pour définir les mécanismes physiopathologiques provoqués par des changements pathologiques secondaires à une augmentation de la dimension du VG¹¹⁴. La dilatation ventriculaire précoce est donc en premier lieu une réponse normale du VG à une surcharge de volume en fin de diastole qui permet de maintenir le volume d'éjection⁴⁰. Le remodelage représente ensuite l'ensemble des mécanismes compensateurs (bénéfiques/néfastes) qui mèneront à une adaptation du VG à cette surcharge volémique (tableau VI)¹¹⁶. Le remodelage et la dilatation ventriculaire produisent ainsi une augmentation graduelle de la tension murale exercée sur le VG. Ce processus délétère mène finalement à une augmentation de la consommation en oxygène du myocarde, à une diminution de la perfusion coronarienne sous-endocardique et à un déséquilibre énergétique¹¹⁷. C'est le degré de remodelage ventriculaire, et non la perte de la fonction contractile, qui est directement lié au pronostic des patients qui présentent de l'IC¹¹³.

Tableau VI.

Alterations in myocyte biology
Excitation contraction coupling
Myosin heavy chain (fetal) gene expression
β -Adrenergic desensitization
Hypertrophy
Myocytolysis
Cytoskeletal proteins
Myocardial changes
Myocyte loss
Necrosis
Apoptosis
Alterations in extracellular matrix
Matrix degradation
Replacement fibrosis
Alterations in LV chamber geometry
LV dilation
Increased LV sphericity
LV wall thinning
Mitral valve incompetence

Tiré de Mann *et al.* 2005¹⁴. ***Résumé des mécanismes impliqués dans le remodelage ventriculaire.*** Plusieurs changements surviennent dans le processus de remodelage chronique du myocarde. Les modifications se produisent et altèrent la structure et les fonctionnements moléculaires et cellulaires des cardiomyocytes.

Le remodelage ventriculaire survient rapidement après des lésions ischémiques et produit plusieurs changements de la biologie cellulaire et moléculaire des cardiomyocytes¹¹⁸. Ces altérations vont mener à la perte progressive d'unités contractiles et à la détérioration de la fonction du myocarde. Les changements s'opèrent sous forme de plusieurs mécanismes qui agissent en association. On peut énumérer ces changements et classer ceux-ci de la façon suivante :

- 1) Les altérations de la biologie cellulaire des cardiomyocytes :
 - i) L'hypertrophie des cardiomyocytes
 - ii) L'altération des mécanismes de couplage excitation-contraction
 - iii) Les anomalies au niveau des protéines de contraction et de régulation cellulaire
 - iv) Les modifications du cytosquelette protéique
 - v) La désensibilisation des récepteurs *b*-adrénergiques et les altérations de leur signalisation; produisant des altérations intracellulaires et moléculaires
- 2) Les altérations propres aux cardiomyocytes (nécrose et apoptose);
- 3) La libération de cytokines et de médiateurs de l'inflammation;
- 4) Les altérations des voies de signalisation cellulaire.

3.4.1 Altérations de la biologie cellulaire des cardiomyocytes

Hypertrophie des cardiomyocytes

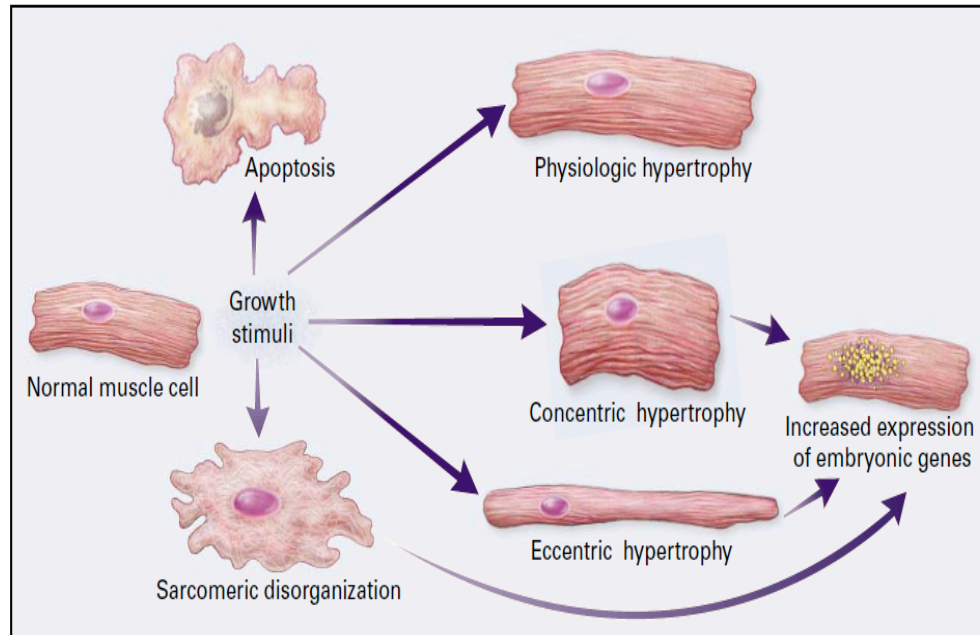
Deux mécanismes différents d'hypertrophie s'amorcent lors d'une surcharge hémodynamique. Ces mécanismes sont impliqués dans le remodelage ventriculaire suite à un événement ischémique (désigné « stimulus », voir figure 7)¹¹⁹. En réponse à une surcharge de pression surviennent divers phénomènes, soit la superposition des sarcomères en parallèle, une augmentation du volume des myocytes et, par conséquent, une augmentation de l'épaisseur du muscle du VG ; on parle alors d'hypertrophie *concentrique*. Une surcharge de volume télédiastolique induit une augmentation de la longueur des sarcomères qui se superposent en série et produisent ainsi une dilatation ventriculaire : il s'agit de l'hypertrophie *excentrique*. Les patients qui se présentent en défaillance ventriculaire manifestent une dilatation ventriculaire gauche excentrique avec ou sans augmentation de l'épaisseur du VG.

L'hypertrophie mène aussi à des changements du phénotype des cardiomyocytes qui réactivent l'expression de gènes réprimés en période adulte. L'activation de ce « programme génique fœtal » est accompagnée d'une diminution des gènes normalement exprimés dans un cardiomyocyte adulte¹²⁰. Ces changements géniques contribuent aux problèmes contractiles observés dans l'IC³⁰.

Altération des mécanismes de couplage excitation-contraction

Ces mécanismes font référence à la cascade d'événements qui débute par le développement d'un potentiel d'action cardiaque et qui se termine par la contraction et la relaxation des myocytes. La défaillance cardiaque amène une prolongation anormale de l'action cardiaque potentielle par une diminution de la vitesse de dépolarisation¹²¹. L'état de phosphorylation de protéines importantes pour la gestion intracellulaire de calcium est crucial pour expliquer ce phénomène (canaux calciques type-L, échangeurs Na⁺/Ca²⁺). Une description détaillée des altérations du couplage excitation-contraction dépasse les objectifs de cette thèse.

Figure 7.



Tiré de Hunter *et al.*¹¹⁹. **Changements morphologiques des cardiomyocytes en réponse à une surcharge hémodynamique de pression ou à une surcharge volémique.** Plusieurs changements de phénotype cellulaire se produisent au niveau des cardiomyocytes en réponse à une surcharge de volume ou de pression. En réponse à une surcharge de pression, une superposition en parallèle des sarcomères survient, ainsi qu'une augmentation de l'épaisseur du muscle du VG ; on parle alors d'hypertrophie *concentrique*. Une surcharge de volume amène d'autre part une augmentation de la longueur des sarcomères qui se superposent en série et produisent une hypertrophie dite *excentrique*. Ces modifications propres aux cardiomyocytes entraînent des modifications d'expression génique qui favoriseront un remodelage progressif du VG.

Anomalie des protéines de contraction et de régulation cellulaire

Tel que discuté dans la section sur l'hypertrophie, le remodelage ventriculaire entraîne une variation du ratio d'expression des isoformes chaînes lourdes de myosine (Myosin Heavy Chain; MHC)¹²². Ainsi, la proportion exprimée de l'isoforme fœtale V3 MHC (b-MHC) augmente¹²³. Cette isoforme particulière possède une action contractile lente et une activité ATPase inférieure, ce qui provoque une détérioration progressive de la fonction du ventricule gauche. Une description exhaustive des changements géniques impliqués dans l'IC dépasse les objectifs de cette thèse, et le lecteur est référé à l'excellente revue de littérature publiée sur le sujet par Lowes *et coll.* en 2002¹²³.

Modifications du cytosquelette protéique (matrice extracellulaire)

Dans les premiers jours qui suivent l'infarctus, la nécrose des myocytes et leur élimination par les cellules inflammatoires prédomine. Ces phénomènes impliquent la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) et la mise en place d'une fibrose substitutive. Le remodelage de la MEC est régulé en grande partie par les métalloprotéinases de la matrice (MMP). Les MMP sont divisées en six familles selon leur structure et leur spécificité de substrat. La dégradation précoce de la matrice par les MMP permet l'infiltration des cellules inflammatoires et des macrophages nécessaires à la dégradation du tissu nécrotique et à la cicatrisation¹²⁴. Etoh *et coll.* ont montré une activité gélatinolytique *in vivo* augmentée 80 minutes après l'infarctus¹²⁵. Bien que nécessaire pour la phagocytose des myocytes nécrosés, la dégradation précoce de la MEC

est associée à un risque de rupture du ventricule, puisque l'incidence de mortalité précoce par rupture ventriculaire est diminuée chez les souris *MMP-9*^{-/-} ou *MMP-2*^{-/-}¹²⁶. Les TIMP (inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases) sont des inhibiteurs endogènes des MMP¹²⁷. Au nombre de quatre (TIMP-1 à -4), seul le TIMP-4 est plus spécifique au cœur¹²⁷. Une baisse des taux protéiques des TIMP est le plus souvent rapportée lors d'un événement ischémique¹²⁸. Cette baisse des TIMP suppose un environnement plus permissif à la dégradation de la MEC par les MMP. De concert avec ce remodelage progressif, la dégradation de la MEC produit une fibrose substitutive qui a pour but de maintenir l'intégrité structurale de la zone infarctée suite à la nécrose et à la dégradation des myocytes¹²⁹. Les myofibroblastes apparaissent au 3^e jour et vont produire du collagène (I et III), lequel contribuera à la formation de la zone cicatricielle¹²⁹.

Désensibilisation des récepteurs β -adrénergiques et de leur signalisation

Le remodelage ventriculaire contribue à une diminution importante de la quantité des récepteurs β -adrénergiques exprimés à la surface des cardiomyocytes et à une baisse de leur capacité d'activation des adénylates cyclases face à une réponse ischémique¹³⁰. Ces altérations sont probablement secondaires à une augmentation de la norépinéphrine circulante chez les patients avec IC. Des études ont aussi démontré que des modifications du profil génétique suite à une lésion ischémique stimulent l'activation de la production du récepteur kinase 1 β -adrénergique (β ARK1)¹³¹. Cette protéine active une cascade de phosphorylation cytoplasmique qui entraîne la dégradation lysosomale des récepteurs adrénergiques par une protéine d'échafaudage appelée bêta-arrestine¹³².

3.4.2 Altérations propres aux cardiomyocytes

Nécrose/apoptose

Au cours des 50 dernières années, plusieurs études expérimentales se sont attardées aux mécanismes impliqués dans la séquence des événements qui entraînent la perte irréversible de cardiomyocytes après une insulte ischémique aiguë¹³³⁻¹³⁷. Ces études ont mené à la définition du phénomène d'« oncose » : processus de réponse ischémique des cardiomyocytes caractérisé par un œdème cellulaire, une perte d'intégrité ionique et une destruction progressive de la membrane cellulaire. Au cours des 10 dernières années, plusieurs autres études portant sur le sujet ont défini l'apoptose comme étant le mécanisme central à la base des changements observés après une lésion ischémique menant à un infarctus aigu du myocarde¹³⁶⁻¹⁴⁰.

L'apoptose, ou « mort cellulaire programmée », est le processus principal qui définit la mort des cardiomyocytes 6 heures après une occlusion coronarienne¹⁴¹. Jusqu'à 33 % de la perte des cardiomyocytes est directement liée à ce phénomène après un infarctus aigu du myocarde^{142, 143}. Ces phénomènes sont aussi observés dans les dommages de reperfusion du myocarde (voir section 3.2). La cellule en état d'apoptose semble contribuer à l'entretien de l'infarctus et est prédominante dans la « zone de transition », région aux abords du myocarde sain à distance de l'épicentre des lésions

ischémiques¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. Des modèles animaux d'infarctus aigu du myocarde ont démontré une réduction pouvant atteindre 30 % de la taille de l'infarctus par l'inhibition de certaines protéines comme les caspases (ZVAD-fmk ou YVAD-cmk) qui régulent l'apoptose¹⁴³. L'inhibition sélective de la caspase-3 mène à une réduction considérable des lésions causées par un phénomène ischémique aigu chez le rat¹⁴³. Des études animales récentes utilisant des souris transgéniques ont démontré une réduction significative (50 à 65 %) des lésions cellulaires aux cardiomyocytes et du nombre de cellules apoptotiques dans la zone de transition de l'infarctus¹³¹. La surexpression chez des souris transgéniques de gènes anti-apoptotiques tels que les gènes Bcl-2 ou A20, combinée à la mutation d'autres gènes pro-apoptotiques comme les gènes Fas ou Bid, provoque une diminution de la taille de l'infarctus et une amélioration de la fonction résiduelle du myocarde¹⁴⁷⁻¹⁴⁹.

3.4.3 Libération de cytokines/médiateurs inflammatoires

Des études récentes portant sur la physiopathologie des lésions après un infarctus aigu confèrent un rôle important aux cytokines pro-inflammatoires dans le remodelage ventriculaire. Plusieurs cytokines telles que le facteur onconécrosant (TNF), l'interleukine-1 (IL-1) et l'interleukine-6 (IL-6) sont produites localement dans le myocarde après une insulte ischémique¹⁵⁰. Même si ces molécules inflammatoires amorcent une réparation du myocarde endommagé, elles altèrent la programmation cellulaire et provoquent des lésions multiples aux cardiomyocytes et à la MEC environnants (tableau VII). La surexpression de marqueurs inflammatoires comme le

TNF ou l'IL-6 peuvent nuire à la réparation cellulaire. Ce déséquilibre entre les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires contribue au remodelage ventriculaire négatif et à la progression vers l'insuffisance cardiaque¹⁵¹.

3.4.4 Altérations des voies de signalisation

Deux grandes voies de signalisation sont activées par l'étirement des cardiomyocytes et la stimulation neuro-hormonale observés en phase aiguë d'un infarctus compliqué d'insuffisance ventriculaire gauche : la voie des protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK), dont l'activation est provoquée par la stimulation des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (essentiellement Gas et Gαq/α11 couplées aux récepteurs de la noradrénaline, de l'angiotensine II, et de l'endothéline)¹⁵², et la voie de la calcineurine, activée par l'augmentation de la concentration en Ca²⁺ libre à l'intérieur des cardiomyocytes¹⁵³. Les modifications de ces deux voies aboutissent à l'activation de facteurs de transcription qui déclenchent, de façon additive ou non selon le gène considéré, le processus hypertrophique et la réexpression du programme fœtal, pouvant aussi favoriser l'apoptose des cardiomyocytes. Une troisième voie est également activée par l'étirement des cardiomyocytes et fait intervenir des signaux dont l'origine se situe au niveau de la ligne Z du sarcomère et des protéines d'ancrage de la ligne Z à la membrane cellulaire, et qui sont transmis au noyau par une cascade de protéines dont la calcineurine et la calcineurine¹⁵⁴.

Tableau VII.

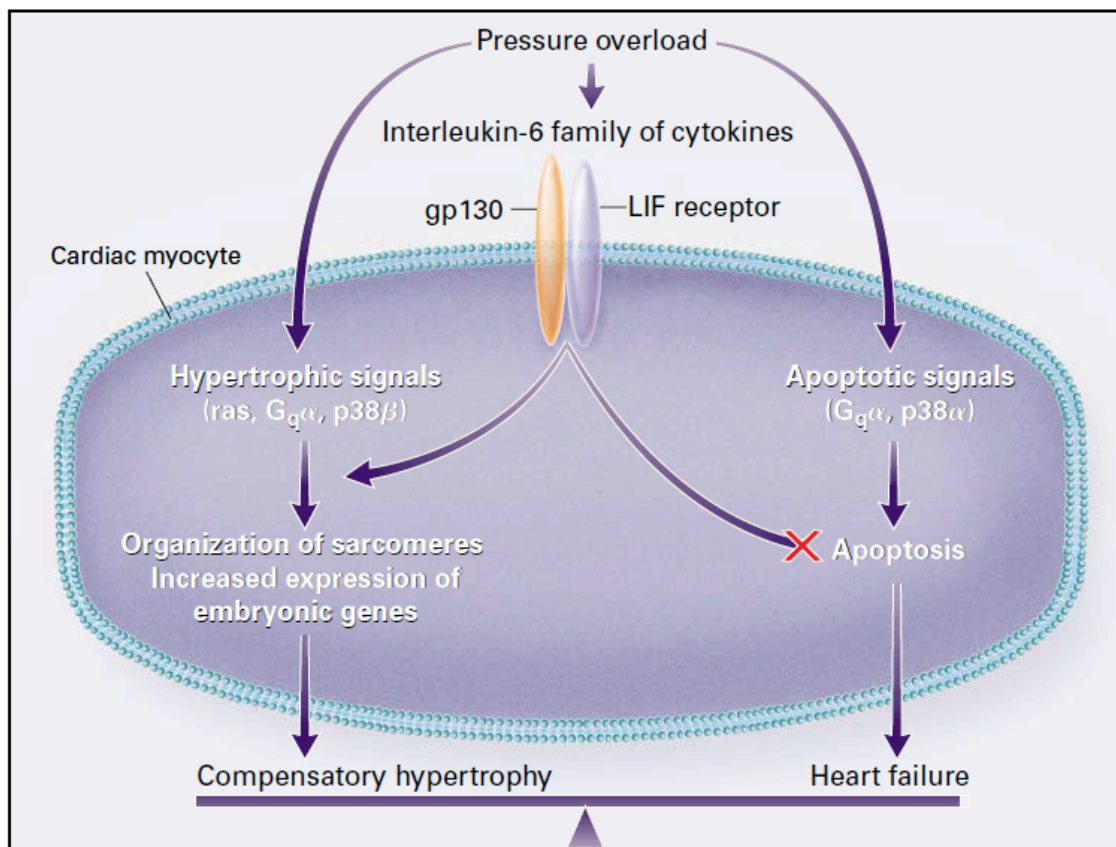
Left ventricular dysfunction
Pulmonary edema in humans
Cardiomyopathy in humans
Reduced skeletal muscle blood flow
Endothelial dysfunction
Anorexia and cachexia
Receptor uncoupling from adenylate cyclase experimentally
Activation of the fetal gene program experimentally
Cardiac myocyte apoptosis experimentally

Adapté de Mann *et al.*¹⁵⁰. *Effets délétères rapportés des médiateurs inflammatoires sur le développement de l'insuffisance cardiaque.* La production rapide de médiateurs inflammatoires tels que le TNF, l'IL-1 et l'IL-6 produit des altérations significatives au niveau du myocarde et favorise l'évolution de la défaillance cardiaque.

3.5 Intégration des mécanismes de remodelage

En somme, la dilatation ventriculaire progressive résulte d'une perte de fonction du myocarde. Cet accroissement augmente la tension murale systolique et diastolique, ce qui engendre une pression excessive au niveau des tissus nécrosés. Une diminution de la pression artérielle produit une activation des systèmes neuro-hormonaux qui vise à maintenir une perfusion adéquate des organes périphériques. Les facteurs sécrétés par ces différents systèmes contribuent au remodelage de la zone ischémique. Lorsque les contraintes imposées au myocarde et aux organes périphériques persistent (dilatation ventriculaire, diminution de la pression artérielle), on entre dans le processus chronique de l'IC et on observe une exacerbation du remodelage. C'est l'équilibre entre les différentes voies de compensation qui détermine le degré d'IC, et les approches thérapeutiques visent à freiner ces processus délétères (figure 8).

Figure 8.



Adapté de Hunter *et al.*¹¹⁹. *Mécanismes et équilibre impliqués dans l'hypertrophie, l'apoptose et la survie des cardiomyocytes au cours de la transition vers l'insuffisance cardiaque chronique en réponse à un stress biomécanique/ischémique.* L'accumulation de stimuli biomécaniques causée par les insultes ischémiques répétées, l'hypertension chronique et les surcharges hémodynamiques/volémiques provoque l'activation de plusieurs signaux parallèles (hypertrophie, apoptose) mutuellement opposés et interdépendants. Le développement de l'IC chronique dépend donc de l'équilibre entre ces différentes voies compensatoires. Par exemple, l'induction de certains ligands (« gp130-dépendent ligands ») entraîne, par leur liaison à leurs récepteurs spécifiques (facteur inhibiteur de la leucémie, LIF), une production de cytokines particulières (cardiotrophine 1) qui bloquent l'activation de l'apoptose. En l'absence de ce signal, les signaux d'apoptose sont favorisés et il se produit une perte irréversible de cardiomyocytes.

3.6 Thérapie cellulaire lors d'un infarctus du myocarde

3.6.1 Sources potentielles de cellules

Depuis 1995, plusieurs types cellulaires autologues ont été proposés pour améliorer la fonction du myocarde. Les cellules potentielles étudiées pour la transplantation autologue sont, entre autres, les cardiomyocytes¹⁵⁵, les myoblastes produits à partir du muscle squelettique^{156, 157}, les cellules musculaires lisses dérivées des vaisseaux sanguins¹⁵⁸ et les cellules hématopoïétiques et mésenchymateuses provenant d'une mobilisation pharmacologique ou d'une biopsie de la MO^{7, 159, 160}. Une description exhaustive de tous les types cellulaires utilisés pour la transplantation cellulaire dépasse largement les objectifs de cette thèse. Nous examinerons plus en détail les cellules souches issues de la MO puisque celles-ci sont décrites et utilisées dans les articles originaux présentés pour l'obtention du grade postulé. Le lecteur est prié de se référer aux références suivantes pour une révision détaillée sur le sujet¹⁶¹⁻¹⁶⁵.

Cellules souches dérivées de la moelle osseuse

La plasticité des cellules souches (CS) dérivées de la MO est le catalyseur de la recherche portant sur la régénération du myocarde. Tel que décrit par Verfaillie *et coll.*, les critères minimaux définissant une cellule souche sont : sa capacité d'auto-renouvellement, son aptitude à se différencier *in vivo* en un type cellulaire qui s'apparente au tissu d'origine et

sa capacité à se différencier en un autre type cellulaire différent de celui du tissu d'origine¹⁶⁶. La MO et le sang sont donc deux sources attrayantes de CS. Krause *et coll.* ont été des pionniers dans la description des CS provenant de la MO en démontrant leur capacité de différenciation en diverses lignées cellulaires et d'incorporation potentielle à de multiples organes¹⁶⁷. Pour le sujet de la thèse proposée, au moins deux populations distinctes de CS résident dans la MO : les cellules souches hématopoïétiques (CSH) et les cellules souches mésenchymateuses (CSM).

Cellules souches hématopoïétiques

La reconstitution du système hématopoïétique à l'aide des marqueurs de surface membranaire est le moyen le plus utilisé pour l'identification des CSH¹⁶⁸. Les marqueurs de surface humains comme le CD34 ou le CD133 aident à différencier les sous-populations de cellules enrichies de CSH. D'autres marqueurs hématopoïétiques tels que CD45, c-kit (CD117) et le facteur de cellule souche (« stem cell factor » - SCF) permettent de définir ce type cellulaire¹⁶⁸. En dépit des travaux originaux de Orlic *et coll.*^{7, 8, 169}, plusieurs débats font actuellement rage remettant en question la capacité des CSH primitives (1-2 % des CS totales provenant de la MO) à se différencier en cardiomyocytes, ou même à promouvoir une amélioration de la fonction du myocarde¹⁷⁰⁻¹⁷². Une discussion exhaustive portant sur les CSH primitives dépasse les objectifs de cette thèse.

Cellules endothéliales progénitrices

Les cellules endothéliales progénitrices (CEP) ou angioblastes sont une sous-population de CSH qui ont la capacité de se différencier en cellules endothéliales matures. Les CEP et les CSH partagent un ancêtre commun : l'hémangioblaste¹⁷³. En 1997, Asahara et ses collègues ont été parmi les premiers à définir les CEP primitives en utilisant une technique d'isolation par microbilles¹⁷⁴. Depuis, les CEP circulantes dérivées de la MO ont été caractérisées¹⁷⁵. Les CEP primitives expriment donc, lorsqu'elles sont dans la MO, les marqueurs de surface membranaire CD133, CD34 ainsi que le récepteur 2 du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR-2)^{176, 177}. Lorsque les CEP passent dans la circulation, elles vont exprimer certains marqueurs endothéliaux comme la cadhérine de l'endothélium vasculaire (VE-cadhérine), le facteur von Willebrand (vWF), et la « platelet endothelial cell adhesion molecule-1 » (PECAM-1 ou CD-31)¹⁷⁸. Les marqueurs primitifs vont progressivement disparaître de la surface cellulaire des CEP pour exprimer un phénotype final : CD34+/VEGFR-2+/CD133-¹⁷⁹. Ces cellules provenant de la MO et de la circulation sanguine seraient impliquées dans la réparation du myocarde¹⁸⁰. Plusieurs études ont démontré une relation très étroite entre les CEP provenant de la MO et la néoangiogenèse^{181, 182}. Fazel *et coll.* ont démontré que ces cellules sont recrutées aux sites d'ischémie active pour promouvoir l'angiogenèse par une régulation des niveaux de certaines cytokines au niveau du myocarde (angiopoïétine-1 et-2, VEGF)¹⁸³.

Cellules souches mésenchymateuses

Les CSM dérivées de la MO ont démontré un potentiel myogénique et sont des candidates potentielles pour la thérapie cellulaire^{7, 169, 184-186}. Ces cellules peuvent facilement être isolées grâce à leurs propriétés adhésives et proliférer en culture pour être ensuite utilisées sous leur forme génétique modifiée¹⁸⁷. Les CSM (aussi appelées cellules stromales de la MO) sont aussi caractérisées par leur capacité de différenciation en plusieurs lignées cellulaires¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. Il a été démontré que les CSM peuvent se différencier en cardiomyocytes fonctionnels sous certaines conditions de culture^{191, 192}. Plusieurs marqueurs membranaires ont été identifiés à la surface des CSM : CD105 (SH2), CD73 (SH3, SH4), CD29, CD44, CD71, CD90 (Thy-1), CD106 (« vascular cell adhesion molecule-1 »), CD120 et CD124¹⁹⁰. Au contraire des CSH, les CSM n'expriment pas certains marqueurs hématopoïétiques typiques tels que CD45 et CD34.

3.6.2 Voies d'administration utilisées

Il existe quatre méthodes principales utilisées pour administrer les cellules progénitrices qui vont entraîner une amélioration de la fonction du myocarde : la voie artérielle intracoronaire, la voie veineuse systémique, l'injection percutanée endomyocardique et l'administration épicaudique par approche chirurgicale¹⁶¹.

Injection intracoronaire

L'avantage principal de l'injection intracoronaire directe par ballonnet est l'administration des cellules dans les régions riches en apport de sang et de nutriments, deux conditions bénéfiques pour créer un environnement favorable à l'implantation et à la survie des cellules. Plusieurs types cellulaires ont été initialement administrés par cette méthode qui permet l'injection homogène d'un maximum de cellules au site de la lésion au cours du premier passage¹⁹³⁻¹⁹⁶. Il apparaît néanmoins évident que l'injection artérielle intracoronaire non sélective de CS progénitrices au niveau du myocarde nécessite une migration des cellules en dehors des vaisseaux vers le tissu environnant. Par conséquent, les régions mal perfusées du myocarde reçoivent une très faible proportion de cellules transplantées. De plus, certains types cellulaires comme les CS dérivées de la MO ont la capacité de migrer vers les régions ischémiques du myocarde, alors que d'autres cellules, telles que les myoblastes, ont tendance à se disperser, causant une obstruction de la microcirculation coronaire dans les régions saines du myocarde^{197, 198}.

L'administration intracoronaire de cellules souches par perfusion rétrograde veineuse est également une méthode bien décrite d'injection pour la thérapie cellulaire¹⁹⁹. Cette méthode d'injection nécessite l'introduction d'une canule dans le système veineux coronarien et l'occlusion transitoire distale par ballonnet du cathéter pour permettre de maximiser le temps de contact des cellules avec la région d'intérêt dans un système de basse résistance²⁰⁰.

Injection intraveineuse

L'administration intraveineuse des CS est la méthode la plus simple pour injecter une thérapie cellulaire sans avoir à composer avec les risques d'une chirurgie cardiaque ou d'une intervention percutanée¹⁵⁹. Toutefois, il est évident que la quantité de cellules administrées représente un obstacle majeur pour l'utilisation de cette méthode. Le temps de circulation des cellules injectées et la séquestration de celles-ci par les organes extra-cardiaques (poumons) limitent l'efficacité de cette méthode²⁰¹.

Injection ventriculaire

L'administration directe de CS progénitrices dans le tissu cicatriciel ou dans certaines régions du myocarde en hibernation par la route épicaudique chirurgicale ou endomyocaudique percutanée n'est pas restreinte par la diffusion des cellules qui proviennent de la circulation ou par la création de micro-infarctus^{202, 203}. Ces voies d'administration, particulièrement lorsqu'elles sont utilisées en infarctus aigu, comportent

d'importants risques de perforation ventriculaire¹⁹⁷. Il est cependant difficile de prédire la distribution de ces cellules dans un milieu nécrotique dépourvu du syncytium des cardiomyocytes vivants, lequel procure les signaux essentiels à l'incorporation et à la différenciation des CS dans l'environnement cellulaire¹⁹⁸.

À l'heure actuelle, il est encore difficile de déterminer quelle est la meilleure voie d'administration de CS pour favoriser une amélioration significative de la fonction du myocarde. Étant donné l'état actuel de nos connaissances à ce sujet, la physiopathologie de l'IC et les variabilités anatomiques qui provoquent la manifestation de cette maladie doivent encore dicter, sur une base individuelle, la voie retenue pour administrer la thérapie cellulaire. C'est pourquoi il est primordial de continuer à créer des modèles animaux reproductibles qui permettront d'élucider les mécanismes et de déterminer la meilleure voie d'administration de la thérapie cellulaire.

3.6.3 Mécanismes proposés

L'un des mécanismes efficaces suggérés de la thérapie cellulaire après un IDM est la régénérescence myocardique dans la zone de l'infarctus. Cette théorie se fonde sur l'opinion que les CS se transdifférencient en cardiomyocytes matures ou fusionnent avec eux et régénèrent physiquement le myocarde lésé⁸. En 2001, Orlic *et coll.* ont rapporté pour la première fois la régénérescence du myocarde par l'injection de CSH dans la zone limite de l'infarctus dans un modèle d'IDM chez la souris. Cependant, la transdifférenciation de CSH en myocytes a été fortement réfutée dans plusieurs études qui montrent le maintien des caractéristiques hématopoïétiques des cellules transplantées et ce, malgré leur localisation dans les régions périphériques de l'infarctus²⁰⁴. À l'appui de l'opinion selon laquelle des cellules transplantées peuvent régénérer le myocarde, il a été démontré que plusieurs types cellulaires se différencient en cardiomyocytes, notamment les CEP²⁰⁵, les CS enrichies en antigène CD34⁺²⁰⁶ et les CSM²⁰⁷.

3.6.3.1 Fusion/transdifférenciation

L'administration de cellules circulantes ou de MO favorise la néovascularisation myocardique, ce qui peut améliorer la fonction cardiaque. Dans des modèles d'ischémie myocardique ou d'infarctus chez de petits animaux, les CEP administrées par voie systémique ou recrutées dans la moelle osseuse stimulent l'angiogenèse et l'artériogenèse, améliorant ainsi la perfusion du myocarde¹⁸¹. Dans un modèle porcin d'ischémie aiguë du myocarde, Kawamoto *et coll.* ont rapporté que les CEP autologues

augmentaient la densité capillaire et le développement de vaisseaux collatéraux (visibles par angiographie) et étaient associées à une amélioration de la FÉVG²⁰⁸. Des études utilisant des cellules mononucléaires dérivées de la MO ont révélé des résultats semblables à ceux obtenus avec des CEP du sang périphérique. Dans des modèles murins d'ischémie cardiaque, l'implantation de ces cellules a induit l'angiogenèse, amélioré la perfusion dans le myocarde ischémique²⁰⁹ et entraîné une amélioration du débit sanguin dans les vaisseaux collatéraux²¹⁰.

3.6.3.2 Effets paracrines

Les cellules transplantées au niveau du myocarde sont soumises à un environnement hostile et à des conditions d'injection qui peuvent altérer leur capacité d'incorporation, de sorte qu'une très faible quantité (< 1 %) de cellules s'incorpore dans le myocarde²¹¹. Cette variation peut être due en partie à l'existence de différents degrés de lésions tissulaires dans les modèles d'ischémie, aux différents types et sources de cellules, ainsi qu'à la méthode d'administration. Néanmoins, on observe des bienfaits de la transplantation cellulaire sur la fonction du myocarde^{159, 184}. Ce phénomène amène un concept pivot permettant de postuler que la présence des cellules dans le myocarde n'est pas essentielle à leur action sur la protection et la préservation de sa fonction. Cette hypothèse est appuyée par des études montrant que ces cellules ont la capacité de sécréter des 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) et le monoxyde d'azote (NO)²¹². L'effet paracrine permet donc

d'envisager que les cellules transplantées produisent des médiateurs inflammatoires (peptides actifs) qui seront bénéfiques et permettront de promouvoir la réparation du myocarde²¹³. Tel que discuté dans la section sur le remodelage, en réponse à une insulte cardiaque ischémique, plusieurs mécanismes mal adaptés se mettent en marche pour altérer la dimension et la fonction du VG¹¹⁵. Des mécanismes moléculaires tels que l'altération de la matrice extracellulaire, l'activation de cytokines inflammatoires et l'apoptose provoquent une suite d'événements qui entraînent une dilatation ventriculaire progressive et mènent à l'IC¹¹⁸. Ces processus sont les cibles principales proposées pour expliquer les différents modes d'action de la thérapie cellulaire en période ischémique aiguë.

Effet paracrine sur l'angiogenèse

Dans plusieurs modèles animaux, l'administration de facteurs de croissance angiogéniques améliore la perfusion régionale du myocarde et favorise l'angiogenèse¹¹⁸. Les cytokines les plus étudiées en thérapie génique sont le VEGF et le facteur de croissance de fibroblastes (FGF). Les cellules transplantées au niveau du myocarde sont capables de sécréter de bonnes quantités de ces médiateurs paracrines angiogéniques²¹⁴. Des études suggèrent que la sécrétion de ces cytokines stimule l'angiogenèse et, par conséquent, la perfusion locale du myocarde ischémique^{215, 216}. Enfin, bien qu'une discussion détaillée du transfert de gènes dépasse les objectifs de cette thèse, il est important de noter que l'incorporation de gènes cibles dans la cellule peut améliorer la

production de peptides bioactifs (VEGF, FGF) et induire une augmentation encore plus importante des signaux paracrines locaux et de la néoangiogenèse²¹⁷.

Effet paracrine sur le maintien de l'équilibre de la matrice extracellulaire

Tel que discuté dans la section sur le remodelage, la MEC est un réseau dynamique qui, par de multiples signaux cellulaires, maintient et assemble les groupes de cellules en tissu fonctionnel. Une mauvaise régulation de la MEC est l'une des causes principales de remodelage négatif et d'une baisse de la performance du myocarde dans l'IC¹²⁵. Bien que les mécanismes qui sous-tendent le rôle de ces cellules sur la MEC demeurent mal compris, les hypothèses avancées tendent à suggérer que la transplantation de cellules en IDM provoque une réorganisation de la MEC dégradée et le dépôt d'éléments essentiels à l'intégrité de la MEC dans la zone ischémique²¹⁴. L'intégrité de la MEC dépend de l'équilibre entre les MMP et leurs inhibiteurs fonctionnels, les TIMP²¹⁸. Dans un modèle ischémique chez le rat, Fedak *et coll.* ont observé une augmentation de l'expression des TIMP dans le myocarde, une réorganisation des éléments dégradés de la MEC et une diminution de la dilatation ventriculaire²¹⁹. D'autres auteurs ont aussi démontré une amélioration de la fonction ventriculaire par une préservation de l'équilibre de la MEC²²⁰. Ces résultats suggèrent que l'action paracrine des CS freine les effets néfastes du remodelage par une modulation de la MEC.

Effet paracrine sur l'apoptose

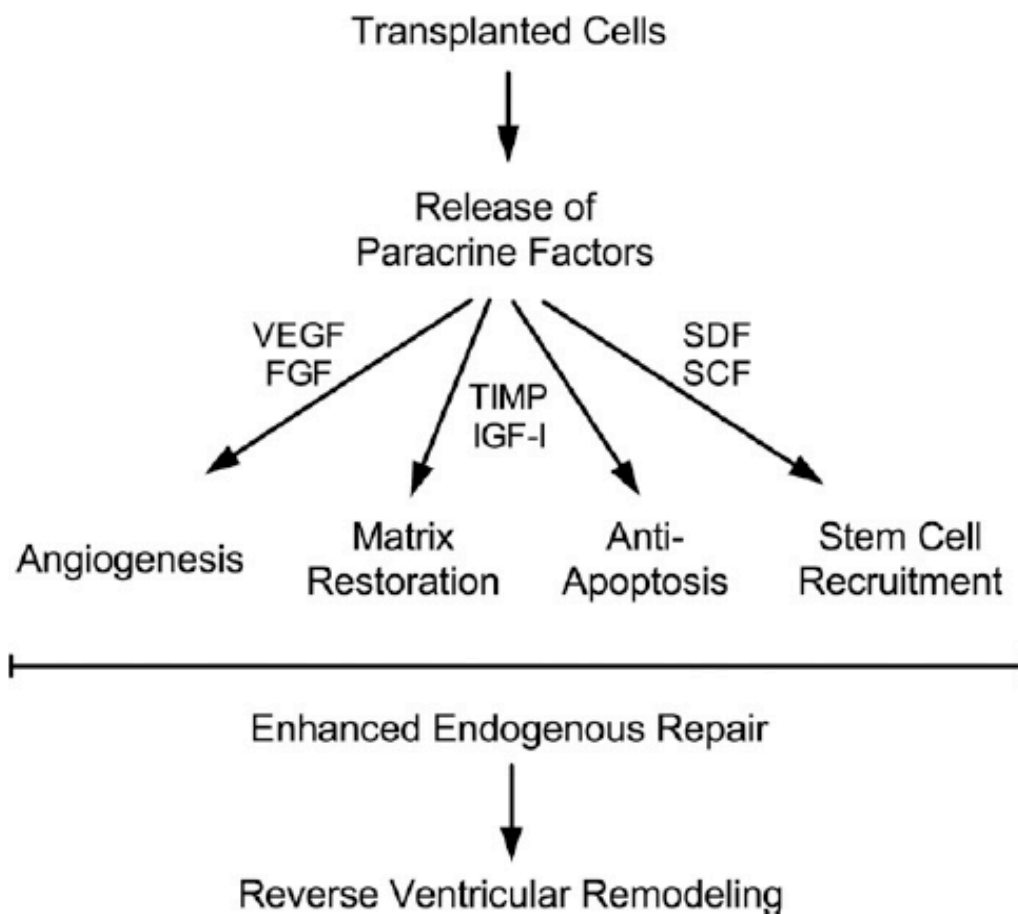
Même si les applications de ce mode de réparation sont encore limitées, les effets de la thérapie cellulaire sur la modulation de l'apoptose ont été documentés. Uemura *et coll.* ont observé dans un modèle murin que la transplantation cellulaire pouvait limiter l'apoptose dans l'environnement ischémique par la production de signaux paracrines²²¹. D'autres ont démontré l'action paracrine indirecte des CS par une augmentation de la survie cellulaire dans la zone infarctée^{222, 223}. En plus des effets potentiels des CS sur le remodelage de la MEC, certains auteurs ont proposé qu'une augmentation des TIMP pourrait avoir un effet anti-apoptotique et prévenir ainsi la mort cellulaire des cardiomyocytes²²⁴. L'apoptose est un phénomène complexe et le rôle des CS transplantées dans la modulation des multiples mécanismes de ce processus demeure encore à déterminer.

Effet paracrine sur le recrutement cellulaire et les mécanismes endogènes de réparation

La capacité de réparation endogène du cœur est limitée. Des CS cardiaques résidentes sont situées dans le myocarde et auraient la capacité de régénérer/réparer le myocarde endommagé²²⁵. L'effet paracrine des CS pourrait activer ces cellules résidentes et favoriser l'activation des mécanismes endogènes de réparation du myocarde. Fazel *et coll.* ont clarifié ce phénomène en identifiant un facteur déterminant dans les processus de réparation endogène, le facteur de cellule souche (SCF)²²⁶. Ces auteurs ont aussi observé l'augmentation d'un signal du récepteur « c-kit » qui stimulerait le recrutement endogène des cellules souches de la MO¹⁸³. Ces processus suggèrent qu'une présence même transitoire de CS peut provoquer une modulation durable du phénomène de réparation

endogène par un effet paracrine. La figure 9 intègre ce mécanisme de réparation potentiel aux autres processus interreliés proposés pour expliquer le mode d'action paracrine des CS.

Figure 9. Action paracrine des cellules souches et mécanismes potentiels de réparation.



Tiré de Fedak *et al.* 2008²¹⁴. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la modulation des événements suite à un infarctus aigu du myocarde par les effets paracrines des cellules souches. Ces processus freinent le remodelage négatif et limitent les lésions causées au myocarde. FGF = Fibroblast growth factor, IGF-1 = Insulin-like growth factor 1, SCF = Stem cell factor, SDF = Stromal-derived factor, TIMP = Tissue inhibitors of metalloproteinases, VEGF = Vascular endothelial growth factor.

3.6.4 Résumé des études cliniques

En 2002, les premières études portant sur l'administration de cellules provenant de la MO dans le myocarde étaient publiées. Toutes ces études visaient à montrer la supériorité (amélioration de la fonction ventriculaire ou de la classe fonctionnelle) d'une administration conjointe des cellules dérivées de la MO par rapport à un traitement médical optimal seul. De façon générale, suite à une angioplastie primaire, à l'implantation d'une endoprothèse coronarienne et à une reperfusion efficace du territoire ischémique, les patients recrutés dans ces études ont reçu une injection intracoronarienne de cellules souches dérivées de la MO (cellules stromales, cellules vasculaires, adipocytes, ostéoblastes, ostéoclastes, CSM et CSH, populations cellulaires sélectionnées (CD133+))^{227, 228}. L'étude TOPCARE-AMI, ayant même utilisé des CEP provenant du sang périphérique, a démontré avec succès une amélioration significative de la FÉVG mesurée au niveau de la zone infarctée²²⁹. L'étude BOOST a ensuite démontré une augmentation de 6 % de la FÉVG à 6 mois chez les patients auxquels on avait administré des cellules provenant de la MO, en comparaison avec le groupe témoin²³⁰. En somme, ces études préliminaires ont démontré l'efficacité précoce du traitement cellulaire par la démonstration (à 6 mois) d'une amélioration de la contractilité de la zone ischémique nécrosée^{227, 228, 230, 231}. Cette amélioration de la fonction ventriculaire était néanmoins transitoire, puisque aucune différence significative de la FÉVG n'a été observée à 18 mois par rapport au groupe témoin²³². Ces résultats éphémères mais prometteurs ont toutefois servi de tremplin pour la réalisation d'autres études à double insu et contrôlées par placebo (en cours) visant à confirmer l'efficacité de ce traitement innovant.

Chapitre 4 : Manuscrit #2

4.1 Avant-propos au Manuscrit #2

Tel que décrit, l'action paracrine des CS provoque une modulation des mécanismes précoces déclenchés suite à un IDM. Ce mode de traitement prometteur est utilisé pour favoriser la récupération fonctionnelle du myocarde après un événement ischémique aigu^{222, 233}. Dans ce deuxième manuscrit, le candidat au doctorat en sciences biomédicales propose au lecteur une revue complète et actuelle des effets paracrines des CS comme moyen de préserver et de régénérer la fonction du myocarde. Ce manuscrit est accepté pour publication dans le « *Journal of Cardiovascular and Translational Research* ».

THE PARACRINE EFFECT: PIVOTAL MECHANISM IN CELL-BASED CARDIAC REPAIR

**Simon Maltais, M.D., M.Sc.¹; Jacques P. Tremblay, Ph.D.²; Louis P. Perrault, M.D.,
Ph.D.¹; and Hung Q. Ly, M.D., M.Sc.³**

¹Dept. of Cardiac Surgery, Montreal Heart Institute, Université de Montréal, Quebec,
Canada;

²Dept. of Human Genetics, CHUQ-CHUL, Laval University, Ste-Foy, Canada;

³Dept. of Medicine, Montreal Heart Institute, Université de Montréal, Quebec, Canada

Running Title: Paracrine Effect in Cardiac Cell Therapy

Word Count: 4333 (excluding references)

Address correspondences to:

Hung Q. Ly, M.D., M.Sc.

Dept. of Medicine, Montreal Heart Institute, Université de Montréal;

5000 Belanger st. (East), Montreal, Qc, H1T 1C8, Canada

T: 514-376-3330 F: 514-376-6299

ABSTRACT

Cardiac cell therapy has emerged as a controversial yet promising therapeutic strategy. Both experimental data and clinical applications in this field have shown modest but tangible benefits on cardiac structure and function and underscore that transplanted stem-progenitor cells can attenuate the post-infarct microenvironment. The paracrine factors secreted by these cells represent a pivotal mechanism underlying the benefits of cell-mediated cardiac repair. This article reviews key studies behind the paracrine effect related to the cardiac reparative effects of cardiac cell therapy.

Key Words

Paracrine Effect, Cardiac Repair, Stem-Progenitor Cells, Therapy

INTRODUCTION

Ischemic heart disease (IHD) remains a leading cause of mortality worldwide. In North America, acute myocardial infarction (AMI) accounts for more than 50% of cardiovascular-related deaths²³⁴. The loss of cardiomyocytes irreversibly damages the myocardium. With more patients surviving their AMI and an aging population, congestive heart failure (CHF) has become a major health concern^{13, 235}. Today, heart transplantation remains the only curative treatment for severe myocardial damage. Yet, the growing discrepancy between demand and supply emphasizes the stark reality that it no longer fills the clinical need. Accordingly, numerous novel therapies have been sought with cardiac cell therapy (CCT) emerging as a promising therapeutic strategy^{161, 236}.

CARDIAC CELL THERAPY

Strictly speaking, current CCT takes advantage of donor cells considered as either progenitors (lineage-driven cells with limited multipotentiality) or stem cells (SCs) (traditionally defined by self-renewal, clonogenicity and proliferation)²³⁷. In the present article, these promising cells will be referred as stem-progenitor cells (SPCs).

The broad pool of potential cellular candidates for cardiac repair can be divided into embryonic stem (ES) cells or adult SPCs²³⁸⁻²⁴³. ES cells hold tremendous therapeutic potential (for both structural and electrophysiological repair)²⁴⁴, but progress has been mired in ethical and tumorigenicity issues. Endogenous cardiac SPC populations have

been identified^{245, 246} and are distinguished either by surface markers (such as c-kit^{247, 248} and Sca-1^{249, 250}), the presence of the ABCG2 transport protein²⁵¹ or the capacity for Hoechst dye efflux.²⁵² The invasiveness of cardiac biopsies and extensive *ex vivo* expansion process represent notable limitations for clinical use. Exogenous adult SPCs originate from various tissue “niches” ranging from bone marrow (BM) and adipose tissue to endometrial and skeletal muscular tissue.

Clinical Application of Cardiac Cell Therapy

In recent years, clinical trials based on early, dramatic small animal findings have exploited the underlying assumption that repopulation of scarred myocardium by exogenous cellular surrogates of cardiomyocytes is feasible. This recent interest for organ regeneration is not without merit as these trials have hinted at structural and functional improvements following SPC transplantation^{253, 254}. Of the various cell types, skeletal myoblasts (SKM) and BM-derived cells have been the most extensively investigated, mainly documenting safety and feasibility in AMI or post-infarction CHF²⁵⁴. Promising results on actual “hard” end-points (such as death, myocardial infarction and/or revascularization)²⁵⁵ have even provided an impetus for further forays into clinical trials. However, small patient numbers, use of surrogate endpoints and a possible lack of sustainability have limited the ability to draw firm conclusions on actual clinical efficacy^{230, 256, 257}. An extensive review of the clinical CCT trials published to date is beyond the scope of this review and the reader is referred to excellent reviews on the subject²⁵⁸⁻²⁶¹.

Current Controversies and Limitations

Debate over unresolved mechanistic understanding and the rapid transition towards clinical application with modest but tangible benefits on cardiac structure and function only underscore the fact that the field is still in its infancy^{262, 263}. Ongoing debate regarding the role of CCT has highlighted current unresolved issues²⁶⁴⁻²⁶⁶:

- (1) Conflicting findings on the benefits of CCT have only highlighted the lack of methodological uniformity in the field, either at the scientific or clinical level;
- (2) The most appropriate cell population remains to be defined and, most likely, may vary according to the time from injury as well as the type of myocardial injury;
- (3) Cell engraftment and survival after transplantation has been consistently low regardless of cell type with possible explanations ranging from cell-dependent (differentiation level, resistance to ischemia, apoptosis) to cell-independent factors (time of cell therapy, delivery method, interaction with other treatment methods);
- (4) Uncertainty exists regarding which underlying cellular mechanism plays a pivotal role in cardiac repair.

Despite the latter controversies, the unmet clinical need has prompted some to prone a controversial, rapid transition from bench to bedside²⁶⁷. Conversely, there is now a growing consensus that a greater understanding of mechanisms involved in myocardial healing will be required to move this potentially revolutionary field forward^{258, 263, 265}.

THE PARACRINE EFFECT OF CELL-MEDIATED CARDIAC REPAIR

Falling “*building blocks*” hypothesis

As described above, cellular mechanisms underlying potential benefits of CCT remain to be elucidated. While transdifferentiation or fusion of SPCs with cardiomyocytes have been documented, cardiac regeneration *per se* remains an elusive goal as the number of SPCs being transplanted remains far from actual numbers needed to replenish the amount of clinically-relevant damaged myocardium²⁶⁵. Moreover, activation of the innate self-renewal capacity of cardiac resident progenitor cells remains, for the moment, an observational phenomenon as current means to unlock this tremendous potential in a reproducible manner are lacking¹⁶². The fundamental assumption of initial studies on cell-mediated cardiac repair that transplanted cells will provide the “building blocks” to regenerate an injured heart might be erroneous. With contemporary methods of cell delivery, only a small portion of cells is being retained in the myocardium. Hou et al. reported on how engraftment of ¹¹¹indium-oxine labeled peripheral SPCs was attenuated by the route of delivery: 11.0 ±3.0% for intramyocardial injection relative to 3.2±1.0% and 2.6±0.3%, for retrograde coronary venous delivery and intracoronary route, respectively²⁰⁰. Using near-infrared *in vivo* imaging to track labeled SPCs (peripheral circulating progenitor cells, bone marrow mononuclear cells and mesenchymal stem cells) in a swine model of infarction, Ly et al. compared cellular retention rates and found drastic loss of progenitor cells as early as an hour after delivery by intracoronary route²⁶⁸. Clinical data confirmed similar findings with engraftment rates in the order of 6.9±4.7%

within an hour of intracoronary injection of bone marrow-derived cells²⁶⁹. Using cell labeling with 18F-fluoro-2-deoxy-D-glucose, Hoffman et al. found that CD34+-enriched bone marrow cells displayed improved homing and engraftment when compared to unselected BM-cells: following intracoronary delivery, between 1.3% to 2.6% of the scintigraphic activity of the latter was detected in infarcted tissue whereas their selected counterparts displayed retention rates in the order of 14-39%²⁰¹.

A paradigm shift in cell-mediated cardiac repair

The above data highlight the salient point that, at the moment, if clinically-significant cardiomyogenesis *per se* seems unlikely and that SPCs are not retained or survive in sufficient numbers for extended periods of time, other cell-related mechanisms are needed to explain the preclinical evidence of improvement in cardiac healing as well as the documented clinical benefits of CCT on both ventricular structure and function²⁷⁰. Various other mechanisms have been put forth and have ranged from intuitive ones such as improvement in myocardial perfusion by angiogenesis²⁷¹, reduction in adverse ventricular remodeling by modulating the extracellular matrix²⁷², modulation of critical interactions in the BM/heart axis²⁷³, to more controversial ones, such as the “dying stem cell hypothesis”²⁷⁴. A more compelling explanation for cell-mediated cardiac repair that might also provide a unifying perspective on all SPC-related benefits is the *paracrine effect*.

The paracrine “software” hypothesis

The underlying hypothesis behind the paracrine phenomenon is that transplanted SPC will provide “the software not the hardware”²¹³ to promote cardiac repair. Studies on the pathophysiological remodeling of infarcted myocardium provide insight into how upregulated cytokines and growth factors could play a pivotal role in the healing process²⁷⁵. The notion that pro-inflammatory cytokines (eg. tumor necrosis factor alpha (TNF- α) or interleukin (IL-6) promoted deleterious myocardial scarring and exacerbated ventricular dysfunction had initially focused the attention of researchers on how secreted, soluble factors could alter cardiomyocyte function and viability¹⁵⁰. Alternatively, investigators realized that other such factors were in fact beneficial, such as IL-10, which blunts the inflammatory reaction post-infarction²⁷⁶. Eventually, the angiogenic phase of post-infarction remodeling provided clues to the importance of cells as secretory vehicles of pro-healing soluble factors: platelets homing to the ischemic environment of infarcted tissue were reported to be the source of the key pro-angiogenic protein vascular endothelial growth factor (VEGF), thereby forming the cellular basis of a “paracrine potential” for the endogenous activation of coronary collateral formation²⁷⁷.

Cell-mediated “cytokine factories”

Cell-mediated therapy could be viewed as providing “cytokine factories”²⁷⁸. Secreted paracrine factors act to stimulate or accelerate the healing process. Kinnaird et al. provided proof of this phenomenon in a series of elegant studies exploring both *in vitro* and *in vivo* effects of paracrine factors²²³. The authors demonstrated by ELISA analyses

that culture media from murine BM mesenchymal stem cells (MSC) contained important amounts of VEGF, basic fibroblast growth factor (bFGF), placental growth factor (PIGF), and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) relative to control, basal media. Furthermore, a dose-dependent enhancement effect on proliferation of both endothelial and smooth muscle cells was observed when the latter cells were expanded with the conditioned media (CMed) compared to control media. Subsequently, using a hind limb ischemia murine model, the same investigators showed that ischemic hind limbs injected with green fluorescent protein (GFP)-labeled MSCs evolved more favorably relative to controls injected due to an ensuing angiogenic effect. However, there were two key findings to strength an underlying paracrine mechanism: (1) despite that MSCs were found dispersed throughout injected hind limb muscles, they failed to colocalize with maturing collateral vessels identified by immunohistochemical studies and (2) MSC-injected animals had increased local, intramuscular levels of secreted angiogenic factors. In a subsequent study, Kinnaird et al. also used Affymetrix Gene Chip studies to confirm that when exposed to hypoxia, BM-derived cells displayed a 1.5-fold or greater increase in gene expression of key angiogenic cytokines²⁷⁹.

Strong evidences in favor of paracrine cell-mediated cardiac repair

More specifically for cardiac injury, Uemura et al. reported that CMed from BM-derived SC showed evidence of secretion of the prosurvival factor Akt, as well as increased levels of VEGF and stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) during hypoxia studies²²¹. In the *in vivo* studies, infarcted hearts were injected with preconditioned BM-

SC (4-hour exposure to hypoxia prior to injection). There was a significant increase in ejection fraction and reduced ventricular dimensions, despite little or no GFP-labeled BM-SC found in the peri-infarct zones. The authors speculated that the injected cells were able to prevent further cardiomyocyte apoptosis through a paracrine effect from secreted signaling factors, which abrogated adverse post-infarction ventricular remodeling. Based on these prosurvival effects related to Akt secretion, Dzau and colleagues went a step further by over-expressing Akt on the surface of MSC in a series of seminal studies on the importance of paracrine factors in cardiac repair^{222, 280-282}. First, these investigators reported restoration of ventricular function combined to improvement in remodeling following intra-myocardial injection of MSC over-expressing Akt (Akt-MSCs), following retroviral transfection with a bisstronic vector encoding both GFP and Akt. Second, using *in vitro* studies, hypoxia-induced apoptosis was prevented by using strictly the CMed from Akt-MSCs. Then, a significant decrease in infarct size after CMed-injection was reported in rodent models of myocardial infarction, relative to control media injection. Finally, of the secreted soluble factors (for example, VEGF, fibroblast growth factor (FGF), hepatic growth factor (HGF), insulin-like growth factor (IGF), thymosin-b4) comprising the “paracrine potential” secreted by these engineered cells, it was the secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) that was deemed critical in mediating the paracrine protection of Akt-MSC by modulating cardiomyocyte intracellular Wnt signaling. In addition, Fazel et al. reported on the pivotal role of homing BM-derived ckit⁺ cells in favoring efficient myocardial healing by establishing a less hostile post-infarction microenvironment¹⁸³. Using a BM chimeric murine model and gene tagging studies, the investigators documented that the majority of ckit⁺ cells found

in the heart after myocardial injury were of BM origin. Thus, paracrine factors helped establish a milieu conducive to healing by upregulating VEGF and altering favorably the balance of angiogenic cytokines (e.g. angiopoietin-1 and -2) in the infarct border zone.

Which cells are the best for paracrine repair?

While most of the insights regarding the paracrine effect evolved from studies primarily related to bone marrow-derived SPCs, other cell populations have also been shown to exert this phenomenon. Isner and his team speculated that pathological processes (such as tumors, ischemic heart disease) leading to site-specific angiogenesis did so by stimulating local expression of VEGF as well as inducing VEGF receptors on surrounding endothelial cells. Using conditioned media from myoblasts exposed to 4 days of hypoxia, these investigators found a three-fold increase in VEGF receptors as measured by ¹²⁵I-VEGF specific binding on cultured HUVECs²⁸³. Extending these observations, Murtuza et al. used a rat model of cardiac injury to show that transplanting wild-type SKM or SKM engineered to secrete the IL-1 receptor antagonist (SKM/sIL-1ra) significantly improved in systolic and diastolic functions as well as ventricular dilatation (as evidenced by reduced left ventricular end-diastolic diameter) when compared to non-treated animals. Moreover, while less than 18% of skeletal myoblasts were detected at 3 weeks post-transplantation, the investigators not only documented reduced cardiomyocyte hypertrophy but also reported that implanting SKM in the infarct border zone lead to a decrease in type-2 and -9 matrix metalloproteinases as confirmed by enzyme zymographic studies²²⁰. Similarly, Formigli et al. used a swine model of cardiac

injury to study the benefits of coronary transvenous delivery of SKM overexpressing relaxin, a hormone involved in modulating the extracellular matrix and promoting neoangiogenesis. While the use of cyclosporine and concomitant use of betamethasone to induce tolerance of murine SKM injected in swine hearts may confound interpretation, the investigators nevertheless show improved myocardial recovery mostly through and by attenuating the deposition of collagen, which ultimately impacted adverse ventricular remodeling in combination with an increase in capillary density²¹⁵. With regard to SKM, data from *in vitro* studies combined with xenogenic transplantation models of myocardial infarction also point to a preponderant role of the paracrine effect²⁸⁴. Alternatively, human adipose-derived stromal cells were found to secrete a variety of growth factors and cytokines and, when cultured under in 1% O₂ for 72 hours, exhibited increased potency to preserve endothelial cell growth and prevent their apoptosis²¹².

Other paracrine pathways: the bone-marrow/heart axis

The majority of progenitor cells remain quiescent in a microenvironment within the BM, termed the stem cell niche²⁷³. These cells are tethered within the BM by integrins to stromal cells. The proliferation, release, and migration of these cells anchored in stem cell niches (often referred to as “endothelial progenitor cells (EPCs)), although incompletely understood, is tightly regulated by a complex interplay involving cytokines, proteinases, and several adhesion molecules^{273, 285}. There is therefore a dynamic relation between the BM (stem cell niches) and the circulation following tissue-specific injury. Various mediators are implicated in this mobilization, and an exhaustive description of these

pathways would be beyond the scope of this oriented review. The reader is referred to Tilling et al. for a complete review of mechanisms involved in the mobilization of progenitor cells from the BM²⁸⁶.

Ischemic injury: the critical role of stromal-derived factor 1(SDF-1)

The chemokine stromal-derived factor 1 (SDF-1)/CXCR4 axis regulates adhesion/chemotaxis of BM progenitor cells through activation/regulation of specific integrin molecules²⁸⁷. This axis is central to the retention/mobilization within the BM of EPCs following an ischemic injury. In a murine model of hindlimb ischemia, SDF-1 expression was downregulated in BM and up regulated in blood plasma favoring stem cell mobilization in peripheral blood and homing into ischemic tissues²⁸⁸. Hence, there is a direct correlation between the plasma concentration and the degree of EPC migration, implying that the response is determined by a concentration gradient of SDF-1²⁸⁹. SDF-1 has been shown to be the most potent chemoattractant of EPCs²⁹⁰. This molecule plays therefore a critical role in tissue repair in the setting of CHF by modulating BM-derived SPCs trafficking through mobilization, recruitment and proliferation of EPCs²⁹¹. SDF-1 upregulation during hypoxia is also facilitated by the transcription factor hypoxic-inducible factor 1 (HIF-1)²⁹². SDF-1 gene expression has been shown in murine models to be mediated by HIF-1, resulting in a proportionate selective expression of SDF-1 in ischaemic tissues²⁹². On entering the BM microenvironment, SDF-1 activates several proteinases expressed by BM stromal cells such as matrix metalloproteinases 9 (MMP-9)²⁹³. MMP-9 is closely involved in the liberation of BM-derived EPCs to the circulation

through the BM sinusoids²⁹⁴. One of the most powerful endogenous stimuli of BM stem cell recruitment is tissue ischemic injury. Myocardial infarction induces strong tissue oxygen depletion and promotes mobilization of EPCs from the BM to the ischemic heart²⁹⁵. Chronic hypoxia has always been one of the most potent stimuli for neovascularization²⁹⁶. Animal studies have shown that adult vasculogenesis occurs partially through *in situ* recruitment and proliferation of circulating BM-derived cells²⁹⁷. Ischemia induces multiple processes such as cytokines release and up-regulation of surface markers that allow EPCs to mature and proliferate and promote end-organ recovery^{283, 298}. Hence, several pivotal factors/cytokines are also reported to promote the mobilization of BM-derived SPCs into the peripheral circulation including granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), IL-8, Grob, stem cell factor (SCF), vascular endothelial growth factor (VEGF), and erythropoietin (EPO)^{273, 299, 300}. Along with SDF-1, all of the latter factors are altered in the setting of CHF, which in turn modulate cardiac healing by controlling the efflux of BM-derived progenitor cells.

SECRETED PARACRINE FACTORS

While there exists a myriad of potential therapeutic cytokines and/or growth factors secreted from a variety of cells³⁰¹, key paracrine factors that have been studied either at the preclinical or clinical setting to promote cardiac healing or repair are briefly reviewed:

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF): This powerful family of growth factors

(VEGF A to D, placental growth factors) has been classically linked to angiogenesis, is intimately linked to and regulates vascular growth and modulates of vascular biology (e.g. modulating vascular permeability)³⁰². Besides its obvious advantageous angiogenic potency, VEGF might prove beneficial as a paracrine factor due to other reported effects. It has been linked to increase BM cellularity, mobilization and recruitment of progenitor cells.³⁰³ It has been reported to be a mediator of the infarct-size limiting effect of BM mononuclear cells injection, due to anti-apoptotic effects³⁰⁴. Moreover, in a swine model of cardiac injury, Laguens et al. reported on evidence that VEGF could induce mitosis (cariokinesis) in cardiomyocytes following intramyocardial delivery³⁰⁵.

Hepatic Growth Factor (HGF): While initially described as an important regulator of hepatic tissue, it was later found to act in virtually every tissue in the body ranging from the nervous system to the immune and reticuloendothelial systems³⁰⁶. Experimental data have revealed that its most relevant paracrine cardioprotective effect stems from its anti-apoptotic effect^{307, 308}. Either via gene transfer or over-expressed on transplanted cells, additional paracrine roles ascribed to HGF have been pro-angiogenesis, remodeling effect on the extracellular matrix and enhancement of exogenous cell engraftment for delivery to injured myocardium^{309, 310}. In addition, as described below, in combination with other cytokines, HGF's paracrine effects include recruitment of endogenous cardiac SCs³¹¹.

Stem Cell-Derived Factor (SDF-1 α): As stated earlier, this chemokine, also known as CXCL12, has been implicated in neoplastic or SPC migratory properties, with an active role in inflammatory processes related to tissue injury^{312, 313}. It has been implicated in

normal hematopoiesis and cardiogenesis. Through its action on the chemoreceptor CXCR4, SDF-1 α contributes to cellular recruitment of normal/stem or malignant cells³¹⁴. In ischemic injuries, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1), a key mediator of cellular response to hypoxia, directly regulates SDF-1 α levels^{292, 315, 316}. After cardiac injury, documented SDF-1 α intra-myocardial levels have been documented to rise and fall within the first week³¹⁷. Thus, this transient, conditional “niche” for circulating SPCs in injured (hypoxic) tissues will be conducive to healing. Using adenoviral gene transfer to over-express SDF-1 α on BM-derived cells, it was found that increased cell homing occurred only in the setting of cardiac injury³¹⁷. In addition, local expression of CXCL12 resulted in improved cardiac function, mediated by greater SPC homing^{318, 319}.

Platelet-Derived Growth Factor (PDGF-BB): The PDGF family is comprised of four genes [PDGF: A-D] and is expressed in numerous other cell populations under physiological and pathological states³²⁰⁻³²². Alterations of cardiac PDGFR levels expression have pointed to the importance of these receptors in cardiac homeostasis³²³. In particular, diminished production of PDGF-BB has been shown to occur in senescent hearts, translating into impaired angiogenic capacity and thus reparative potential³²⁴. Prior reports have investigated the cardioprotective effects of PDGF. Improvement in cardiac function was reported when PDGF was administered intra-myocardially at the time of cardiac injury³²⁵. PDGF pretreatment was found to restore angiogenic potential of aging hearts and to promote the commitment of BM-derived cells towards a cardiac lineage^{324, 326}. As part of a multiple paracrine factor paradigm, PDGF-BB (over-expressed concomitantly with either bFGF or VEGF) resulted in greater angiogenesis^{327, 328}.

Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF): Non-VEGF pro-angiogenic agents have been identified such as bFGF, which have been described to have an autocrine action on endothelial cells³²⁹. Experimental and preliminary clinical gene therapy-based studies have shown promising results³³⁰. However, subsequent clinical trials using adenoviral-based gene transfer (AGENT-3 and AGENT-4) have not lead to clinically significant improvement in symptomatic chronic angina patients deemed unsuitable for either angioplasty or surgical revascularization³³¹. However, using a clinically relevant swine model of infarction, Lu et al. recently provided a possible explanation for this lack of effect. The authors reported on the synergistic action of bFGF co-administered with PDGF by slow-release polymer made of sucrose aluminum octosulfate and hydon possessing heparin-binding activity. New vessel growth (angiogenesis) as well as remodeling and stabilizing of existing collaterals (arteriogenesis) were only improved by the combination of growth factors. Angiographic analysis of collaterals was improved when the two growth factors were administered concomitantly as well as LV contractility³³². Padua et al. first alluded to a role of bFGF in cardiac repair by using an experimental model isoproterenol-induced cardiac injury³³³. These authors found that increased bFGF was documented in the infarct border zone, postulating that this promoted SPC migration and proliferation. Other investigators have documented cardioprotective effects via direct effects on cardiomyocyte proliferation or as an adjunct to CCT to improve transplanted cell survival^{334, 335}.

Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1): Three growth-related hormones comprise the

insulin-like growth factor family: insulin, IGF-1 and IGF-2. Since its discovery, the IGF family has been shown to participate in embryogenesis and modulate the function of practically all organs^{336, 337}. Functional IGF-I receptors are required for the cell to progress through the cell cycle, and thus it has been linked with oncogenesis³³⁸. Among the pleiotropic actions of IGF-I, mitogenic and anti-apoptotic effects has been reported in the setting of SC-related neural regeneration³³⁹⁻³⁴¹. As discussed earlier, one of the potential paracrine effect of CCT might be mediated by enhancing an innate regenerative potential of the adult heart by activation resident cardiac SPCs³⁴². Cardiomyocytes and endogenous cardiac SC have been documented to express receptors to IGF-1 and can thus become activated/recruited by ligand activation of the putative receptor. In combination with HGF, IGF-1 was found to lead to improve survival of activated cardiac SPCs after their translocation from local niches, which translated in reduced infarct size and improve ventricular function³⁴².

Transforming Growth Factor (TGF- β): From epithelial, endothelial, hematopoietic, neuronal to connective-tissue, cells have been documented with receptors to TGF- β as well as the ability to produce it³⁴³. This family of polypeptides is implicated in fibrotic processes in numerous organs (liver, lung, kidney and heart), the pathogenesis of atherosclerosis, cancer and hemorrhagic telangiectasia³⁴⁴. TGF- β contributes to vasculogenesis, based on its pivotal role in embryogenesis^{345, 346} and tumor growth³⁴⁷. TGF- β -knockout mice studies have reported the predominant role of this cytokine in cardiomorphogenesis, with defects in valve differentiation, failure of myocardialization of the primitive atrial septum and anomalies of the ventricular outflow tract³⁴⁸. It also

modulates vascular endothelium by balancing endothelial cell migration and proliferation³⁴⁹. The first evidence of a cardiac paracrine activity came from overstretched Langerhans heart models, which reported increased levels of TGF- β as the signaling factor responsible for VEGF increased mRNA levels³⁵⁰. Subsequently, Li et al. provided experimental data on the importance for TGF- β in CCT by preconditioning CD117+ BMMNCs with TGF before delivery in the setting myocardial infarction. No difference in capillary density was found between wild-type BMMNC relative to preconditioned ones. However, in the latter group, there was evidence of newly generated myocardium, reduced scarring (fibrosis) and improved ventricular function, compared to both control and wild-type BMMNCs³⁵¹.

Perspective & Future Directions

While preclinical reports convincingly argue the case for a pivotal role of the paracrine effect in CCT, there are only scarce human data on this phenomenon. Likely interspecies differences in paracrine secretion notwithstanding, clinical application of SPC has been largely based on animal models that do not always take into account the effects of senescence and co-morbidity on SPCs³⁵². Moreover, impaired proliferation and/or migratory ability of circulating progenitor cells are known to occur depending on myocardial function³⁵³. Thus, along with considerations regarding cell-processing protocols³⁵⁴, investigators should also pay attention to cardiovascular status of patients when judging SPC number, function and, ultimately, their success as a therapeutic tool. There is a paucity of data comparing the “paracrine potential” of SPC from patients

presenting with either AMI or in CHF. Thus, from a clinical perspective and due to the nature of autologous cell injection, it is important to not only appreciate the role of paracrine effects but also of how this will be altered by the patient cardiac state.

The finding that current CCT has not yet managed to fulfill the promise of cardiac regeneration, at least to such a level that is sustainable and clinically significant, should not herald the end of this promising field. Understanding mechanisms, such as the paracrine effect of SPCs, has allowed clinicians and scientists to better appreciate current limitations and devise new, innovative approaches. As pointed out by Seegers and Lee, protein-based therapy may represent a new option to exploit reparative effects of SPC-secreted factors²³⁶. While prior attempts at protein-based therapies were disappointing (as was the case for VEGF), promising proteins, such as the cell cycle regulator Cyclin A2 or Periostin, may also prove to be novel agents to attain cardiac regeneration^{302, 355, 356}. Furthermore, coupling tissue-engineering technologies with patient-specific cardiac progenitor biology could lay the foundations for novel approaches in regenerative cardiovascular medicine³⁵⁷. Finally, several of the current limitations born from the initial attempts of cardiac cell therapy might be best addressed by combining knowledge from other fields such as bioengineering to exploit and modify nano-biomaterials improve such as retention, self-renewal, proliferation and migration³⁵⁸.

CONCLUSION

Cardiac cell therapy holds tremendous potential. While there remain numerous unresolved issues, greater knowledge of intrinsic mechanisms will only help improve clinical translation and application. The paracrine effect of transplanted SPCs represents a pivotal and a unifying phenomenon to explain similar treatment effects from different cell donor source. Transplanted progenitor cells could provide the software and the indirect/paracrine support to help maintain the ongoing efforts deployed to trigger stem/progenitor cells to eventually expand and replace damaged tissues. Further research is needed to better exploit its potential for cardiac repair.

Acknowledgements

This work was supported by funding from *Fonds de Recherche en Santé du Québec*; Heart and Stroke Foundation of Quebec and the Montreal Heart Institute Foundation (H.Q.L.; L.P.P., S.M.).

CONFLICT OF INTEREST

None to declare

Chapitre 5 : Manuscrit #3

5.1 Avant-propos au Manuscrit #3

Ce manuscrit est le troisième texte présenté pour l'obtention du grade postulé. Ce manuscrit est néanmoins le premier traitant spécifiquement des effets potentiels de la thérapie cellulaire sur la préservation et la récupération du myocarde après un événement ischémique aigu. Peu de modèles translationnels chez le gros animal permettent d'analyser ce mode d'action de la thérapie cellulaire. Dans ce travail de recherche, le candidat cerne donc principalement les bénéfiques potentiels induits par les actions paracrines précoces des CSM, et ce, à l'aide d'un modèle animal d'infarctus aigu du myocarde. L'effet paracrine de la thérapie cellulaire et son rôle potentiel dans l'application de nouvelles voies de traitement sont analysés en observant à 7 jours les effets de l'injection intracoronaire de milieu de culture cellulaire conditionné suivant une lésion ischémique aiguë. Ce manuscrit est accepté pour publication dans le « *Journal of Cardiovascular and Translational Research* ».

Improved function and myocardial repair of infarcted heart by intracoronary injection of mesenchymal stem cell-derived growth factors

*Ba-Khoi Nguyen¹, *Simon Maltais², Louis P. Perrault², Jean-François Tanguay³, Jean-Claude Tardif³, Louis Mathieu Stevens^{1,4}, Mélanie Borie⁴, François Harel⁵, Samer Mansour^{4,6}, and Nicolas Noiseux^{1,4}

¹Cardiac Surgery, Montreal University Hospital Centre (CHUM), Montreal, Quebec, Canada; ²Cardiac surgery, Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada; ³Cardiology, Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada; ⁴CHUM Research Center (CRCHUM), Montréal, Québec, Canada; ⁵Nuclear medicine, Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada; ⁶Cardiology, CHUM, Montreal, Quebec, Canada.

Short title: Stem cells-derived factors for ischemic myocardium

Word count: 6591

Corresponding author. Dr. Nicolas Noiseux, CHUM Hôtel-Dieu de Montréal, 3840 Saint-Urbain, Montréal (Québec), Canada, H2W 1T8. Tel.: (514) 890-8131; Fax: (514) 412-7231.

***Co-authors : see appendices section for justifications**

SUMMARY

Introduction: Transplantation of mesenchymal stem cells (MSC) improves repair and function recovery following myocardial infarct (MI), but underlying mechanisms remain to be elucidated. We hypothesize that MSC could achieve protection by paracrine effects through released mediators rather than direct cardiac regeneration. We sought to characterize the effects of MSC-secreted growth factors on extent of early recovery from MI.

Methods: Swine subjected to acute MI by temporary balloon occlusion of the left anterior descending coronary artery using percutaneous techniques received intracoronary injection of either concentrated MSC-derived growth factors, or control medium. Animals were sacrificed at 7 days to evaluate early effects.

Results: Treatment with MSC-derived factors significantly reduced cardiac troponin-T elevation, and improved echocardiographic parameters including fractional area shortening, stroke volume, cardiac output and wall motion score index. Quantitative evaluation of fibrosis by Verhoff staining revealed a reduction of the fibrotic area in the infarcted zone. Similarly, Masson's trichrome staining revealed reduced myocardial damage as demonstrated by areas of relatively preserved myocardium in the infarcted area. TUNEL assay demonstrated less cardiomyocyte apoptosis. Protein array detected the presence of angiogenic (VEGF, Endothelin, Epiregulin), anti-apoptotic (Galectin-3, Smad-5, sRFP-1 and -4) and anti-remodelling factors (TIMPs). RT-PCR confirmed the expression of these factors.

Conclusions: In summary, a single intracoronary injection of concentrated biologically active factors secreted by MSC could achieve early protection of ischemic myocardium, improve cardiac repair and contractility. MSC-derived growth factors injection (rather than MSC themselves) should be evaluated as a novel therapy to treat ischemic heart disease, avoiding many practical and technical issues of cell therapy.

Key words: Cardiac function, cellular therapy, growth factors, myocardial ischemia, Stem cells.

INTRODUCTION

Despite improvements in survival rates following myocardial infarction (MI), reduction in cardiac function attributable to irreversible loss of viable myocytes remains a major clinical problem³⁵⁹. Stem cell transplantation is a potential approach to repopulate injured myocardium,³⁶⁰ to treat heart failure^{360, 361} and restore cardiac function³⁶². Many cell types have been successfully engrafted into the injured myocardium and have been shown to have a favorable impact on structural and functional repair. However, the exact mechanisms underlying these beneficial effects remain to be elucidated.

Experimental data suggests that bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSC) can repair infarcted myocardium^{360, 363-365}. These cells are capable of both inducing myogenesis and promote angiogenesis, ultimately leading to improvement of cardiac contractility and function^{360, 362-364}. We previously demonstrated that intramyocardial injection of MSC into rat and mice ischemic hearts improved cardiac healing and function as early as three days after MI^{222, 281}. Such an early recovery could not be explained by direct de novo myogenesis, cellular fusion or differentiation, suggesting alternate mechanisms²⁸¹. MSC are known to secrete a wide spectrum of biologically active factors that can be found in the MSC-conditioned culture medium (MSC-CM)^{223, 279, 366}. Under hypoxic culture conditions, such as those found in ischemic myocardium, the expression of several cytokines is significantly up regulated^{212, 279, 282, 366}. We and others have shown that injection of MSC-derived factors (MSC-CM) from

hypoxic or serum starvation cultured MSC either directly into infarcted hearts^{222, 280}, by intramuscular injections³⁶⁷ or by intraperitoneal injections³⁶⁶ improves ventricular function in small animals myocardial infarction models.

Therefore, we hypothesize that paracrine mechanisms mediated by biologically active factors secreted by MSC could be responsible for their beneficial effects. The objective of the current study is to characterize the early effects of a single intracoronary injection of MSC-derived growth factors on functional recovery and myocardial repair in a swine model of MI using percutaneous techniques under fluoroscopic guidance. This convenient large animal model reproduces the clinical settings of an acute MI with PCI used for revascularization, and this study presents a novel application of stem cell therapy.

METHODS

MSC isolation and characterization

Swine MSC were isolated from bone marrow iliac crest aspirates and expanded as previously described^{281, 364}. Immunophenotyping was performed by multiparameter flow cytometry (FACScan®; Becton Dickinson; Mountain View, CA, USA) with monoclonal antibodies directed against human antigens (Coulter Immunology, Hialeah, FL, USA)^{368,}

Preparation of MSC-derived growth factors from hypoxic MSC-conditioned medium

To stimulate growth factor secretion,^{222, 280, 282} swine allogenic MSC were cultured under artificial hypoxic atmosphere (<1% oxygen) consisting of 5% CO₂ balanced with nitrogen in serum-free medium. For each animal, MSC-derived growth factors contained in the supernatant of cultured MSC were obtained from 12 confluent (4-6th passage, >90% MSC confluence) 10 cm² plates of MSC exposed to hypoxia for 16 hours. MSC-CM was collected, centrifuged to eliminate cells debris, filtered and proteins were concentrated using the Amicon centrifugal filters (Millipore, Bedford MA, USA). Control animals were injected with serum-free medium prepared in similar hypoxic conditions and concentrated (control-CM).

Animal preparation and coronary occlusion

Landrace pigs (30 to 35 kg) were obtained from Primiporc (St-Gabriel-de-Brandon, Quebec, Canada). The Animal Experimentation Committee of the Montreal Heart Institute (Montreal, Canada) approved this protocol. Animals were anesthetized with sodium pentobarbital (30 mg/kg) and mechanically ventilated (Harvard Apparatus, South Natick, MA) according to our standard protocol³⁷⁰.

A 7-Fr central jugular venous access (Arrow International, Erding, Germany) was installed for repeated blood sampling. Arterial blood pressure was continuously

monitored and recorded. A balloon-catheter (Gemini, ACF Guidant California, 3-3.5 mm) was inserted into the left femoral artery and positioned in the left anterior descending (LAD) coronary artery distal to the first diagonal branch. Following heparinization (10 U/kg), the balloon-catheter was inflated under angiographic guidance to a pressure sufficient to achieve complete coronary occlusion for 60 minutes³⁶⁴. Complete coronary occlusion by the balloon-catheter was regularly verified by angiographic visualization using contrast injection and fluoroscopy³⁷¹. MI was confirmed with continuous electrocardiogram (EKG) recording showing typical persistent ST segment elevation. Following balloon-catheter deflation and a 30-minute reperfusion period, 10 ml of control-CM or MSC-derived factors were injected using an intracoronary infusion catheter (Remedy, Boston Scientific, 3 to 3.5 mm). Blood samples for cardiac troponin-T (cTnT) serum measurement (Montreal Heart Institute, clinical biochemistry laboratory) were drawn at baseline, and after different time points following CM injection. Animals were randomly assigned to the treatment group, and technicians were blinded to the treatment during MI procedure.

Myocardial function assessment by echocardiography

A trained operator blinded to the assigned treatment performed transthoracic echocardiographic studies at baseline (before MI) and one week following MI using a M3S probe (2.0 ~ 4.3 Megahertz) and a Vivid 7 Dimension system (GE Healthcare Ultrasound, Horten, Norway). A left ventricular (LV) short-axis view at the papillary muscle level was recorded. LV areas at both end-diastole (EDA) and end-systole (ESA)

were measured. LV fractional area shortening (FAS) representing global LV function was calculated as $(EDA - ESA) / EDA \times 100\%$. LV outflow tract (LVOT) dimension (D) was measured in zoomed parasternal long axis view, LVOT cross sectional area (CSA) was calculated by $CSA = \pi(D/2)^2$. In the apical 5-chamber view, velocity time integral of trans LVOT flow (VTI) and heart rate (HR) were obtained with pulsed-wave Doppler sampled proximal to the aortic valve. Cardiac output (CO) was calculated as $CO = CSA \times VTI \times HR$. The average of three consecutive cardiac cycles was used for each measurement.

Histological evaluation of infarction and apoptosis

Animals were sacrificed at 7 days to assess early effects on myocardial repair. Heart sections at the levels of the LV papillary muscles were separated into four zone by visual inspection of the infarct and localization of the LAD; A and C as the transition-infarcted border zones, B as the infarcted antero/septal zone (between A and C), and D as the remote non-infarcted zone or LV free wall. Heart tissue was fixed, mounted in paraffin, and cut in 5 μm sections. Quantitative evaluation of fibrosis was performed by planimetry using Verhoff staining on digitalized images (average of 10 random fields) using automated computer Macintosh ImageJ software v1.38X (NIH, USA), with pre-established and fixed calibration setup. Fibrotic area is presented as the percent (%) of fibrosis (pink staining) over the total area.

Whole heart tissues sections stained with Masson's trichrome were scanned using the slide scanner Super Coolscan 5000 ED (Nikon, USA), and the digitalized pictures were analyzed by planimetry with pre-established and fixed calibration setup. All non-red area, representing nonviable tissue with collagen deposition, fibrosis, necrotic and granulation tissues were subtracted from total surface area occupied by heart section to represent the viable area for each section expressed as ratio (%) as described³⁷².

Cardiomyocyte apoptosis was characterized by TUNEL staining according to the manufacturer's recommendations (www.millipore.com). To describe the extent of apoptosis, we used a semi-quantitative scoring system with modifications.³⁷³ Apoptosis was scored on a scale of 1 to 4 by two observers blinded to the treatment regimen, as follows: grade 1, no TUNEL(+) cells or minimal (<10%); grade 2, slight or few TUNEL(+) cells (<30%); grade 3, moderate TUNEL(+) cells (30% to 75%); grade 4 severe or marked number of TUNEL(+) cells (>75%). Scores were averaged from each tissue section divided into 9 quadrants, from every heart zones in each animal.

Characterization and validation of MSC-derived growth factors

Protein concentration in the conditioned medium (concentrated and non-concentrated) was evaluated by the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, USA). Characterization of MSC-derived factors in MSC-CM was assessed using the RayBio Biotin label-based Human Antibody Array I (RayBiotech, USA). Relative concentration

of each factor was evaluated using the dedicated software from RayBiotech on the membrane containing internal controls for reference. VEGF was quantified with the VEGF quantikine ELISA kit (R&D Systems, USA). Expression of selected genes by MSC was validated by semi-quantitative RT-PCR. RNA was extracted using TRIzol and reverse-transcribed to cDNA using MML-V polymerase, then amplified with Taq polymerase (www.invitrogen.com). The 18S gene was used as the endogenous control. Sequences of the primers used are provided in supplementary data. The PCR conditions were 95°C for 2 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 20 s, 72°C for 30s, and final extension at 72°C for 5 min.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard deviation for continuous variables and analyzed using Student's t-test. Categorical variables are expressed as a number (percentage) and compared using χ^2 test or Fishers' exact test, as appropriate.

A hierarchical model was used to evaluate group difference in percent of fibrosis. This model accounts for the correlation between the multiples measurements in the same animal. The effect was analyzed at the level of the animal. A fully parameterized hierarchical model was built including a coefficient for each section for each group (the MIXED procedure in SAS software, version 9.1; SAS Institute, Cary, NC). The overall effect of "group" and "zone A to D" was assessed and comparisons were made between

the two groups for specific zone. From the model, group comparisons were also made for the average fibrosis percentage for the zone A, B and C.

In order to compare group apoptosis score, grading results (grade 1 to grade 4) were summarized in a four by two table (i.e. number or percentage of quadrants with grade 1, 2, 3 or 4). Group differences were compared using a χ^2 test. Weights were used in the model to obtain the average apoptosis score for the two observers.

We investigated earlier (3 days) and prolonged effects (28 days) of MSC-derived growth factors on cardiac function. In a parallel pilot study, five animals were treated in each group as above; animals were sacrificed at 3 days after echocardiography (n=2/group), and the remaining at 28 days (n=3/group). Fully parameterized longitudinal mixed effect models were built for echocardiographic measurements, including a coefficient for each point in time for each group (the MIXED procedure). These models account for the correlation between repeated measurements in the same animal. For all analyses, $p < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

Characterization of MSC

Swine MSC did not express hematopoietic markers including CD11b, CD14 and CD45, but were positive for MSC markers CD44 and CD90 (Table VIII). Results were comparable to those obtained with human MSC. MSC are very resistant to hypoxic culture condition and serum starvation³⁶⁵. Using trypan blue staining we observed that about 90% of the cells survived more than 48-h cultivation in these conditions, and there was no difference between cells subjected to hypoxia or normoxia, with or without serum³⁶⁶.

Model of acute MI and evaluation of myocardial damage

In this study, 18 pigs underwent experimental MI. As proven angiographically, complete occlusion of the LAD was achieved in all pigs with the balloon-catheter, along with successful reperfusion after balloon deflation. All pigs had significant ST-segment elevation on continuous EKG, confirming myocardial infarction. The mortality rate was 28%: severe arrhythmias were responsible for the early loss of 3 animals during myocardial ischemia. Two other animals died in the MSC-CM group: one on day#1 due to cardiac failure, and the other on day#3 when put under general anesthesia for echocardiography. There were 7 surviving animals in the MSC-CM group, and 6 in the control group.

Despite the presence of many potent vasoactive factors found in the MSC-CM, no significant changes in hemodynamics were observed in the immediate period after MSC-derived factors injection. Blood pressure (systolic, diastolic and mean) and heart rate were not different in the control group and the MSC-CM treated animals at all time points, including after CM injection and sacrifice (data not shown). Serum cardiac Troponin T were $<0.01 \mu\text{g/L}$ for all animals before MI (baseline level). Treatment with MSC-derived growth factors significantly reduced early troponin T elevation at 60 minutes after CM injection, but levels were not significantly different at 24 and 48 hours post-MI, (Figure 10).

Evaluation of myocardial function by echocardiography

Echocardiographic values at seven days were compared to baseline (before MI, each animal being its own control), and presented as percentage of change (Figure 11). Myocardial infarct was associated with a reduction in contractility, which was significantly worst in the control group ($P=0.013$) when looking at FAS, suggesting a favorable effects on the ischemic myocardium by the MSC-derived factors. Similarly the left ventricular ejection fraction (LVEF) decreased in both groups after MI, but the group difference was not significant ($P=0.138$). Stroke volume (SV) and cardiac output (CO) improved with MSC-derived factors treatment, as opposed to a significant reduction in control animals (p values of 0.013 and 0.024 respectively). The deterioration in wall motion score index (WMSI) was significantly worst in the control group ($P=0.043$). Left

ventricular end-systolic volume (LVESv) was 58.5 ± 2.2 ml in the control group compared to 54.3 ± 1.1 ml in MSC-CM ($P=0.095$). Likewise, left ventricular end-diastolic volume (LVEDv) was 108.6 ± 8.3 ml in the control group compared to 101.4 ± 9.6 ml in MSC-CM group ($P=0.443$), see Table IX. Heart rate and blood pressure did not change over time, and differences were not significant between groups (data not shown).

Similarly to early beneficial effects observed at 7 days, animals treated with MSC-derived factors demonstrated a better cardiac function represented by WMSI ($P<0.001$) and LVEF ($P=0.073$) compared to controls (Table IX). Moreover, treatment with MSC-derived factors demonstrated favorable effects at 28 days on remodeling and prevention of cardiac dilatation post-MI. Indeed, animals in control group showed larger LV cardiac cavities compared to MSC-CM treated animals at 28 days with LVES of 89.9 ± 9.7 ml vs 42.3 ± 6.2 ml ($P<0.001$) and LVED of 150.7 ± 5.1 ml and 101.4 ± 9.6 ml ($P<0.001$) respectively (Table IX).

Histological analysis for fibrosis, myocardial damage and cell death

Treatment with MSC-derived factors significantly reduced collagen deposition and fibrosis in the infarcted border zone A and C, but not in the infarcted area B (Figure 12). When combining all infarcted zones A+B+C, the area occupied by fibrotic tissue was smaller in the MSC-CM group compared to controls.

Qualitative histological analysis suggested a different pattern of myocardial injury with reduced myocardial damage in the MSC-CM group as demonstrated by areas of relatively preserved myocardium in the border and infarcted areas (Figure 13). Quantitatively, planimetric analysis demonstrated a significantly smaller area of viable tissues in the infarcted area of control animals (Figure 13).

Treatment with MSC-derived factors significantly decreased the number of TUNEL-positive cardiomyocytes in the infarcted zone B, and a trend toward reduction of apoptosis was observed in zone A (Table X). When combining all infarcted zones A+B+C, the TUNEL scores in these regions were significantly smaller in the MSC-CM group.

Characterization of MSC-derived factors in conditioned medium

Protein concentration in MSC-CM (n=8, unconcentrated medium collected from cultured MSC) was $230.6 \pm 96.7 \mu\text{g/ml}$, compared to $0.22 \pm 0.7 \mu\text{g/ml}$ ($P < 0.001$) in α -MEM culture medium alone (n=8, control medium, no FBS serum, no cells). In the samples injected in our study and concentrated using the Amicon filters, total protein concentration in the MSC-CM was increased to $519.9 \pm 617.7 \mu\text{g/ml}$ (n=4) compared to $1.3 \pm 1.2 \mu\text{g/ml}$ in control CM (n=6, control medium, no FBS serum, no MSC, $p < 0.05$).

We used the RayBio® human protein array to characterize the growth factors secreted by MSC. Many factors, including epiregulin, endotheline, fibroblast growth

factor-16, IL-1 α , secreted frizzled related protein-1 and -4 (sFRP-1 and -4), tissue inhibitor of matrix metalloprotease-2 (TIMP-2), and VEGF, were detected in the supernatants of swine MSC (Table XI). Results obtained using human MSC were similar for these factors. Quantitative measurement by VEGF ELISA validated the secretion of VEGF by the swine MSC, and showed a significant increase when swine MSC were cultured under hypoxic conditions (Figure 14). Moreover, VEGF concentration in MSC-CM from injected animals (n=4) was very high 1326.4 to 9854.2 pg/ml (mean 3798 \pm 4052).

Semiquantitative analysis of mRNA expression by RT-PCR confirmed the production of various factors by swine MSC. The expression of interesting genes including angiogenic factors (epiregulin, endothelin), anti-apoptotic factors (sFRP-1) and anti-remodeling factors (TIMP-1, TIMP-2) were detected. These genes were also expressed by human MSC, (Figure 14).

DISCUSSION

The mechanism underpinning effects of MSC therapy appears to be far more complex than previously anticipated, but is certainly multifactorial³⁷⁴. It remains unclear whether the beneficial effect of this cell-based therapy is a direct consequence of the transplanted cells participating and integrating in a functional syncytium with the host myocardium, or alternatively if the transplanted cells improve cardiac function without directly contributing to systolic contraction³⁶⁰.

MSC transplantation may improve myocardial function recovery predominantly by facilitating endogenous repair mechanisms, rather than through direct regeneration. Therefore, it is speculated that implanted MSC could secrete bioactive factors which may stimulate angiogenesis,²⁷⁹ suppress apoptosis of cardiomyocytes,^{280, 366} increase efficiency of cardiomyocyte metabolism,³⁷⁵ improve inotropy of survival myocytes by affecting the activities of ion channels,³⁷⁶ or modulate interstitial matrix composition and remodeling³⁷⁷⁻³⁷⁹. Moreover, transplantation of MSC into ischemic heart may have beneficial effect on endogenous cardiac resident stem cells in a paracrine manner^{377, 380}.

We previously reported that intramyocardial injection of MSC into rat and mice ischemic hearts improved cardiac healing as early as 72 hours after MI, which is too early to be explained solely by direct myocardial regeneration from MSC^{222, 281}. Bioactive factors secreted by MSC and found in MSC-CM reduced apoptosis and triggered vigorous spontaneous contraction of isolated hypoxic adult rat cardiomyocytes

in vitro, suggesting the presence of cytoprotective and inotropic factors^{222, 280}. We observed that pre-stimulation of MSC by hypoxia improved the cytoprotective effects. Indeed, it has been reported that the expression of several growth factors is up regulated in hypoxic cultured MSC^{212, 279, 282, 366}. Therefore, using hypoxia-stimulated MSC, we previously demonstrated in a rat model of acute MI that direct intramyocardial injection of MSC-derived growth factors could improve cardiac function and protection,^{222, 280} providing strong evidences for paracrine hypothesis and indirect effects of MSC therapy.

Herein, in larger animals, we demonstrated that a single intracoronary injection of MSC-derived factors into ischemic myocardium resulted in significantly lower early troponin elevation, suggesting a reduction in tissue damage³⁸¹. Serum cardiac troponin T (cTnT) has been validated in laboratory animals as a biomarker of cardiac injury, and level increases in proportion to severity of cardiac injury³⁸². In the swine model of acute MI, the release of troponin is known to occur early following ischemic injury, and the critical time for measurements is within the first few hours.^{371, 383} We also measured troponin subsequently at 24 and 48h, but failed to unveil any differences between animal groups. It is conceivable that we missed important variation within the first 24h of ischemic injury. Alternatively it is possible that MSC-derived factors act as preconditioning factors on ischemic tissues, or by modulation of the reperfusion injury.

Microscopic analysis of myocardial infarct demonstrated a favorable healing process and remodeling with a reduction of the fibrosis and necrosis in animals treated with MSC-derived factors. It has been reported that apoptotic cell death contributes to

expansion of MI extent and progression of LV remodeling after MI. Accordingly, apoptosis is a key pathologic feature in acute MI and heart failure³⁸⁴. Understanding the mechanisms involved in the apoptotic cascade may be useful in better understanding of heart failure and its management. Anti-apoptotic treatments may be effective in the prevention and treatment of post-infarction remodeling and heart failure³⁸⁴.

Importantly, echocardiographic data demonstrated that early reduction in myocardial injury by MSC-derived factors had beneficial effects on myocardial contractile function as shown by significant preservation at 7 days of FAS, a significant improvement in stroke volume and cardiac output. Moreover, WMSI, used as a surrogate measure of LV function,³⁸⁵ was significantly improved in the MSC-CM group. These important findings cannot be attributed to a difference in heart rate between controls and MSC-CM-treated animals. Remarkably, the intracoronary injection of MSC-derived factors with potential vasoactive effects had no impact on blood pressure or hemodynamics. Inspired by our previous work on rodent, where we achieved significant myocardial repair and functional recovery after only 3 days following MSC or MSC-CM intracardiac injection^{222, 233, 280, 282, 386}, we investigated early myocardial repair in the swine at 7 days after MI. We are aware that this early time point may fail to uncover more significant improvements on global cardiac function due to the persisting stunning effects of the ischemic myocardium, the lack of recovery and remodeling, and other important cellular interactions such as neovascularization. Nevertheless, these early favorable effects on improved cardiac function were sustained up to 28 days, as shown in a parallel pilot study. MSC-derived factors treated animals demonstrated a significantly

better WMSI, and a trend toward improved LVEF (see supplementary data). More interestingly, we also observed a significant improvement in LV remodeling with reduction of LVES and LVED in the MSC-derived factors treated animals. Our findings correlate with several clinical trials where the favorable impact of bone marrow stem cells injection into ischemic heart was seen on the regional infarcted area, not of global LVEF by echocardiography^{228, 256, 387}.

Because acute myocardial ischemia and subacute microinfarction have been reported after intracoronary arterial cellular injection³⁸⁸, MSC were not injected in this study as controls^{364, 389}. Instead, MSC-derived growth factors and control-CM were injected once in our protocol, and immediately after MI, the results of several injections were not investigated. Optimal timing for injection has yet to be determined, but infusion of MSC-derived factors at time of PCI for reperfusion of acute MI is the most clinically efficient way for early myocardial protection and repair.

Consistent with previous work, results of the current study demonstrated the importance of mediators produced by hypoxia-stimulated MSC and the prospect to use MSC-derived factors to achieve protection and functional improvement of the ischemic myocardium^{222, 280, 282}. In accordance with previous reports, we identified a broad spectrum of factors secreted by MSC^{223, 279, 282, 366}. Some of these factors have been shown individually to have positive effects on experimental blood flow recovery, cardioprotection, cell proliferation, survival and anti-apoptosis^{186, 213, 223, 279, 366, 390, 391}. However, we do not know yet the functional role of each cytokine and growth factors,

and which play the most important in myocardial repair and function recovery³⁶⁶. TIMP-1 has been found by Singela *et al.*²²⁴ to be an important anti-apoptotic factor found in embryonic stem cells-conditioned medium. Recently, VEGF has been identified as a key therapeutic trophic factor in MSC-mediated cardiac repair by Zisa *et al.*³⁹². These authors, and others³⁶⁶ found a VEGF concentration of 40 to 225 picograms to be sufficient for *in vivo* cardioprotective effects. We injected animals with concentration of VEGF up to 9854 pg/ml. Of note, our experimental protocol relies on a single injection of concentrated MSC-derived factors, and we achieved injection of high amount of MSC-derived factors (final total protein concentration in the injectate of 143 to 1440 ug/ml). Other groups used repeated injection for myocardial repair (intra-peritoneal or intramuscular) because they injected un-concentrated MSC-CM^{366, 367}. We believe that the delivery of highly concentrated mixture of MSC-derived factors is superior to un-concentrated MSC-conditioned medium. We combined the medium from 12 petri dishes (10-cm diameter, about 5 to 6 ml of medium each) to prepare the CM to be injected for each swine, which represent growth factors produced by approximately 40 to 50 millions MSC cells, as reported by other investigators in similar model injecting MSC into swine ischemic heart³⁸⁹.

Herein, we postulated that first, MSC transplantation could be used for the treatment of ischemic heart disease and that secondly, important mechanisms mediating the beneficial effects of this cell-based therapy on cardiac function and repair may be an early effect through the release of biologically active and cytoprotective factors secreted by hypoxia-stimulated MSC. Because early reperfusion by PCI is the treatment of choice

in the clinical setting of an ongoing acute MI,³⁹³ we developed and used a reproducible large animal model that mimics acute MI and reperfusion in the human by means of PCI techniques. Using similar experimental protocol in the swine with 60 min LAD occlusion and reperfusion, Freyman and coworkers demonstrated a reproducible infarction affecting 20-30% of the LV³⁸⁹. The intracoronary route of administration of stem cells or growth factors has been demonstrated to be safe in clinical trial^{254, 394, 395}. To our knowledge, this is the first study to investigate the paracrine and indirect effects of stem cell therapy by percutaneous intracoronary injection of MSC-derived growth factors for the treatment of acute myocardial ischemia in a pre-clinical large animal model.

In conclusion, the present study was designed to characterize the early protective effects and functional improvement of the ischemic myocardium following a single intracoronary injection of MSC-derived factors in a pre-clinical experimental large animal model. It is interesting to speculate that MSC-derived growth factors injection could be used as a novel pharmacological therapy to treat ischemic heart diseases, rather than MSC themselves, thus avoiding many practical and technical issues regarding cell therapy. MSC-CM could be produced by an established cell line, and be readily available for any patient presenting with an acute myocardial infarct in the emergency room and undergoing acute PCI treatment for myocardial reperfusion. Moreover, combining stem cells and gene therapy, MSC could be cultured and genetically modified *ex vivo* to alter the expression of targeted cytokines, making these cells ideal to be used as “minipumps” to produce and release factors required for improving tissue repair, viability, contractility and blood flow.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge Dr. D.C. Roy (Hôpital Maisonneuve-Rosemont) for his contribution in flow cytometric analyses. We thank M.P. Mathieu, E. Reny-Nolin, S. Gilligan, P. Geoffroy and D. Lauzier for their precious help in this study, and Dr Yan Fen Shi for the echocardiographic analysis. Drs. Noiseux and Perrault are scholars of Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). Dr. Noiseux and Perrault are supported by the Heart and Stroke Foundation of Québec, and Department of Surgery, Université de Montréal. Dr Stevens is supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

7. DISCLOSURES

No conflict of interest to disclose.

TABLES**Table VIII. MSC surface markers**

Surface marker	Human MSC	Swine MSC	
	(%)	(%)	
hCD90	99.1	98.8	98.5
hCD44	97.8	47.0	13.7
hCD45	0.39	0.44	0.55
hCD14	neg	neg	neg
hCD117	neg	neg	neg
hCD11b	neg	0.07	0.22
hCD34	0.1	neg	0.07
hCD38	neg	neg	neg
hCD33	neg	0.19	0.21
hCD32	0.74	0.28	1.5

hCD10	22.7	2.09	0.4
hCD64	neg	neg	neg
hCD71	neg	neg	neg
hCD62L	neg	neg	neg

Monoclonal antibodies (mAbs) used in this study are directed against human cell surface markers (Coulter Immunology, Hialeah, FL). Immunofluorescence reactivity was determined by automated multi-parameter flow cytometry analyzing at least 10^4 cells in each sample (FACScan[®]; Becton Dickinson; Mountain View, CA, USA). We analyzed human MSC (5th passage) and swine MSC (4th passage, 2 different cell lines).

Table IX: Echocardiography data

		Baseline	3 days	7 days	28 days
		Controls n=11	Controls n=5	Controls n=6	Controls n=3
Groups		MSC-CM n=12	MSC-CM n=5	MSC-CM n=7	MSC-CM n=3
FAS (%)	Control-CM	45.9±1.9	35.2±1.5	30.6±2.4	33.2±2.6
	MSC-CM	48.0±2.0	37.6±3.1	38.2±1.8*	44.2±4.5*
LVEF (%)	Control-CM	59.5±2.1	42.3±1.3	45.9±3.5	41.0±4.4
	MSC-CM	58.6±1.9	47.0±3.2	49.0±2.2	59.4±3.4*
SV (ml)	Control-CM	39.5±2.0	37.8±2.2	33.2±3.1	51.0±6.2
	MSC-CM	34.8±2.9	35.5±4.2	34.8±2.4	45.2±3.0
CO (L/min)	Control-CM	4.50±0.34	3.95±0.44	3.14±0.34	5.08±0.95
	MSC-CM	4.02±0.42	3.76±0.52	3.72±0.42	4.99±0.253
WMSI	Control-CM	1.0±0.0	1.44±0.06	1.53±0.07	1.47±0.02
	MSC-CM	1.0±0.0	1.31±0.05	1.36±0.03*	1.13±0.05*
LVESv (ml)	Control-CM	33.5±2.5	58.0±2.8	58.5±2.2	89.9±9.7
	MSC-CM	31.3±1.6	48.2±3.0*	54.3±1.1	42.3±6.2*
LVEDv (ml)	Control-CM	77.3±3.7	100.8±3.7	108.6±8.3	150.7±5.1
	MSC-CM	76.6±2.2	90.6±2.4*	101.4±9.6	101.4±9.6*

Echocardiographic analysis up to 28 days. Results are presented as mean ± standard deviation obtained at baseline and at different time points after myocardial infarct and treatment. FAS: fractional area shortening; LVEF: left ventricular ejection fraction; SV: stroke volume; CO: cardiac output; WMSI: wall motion score index (1=normal); LVESv: left ventricular end-systolic volume; LVEDv: left ventricular end-diastolic volume; Control-CM: control conditioned medium; MSC-CM: MSC conditioned medium containing MSC-derived factors. Statistical analyses were made using longitudinal mixed effect models. * P<0.05 vs Control-CM.

Table X. Cardiomyocytes apoptosis by TUNEL labeling

	Minimal Grade 1	Slight Grade 2	Moderate Grade 3	Marked Grade 4	P value
LV zone A					
Control-CM	42.6%	14.8%	11.1%	31.5%	0.074
MSC-CM	56.9%	26.4%	9.7%	6.9%	
LV zone B					
Control-CM	42.6%	22.2%	20.4%	14.8%	0.008
MSC-CM	76.4%	19.4%	4.2%	0%	
LV zone C					
Control-CM	35.2%	11.1%	14.8%	38.9%	0.313
MSC-CM	40.3%	23.6%	16.7%	19.4%	
LV zones A+B+C					
Control-CM	40.1%	16.1%	15.4%	28.4%	0.002
MSC-CM	57.9%	23.2%	10.2%	8.8%	

Cardiomyocytes apoptosis was evaluated by semiquantitative scoring system from grade 1 to 4, on 9 quadrants from each tissue section. Results are presented as percentage of frequency. Zones A and C: peri-infarct border zones; Zone B: infarct zone. Control-CM: control conditioned medium; MSC-CM: MSC conditioned medium containing MSC-derived factors.

Table-XI: Detection of secreted factors by protein array.

Secreted factors	Swine MSC		Human MSC		Biological process description
	Normoxia	Hypoxia	Normoxia	Hypoxia	
Activin A	+	+/-	++	+	Cell proliferation, differentiation, apoptosis, immune response
Epiregulin	+++	+++	++	++	Remodeling
Endothelin	+++	+++	+++	+++	Cytoprotection, cell proliferation
FGF-16	+++	++	-	-	Cell proliferation
Frizzled-5	+	+	-	-	Cell migration
Frizzled-6	++	+	-	-	Cell migration
Galectin-3	+++	+++	-	-	Cytoprotection
Glypican-3	+++	++	++	++	Cell proliferation
IGFBP-7	++++	+++	+++	++++	Cytoprotection, cell migration, contractility
IL-1 alpha	++++	+++	-	-	VEGF induction
IL-7	++	++	-	-	Lymphocyte proliferation
IL-15 alpha	++	+	+	+/-	Immune response
IL-17E	++	+	-	-	Immune response
IL-27	+	+	-	-	Immune response
LRP-1	++	+	+	-	Cell migration
LRP-6	+++	++	+++	-	Cell migration
MMP-16	+	+	-	-	Loosens matrix, remodeling
NCAM-1	+	+	-	-	Cell adhesion
Osteoprotegerin	++++	++	+++	++++	Bone development
sFRP-1	+	+	-	-	Development, apoptosis
sFRP-4	+++	++	++	+++	Development, apoptosis
Smad4	+	+	++	+	Vessel maturation, cell proliferation
Smad5	+++	+++	-	-	Vessel maturation, cell proliferation
Smad7	++	++	+	+	Vessel maturation, cell proliferation
Thrombospondin-1	+++	+++	++	++++	Cell migration, apoptosis
TIMP-1	-	-	+++	++++	Cell migration, remodeling
TIMP-2	+++	++	+++	++++	Cell migration, remodeling
VEGF	++	+++	++	+++	Cytoprotection, proliferation, migration, angiogenesis

Characterization of secreted factors by swine and human MSC under normoxic or hypoxic culture conditions. Relative concentration is expressed from low (-) to very high (+++++).

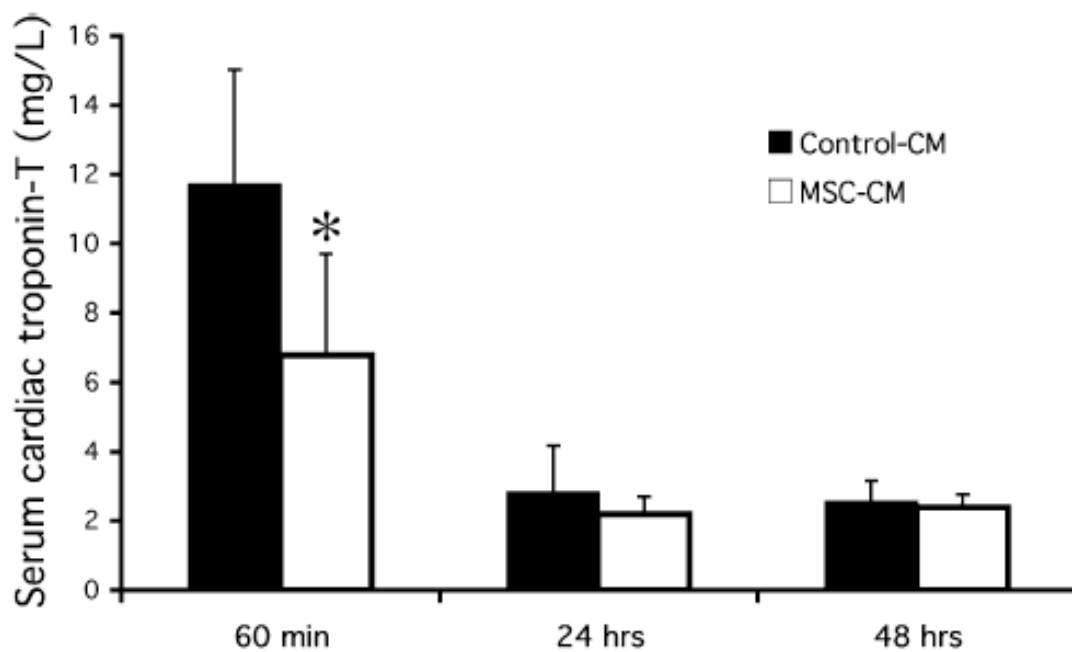
FIGURES**Figure 10.**

Figure 1. Serum cardiac Troponin T elevation at different time points. Troponin level was significantly higher in the control group (black bar) at 60 minutes after CM injection, compared to MSC-CM group (white bar). * $P < 0.05$ versus control.

Figure 11.

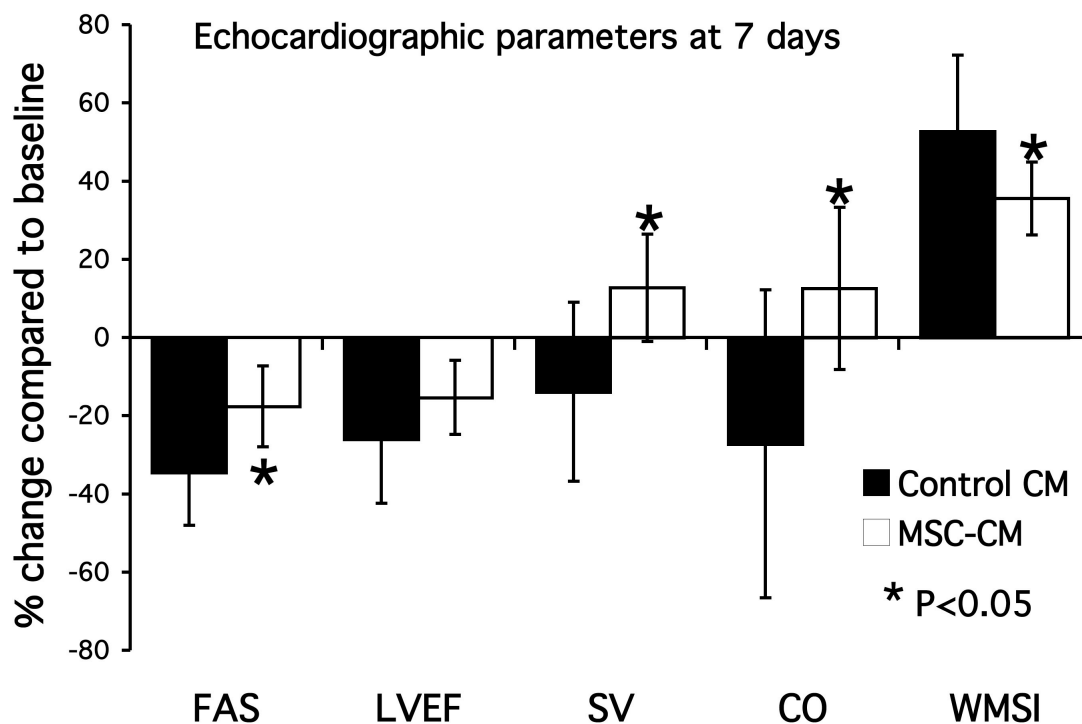


Figure 11. *Echocardiographic analysis at day 7 to evaluate early cardiac function recovery, results are presented as %change versus baseline.* LV function measured by FAS was significantly worse in the control group (n=6) compared to MSC-CM treated group (n=7), *P < 0.05. Similarly, MSC-CM treatment significantly improved stroke volume (SV), cardiac output (CO) and wall motion score index (WMSI).

Figure 12.

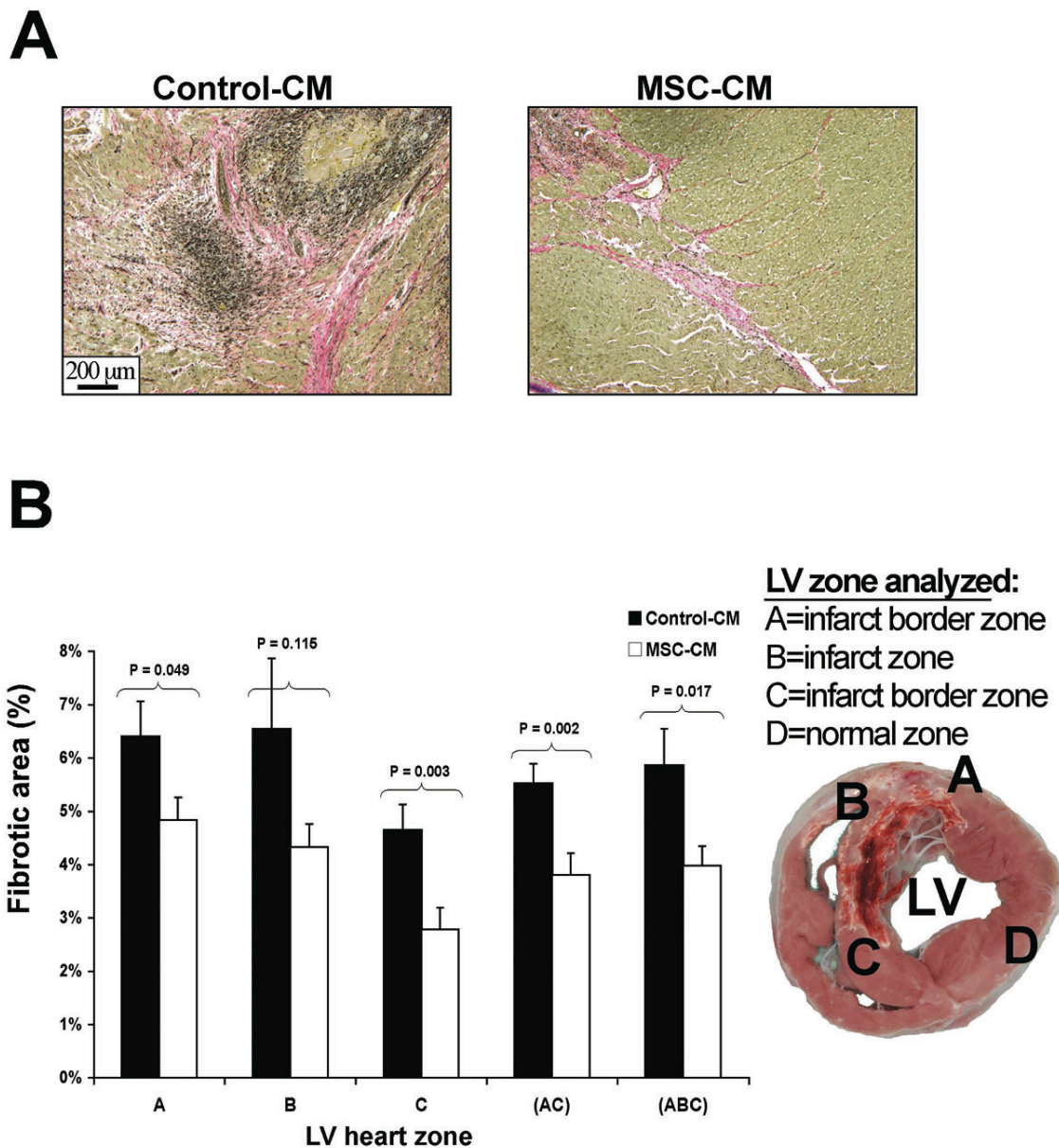


Figure-12: Quantitative evaluation of fibrosis by Verhoff staining of left ventricular (LV) sections at 7 days post-treatment. A: Representative tissue sections with fibrosis stained pink-red, original magnification 10X. B: Fibrotic area (%) represents the ratio of area occupied by fibrotic tissue over the entire area. LV heart zones examined are: A and C are infarct transition-border zones, B is the infarcted antero-septal zone. MSC-CM treatment significantly reduced the fibrotic area in the infarct border zones (A&C combined), and in the infarcted zone (A+B+C combined).

Figure 13.

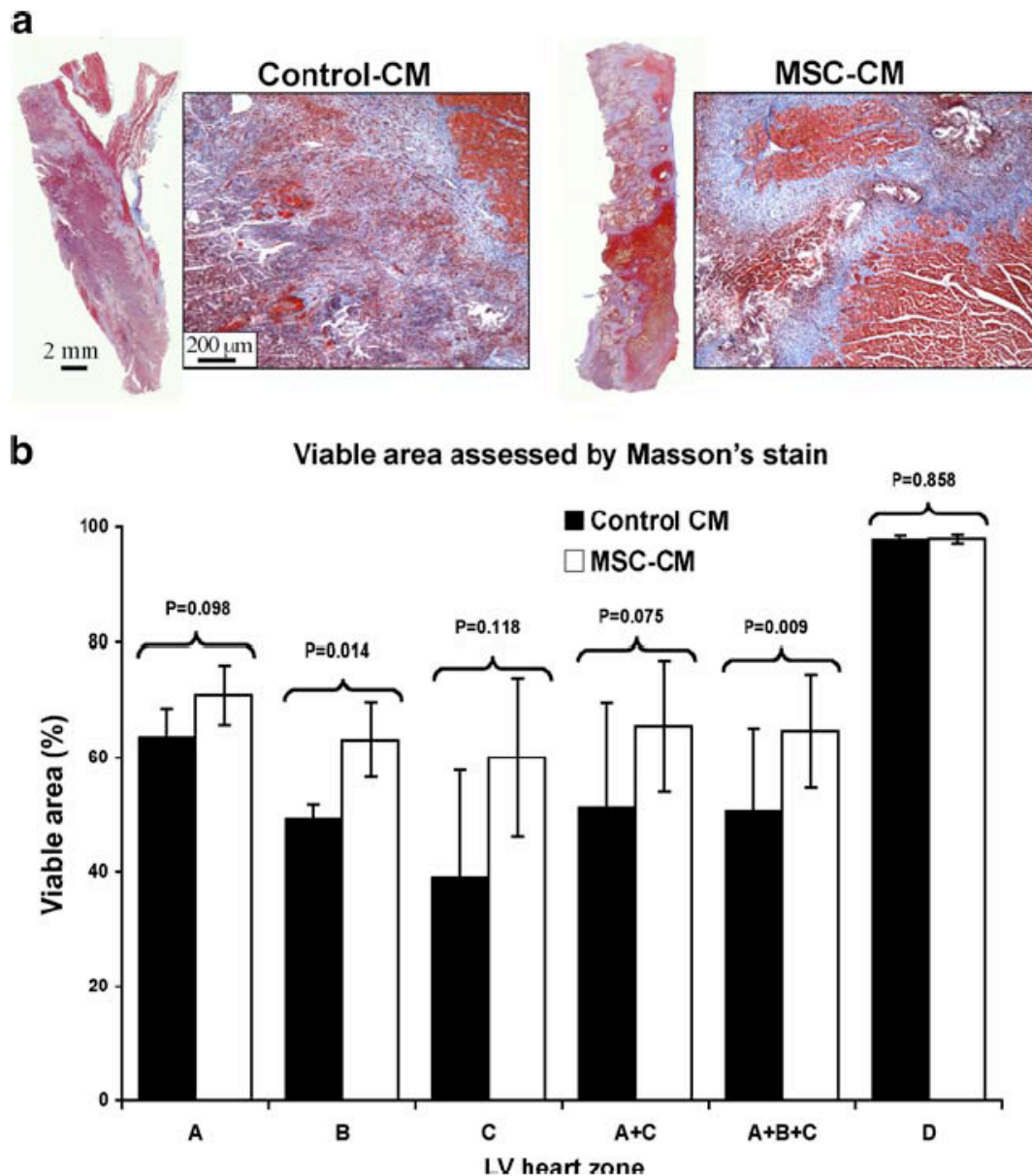


Figure 13. A: Masson's Trichrome staining at 7 days. Representative whole heart sections in the infarcted zone is presented on the left, as well as the higher magnifications (original 10X) in the black box. **B: Quantitative planimetric evaluation** revealed that MSC-CM significantly reduced non-viable tissue area (necrosis, fibrosis, collagen deposition) with less myocardial damage and a more favorable healing process in the infarcted zone B, and all infarcted LV zones combined (A+B+C). LV heart zones examined are: A and C are infarct transition-border zones, B is the infarcted zone, and D is the remote normal LV free wall.

Figure 14.

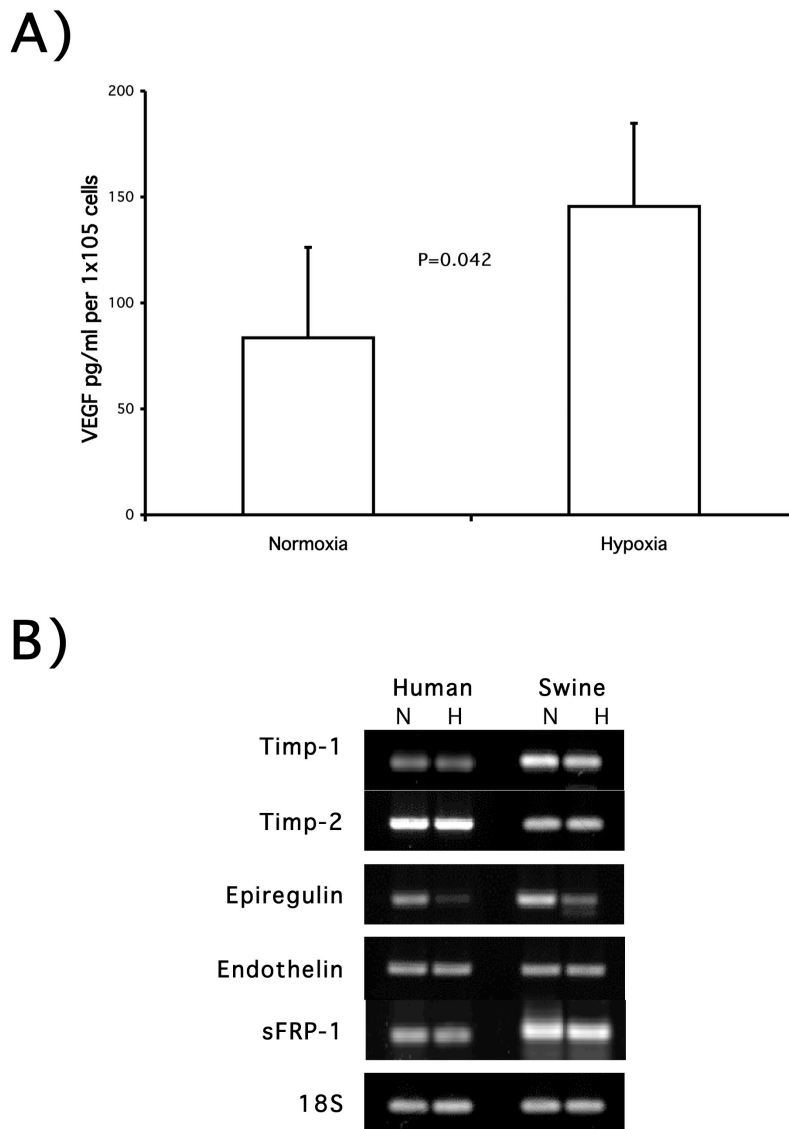


Figure 14. Detection of growth factors in the supernatants of cultured MSC. A: Quantitative measurement of VEGF by ELISA in swine MSC-CM. VEGF secretion is significantly increased when MSC are cultured in hypoxic conditions compared to normoxic conditions. VEGF concentration in the MSC supernatant was normalized by the number of MSC cells in the culture dish (1x10⁵ cells). B: Production of growth factors by human and swine MSC detected distinctly by RT-PCR, cultured under normoxia (N) or hypoxia (H).

Table XII Sequences of forward and reverse primers used for RT-PCR.

Human	Swine
TIMP-1 Foward: AATTCCGACCTCGTCATCAG Reverse: TTGGAACCCTTTATACATCTTGG PCR product 111 bp	TIMP-1 Foward: GCTGGACAACCTGTGGAACG Reverse: CACTGTGCATTTCCTCACAGC- PCR product 132 bp
TIMP-2 Foward : GCGGTCAGTGAGAAGGAAGTGG Reverse: CTTGCACTCGCAGCCCATCTG PCR product 321 bp	TIMP-2 Foward: TCAAGGGACCTGACAAGGAC Reverse: CAGAGCGTGATGTGCATCTT PCR product 145 bp
Epiregulin Foward: GCACAGCTTTAGTTCAGACAGAAG Reverse: CCCACTTCACACCTGCAGTA PCR product 148 bp	Epiregulin Foward: GCACAGCTTTAGTTCAGACAGAAG Reverse: CCCACTTCACACCTGCAGTA PCR product 148 bp
Endothelin Foward: AACACTCCCGAGCACGTT Reverse: AATGTCTTCAGCCCTGAGTTCT PCR product 180 bp	Endothelin Foward: GGTC AACACTCCAGAACACATT Reverse: GTCCCTGCCGATTTCTTTTC PCR product 181 bp
sFRP-1 Foward: CAAGCCCCAAGGCACAAC Reverse: CATCCTCAGTGCAAACCTCG PCR product 100 bp	sFRP-1 Foward: CCAGCGAGTTTGAGACCAC Reverse: AGCAGCAAGGCTTCTCCTC PCR product 213 bp
18S Foward: CATTGGAACGTCTGCCCTAT Reverse: GTTTCTCAGGCTCCCTCTCC PCR product 109 bp	18S Foward: CATTGGAACGTCTGCCCTAT Reverse: GTTTCTCAGGCTCCCTCTCC PCR product 109 bp

Echocardiographic analysis up to 28 days. A: Intracoronary injection of MSC-derived growth factors after acute MI had persistent favorable effects on cardiac function as revealed by a significantly improved wall motion score index (WMSI), used as an indicator of LV function and contractility ($P < 0.001$). B: Similarly, LVEF tended to be worst in the control group ($P = 0.072$). Number of animals: $n = 11$ & 12 at baseline, $n = 5$ at 3 days, $n = 6$ & 7 at 7 days, and $n = 3$ at 30 days for controls and MSC-CM respectively. Statistical analyses were made using longitudinal mixed effect models.

Chapitre 6 : Mécanismes cellulaires de réparation chronique

Dans cette dernière portion de la thèse, le candidat au doctorat en sciences biomédicales abordera le phénomène d'hibernation chronique du myocarde et les mécanismes potentiels qui sous-tendent la réparation cellulaire dans le contexte d'une pathologie cardiovasculaire ischémique chronique. Nous introduirons principalement le concept de l'axe cœur/MO. Dans ce chapitre, nous étudierons également le rôle spécifique des CEP dans la physiopathologie des maladies cardiovasculaires et leur implication dans la réparation chronique du myocarde et l'IC.

6.1 Hibernation du myocarde : définition

On définit l'hibernation chronique du myocarde comme un état provoqué par une diminution progressive de la perfusion coronarienne. La diminution progressive du flot coronarien produit un nouvel équilibre énergétique qui s'accompagne d'une diminution de la performance du myocarde (dysfonction ventriculaire). Cet environnement permet une préservation des réserves métaboliques du myocarde³⁹⁶. Dans cet état de préservation énergétique, seule la revascularisation (percutanée ou chirurgicale) amène un rétablissement potentiel de la fonction du VG. La récupération fonctionnelle du muscle cardiaque est ainsi expliquée par la viabilité des cardiomyocytes. Comme l'explique Rahimtoola³⁹⁶, on considère que l'hibernation myocardique est un mécanisme d'adaptation qui découle d'une diminution de l'apport énergétique. Le myocarde réduit sa fonction contractile pour réduire ses besoins métaboliques³⁹⁷. C'est pourquoi on considère souvent l'hibernation du myocarde comme un mécanisme protecteur qui limite les dommages ischémiques lorsque les apports en oxygène sont diminués³⁹⁸. L'hibernation se caractérise par l'association de cardiomyocytes normaux à d'autres myocytes atrophés et hypertrophiés. Il se produit une perte d'unités contractiles et une accumulation intracellulaire de glycoprotéines et de plages de fibrose intercellulaire avec une expression anormale de protéines fœtales, telles l' α -actinine, la titine et la cardiotine³⁹⁹. En microscopie électronique, on peut observer une perte des sarcomères, une détérioration et une fragmentation du réticulum sarcoplasmique, une perte des tubules T et un élargissement des espaces intercellulaires, remplis de débris cellulaires, de matrice extracellulaire, de macrophages et de fibroblastes⁴⁰⁰. On peut également retrouver

une diminution importante des protéines contractiles et des protéines associées au cytosquelette (actine, myosine, desmine, vinculine)⁴⁰¹. En somme, l'hibernation du myocarde est une forme de modification métabolique de la fonction ventriculaire qui se produit quand les apports métaboliques sont insuffisants, ce qui mène à l'apoptose. Au stade d'apoptose, ces troubles peuvent devenir irréversibles.

6.2 CEP, biomarqueurs de la pathologie cardiovasculaire

Au cours des dernières années, certains auteurs ont suggéré que les CEP étaient de bons marqueurs diagnostiques et pronostiques des maladies cardiovasculaires⁴⁰². La publication de Hill *et coll.* en 2003 a prouvé irréfutablement l'existence d'un lien entre le nombre de CEP, la fonction vasculaire et le risque d'athérosclérose⁴⁰³. Les facteurs de risque cardiovasculaire (diabète, tabac) contribuent à l'athérogenèse en induisant la dysfonction endothéliale, laquelle est peut-être contrôlée par les CEP. Le groupe de Hill a émis l'hypothèse qu'un nombre insuffisant de CEP pourrait être associé à une augmentation du risque d'événement cardiovasculaire. Ces auteurs ont montré une association importante entre le nombre de CEP et le score de Framingham⁴⁰³. Les patients qui présentaient le score de Framingham le plus élevé avaient une production réduite de CEP circulantes dérivées de la MO. De plus, l'âge avancé semblait représenter le facteur de risque le plus important de sénescence des CEP. On considère donc que la mesure des CEP en circulation représente un indice très fiable du risque cardiovasculaire. Des observations multiples renforcent cette constatation^{404, 405}. Chez 512 patients coronariens, Werner *et coll.* ont montré que des taux élevés de CEP CD34+ et KDR+ étaient associés à un risque réduit de mort de cause cardiaque, ainsi qu'à un besoin réduit de revascularisation et d'hospitalisation en cardiologie⁴⁰⁴. Des résultats similaires ont été rapportés par deux équipes indépendantes qui ont observé qu'un nombre réduit de CEP pouvait constituer un facteur de risque indépendant de mortalité et d'évolution de la maladie chez le patient atteint d'IC^{406, 407}.

De plus, chez des patients diabétiques, le recrutement des CEP est diminué à la fois à partir de la moelle et sur les sites vasculaires endommagés⁴⁰⁸. Par ailleurs, le nombre de CEP est dépendant de facteurs de risque tels que l'âge, l'activité physique et la consommation de tabac. Ainsi, chez des animaux, l'activité physique augmente le nombre de CEP de façon rapide et proportionnelle grâce à une production de NO et à un effet anti-apoptotique sur ces cellules⁴⁰⁹. De la même façon, le sevrage du tabac permet une augmentation significative de ces cellules dans le sang, alors que la reprise du tabagisme s'accompagne d'une baisse significative de CEP⁴¹⁰. Enfin, les statines augmentent significativement la mobilisation médullaire des progéniteurs endothéliaux et stimulent l'activité *in vitro* des CEP⁴¹¹. Ces observations suggèrent l'importance des CEP dans la physiopathologie et la prévention de la pathologie cardiovasculaire et démontrent qu'une modulation pharmacologique du nombre de CEP est possible. D'autres hypothèses récentes ont avancé que les facteurs de risque cardiovasculaire induisaient un épuisement fonctionnel des CEP et favorisaient l'apparition de la maladie coronarienne observée⁴¹². Les raisons qui permettent d'expliquer l'effet bénéfique d'un taux élevé de CEP dans la maladie cardiovasculaire restent obscures, mais des études en cours, jumelées aux modèles de recherche translationnelle, pourront apporter des réponses quant au lien entre les CEP et le développement progressif de la défaillance cardiaque.

6.3 Thérapie cellulaire et mécanismes de réparation chronique

La capacité de régénération endogène du myocarde est nettement insuffisante pour rétablir la fonction des cardiomyocytes après une insulte ischémique significative^{247, 413}. La découverte des cellules souches et des cellules progénitrices comme nouvelles thérapies pouvant aider à régénérer le réservoir actif des cardiomyocytes fonctionnels ou à favoriser la réparation du myocarde a engendré plusieurs hypothèses sur les modes d'action potentiels de ces traitements innovateurs⁴¹⁴. Les données cumulatives sur le sujet démontrent que l'action de la thérapie cellulaire est complexe et s'exerce à plusieurs niveaux^{164, 415}. Les mécanismes qui visent à freiner la perte de cardiomyocytes, à rétablir l'homéostasie cellulaire et moléculaire, à favoriser la cardiomyogenèse et la néovascularisation, à freiner l'activation des mécanismes de modification d'expression génique et protéiques néfastes, à rétablir la structure de la matrice extracellulaire, et à renverser les mécanismes d'adaptation négatifs qui accompagnent la surcharge hémodynamique suite à un infarctus du myocarde représentent tous des avenues intéressantes pour expliquer le rôle de la thérapie cellulaire¹⁶². Plusieurs hypothèses mécanistiques sont avancées pour expliquer l'effet bénéfique de la thérapie cellulaire en période chronique.

L'hypothèse première (telle qu'elle est décrite dans le chapitre précédent) est celle d'une limitation du remodelage ventriculaire, mécanisme de développement d'IC à plus ou moins long terme. La diminution du remodelage ventriculaire a été rapportée chez plusieurs types cellulaires injectés sur des modèles de cardiomyopathie ischémique ou dilatée²⁶⁵.

Le second mécanisme fait intervenir, tel que mentionné précédemment, une sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines par les cellules transplantées²²¹. Des médiateurs impliqués dans différents phénomènes de survie cellulaire sont libérés par les cellules dérivées de la MO. Ces cellules produisent un large éventail de facteurs anti-apoptotiques (Akt)²⁰⁷, d'angiogenèse (VEGF)⁴¹⁶ et « d'appel » des cellules circulantes vers les zones ischémiques (SDF-1)⁴¹⁷ (voir discussion sur l'effet paracrine des cellules souches dans le chapitre précédent). L'activation de ces voies de signalisation explique les effets angiogéniques des cellules transplantées. D'autres cibles que les vaisseaux sont également envisageables, telles la MEC, dont le remodelage pourrait ainsi être favorablement modifié. Globalement, les caractéristiques des milieux conditionnés récupérés après culture cellulaire (Manuscrit #3) renforcent fortement cette hypothèse paracrine.

Le troisième mécanisme impliquerait une régénération du myocarde. Les cellules transplantées auraient la capacité de se fusionner aux cellules du myocarde du receveur. Jusqu'à maintenant, très peu d'auteurs ont réussi à démontrer ce phénomène⁴¹⁸. Quelques études fondamentales ont proposé la fusion cellulaire par l'observation d'une combinaison cellulaire des marqueurs protéiques membranaires²⁵². Le matériel génétique des cellules transplantées pourrait ainsi compenser le matériel nucléaire détruit ou endommagé par l'environnement ischémique. Des études ont démontré que des cellules souches de la MO peuvent fusionner spontanément avec des cellules souches embryonnaires pour ensuite se différencier en plusieurs types cellulaires. La fusion peut

ainsi se produire quand des CS provenant de la MO s'incorporent aux cardiomyocytes du myocarde endommagé pour favoriser la formation d'unités contractiles²⁸¹.

Enfin, l'un des mécanismes les plus récemment identifiés est la mobilisation des cellules provenant de la MO : c'est ce qu'on appelle l'axe cœur-MO. La mobilisation de cellules souches provenant de la MO peut fournir un réservoir cellulaire capable de s'implanter dans le myocarde ischémique pour augmenter sa fonction. Ces cellules mobilisées de la MO peuvent favoriser la réparation du myocarde en subissant une transdifférenciation en cardiomyocytes, unités contractiles fonctionnelles²⁰⁸. On appelle ce phénomène le « stem cell homing-trafficking », c'est-à-dire le recrutement cellulaire pour l'implantation au niveau du myocarde^{7, 169, 286, 297}. En 2003, Deb *et coll.* ont été parmi les premiers à observer ce phénomène lorsqu'ils ont retrouvé des cardiomyocytes possédant le chromosome Y au niveau du cœur de femmes ayant subi une transplantation de MO provenant d'un homme⁴¹⁹. Tomita *et coll.* ont par la suite démontré que la transplantation de CSM prétraitées avec du 5-azacytidine dans un modèle de rat pouvait induire une différenciation des CSM en cardiomyocytes et une amélioration de la fonction du myocarde dans la zone cicatricielle injectée³⁶³. Les travaux innovateurs de Anversa *et coll.* ont aussi permis de déterminer que des CSH dérivées de la MO et injectées directement dans un IDM chez le rat pouvaient s'implanter dans le myocarde, se transdifférencier en cardiomyocytes et régénérer environ 68 % de la zone infarctée¹⁶⁹.

En 1998, Shi *et coll.* ont été parmi les premiers à décrire les CEP circulantes dérivées de la MO (voir description ci-dessus)¹⁷⁵. Les CEP dérivées de la MO ont alors

été caractérisées de « guerrières ischémiques », puisqu'elles ont été impliquées dans la physiopathologie de plusieurs processus de vasculogénèse et de néoangiogénèse en présence de phénomènes ischémiques¹⁸¹. Tepper *et coll.*, entre autres, ont démontré dans des études expérimentales que l'ischémie tissulaire jouait un rôle essentiel dans la cinétique de mobilisation des CEP provenant de la MO^{297, 366, 420, 421}.

6.4 Mécanismes de mobilisation des CEP provenant de la MO

Les mécanismes impliqués dans le recrutement des CEP (afin de se concentrer sur le type cellulaire à l'étude dans cette thèse de doctorat), et la cinétique des événements qui mènent à leur mobilisation en réponse à une insulte ischémique demeurent imprécis. Heissig *et coll.* ont émis l'hypothèse que ce processus était amorcé, entre autres, par l'activation de la métalloprotéinase MMP-9, une protéine liée à la matrice extracellulaire qui, une fois activée, transformait le ligand Kit lié à la surface membranaire en un ligand soluble (kit-L)²⁹³. La liaison du kit-L avec le c-kit (un récepteur membranaire de la famille des tyrosines kinases) serait en partie nécessaire à la libération des CEP provenant de la MO lors d'un événement ischémique affectant le myocarde⁴²². La surexpression de kit-L (aussi nommé facteur de cellule souche (SCF)) dans un modèle d'infarctus chez le rat produit ainsi, à 30 jours, une augmentation du nombre de CEP recrutées au site du dommage ischémique et une diminution significative de l'apoptose⁴²³. Au centre des mécanismes impliqués dans l'adhésion/libération des CEP de la MO se retrouve le « stromal-derived factor-1 » (SDF-1)²⁸⁹. Ce facteur est essentiel à la rétention et à la mobilisation des CEP de la MO²⁸⁸. Dans un modèle d'ischémie chez le rat, De Falco *et coll.* ont observé un gradient de concentration croissant de SDF-1 entre la MO et la circulation sanguine, favorisant une mobilisation/libération des CEP de la MO vers la périphérie⁴²⁴. Le SDF-1 est donc le facteur de mobilisation le plus puissant pour les CEP⁴²⁵. Cette molécule joue, par conséquent, un rôle essentiel dans la réparation tissulaire en présence d'ischémie⁴²⁶. D'autres facteurs semblent aussi influencer la mobilisation des cellules provenant de la MO dont la NO, puisque la NO synthase semble moduler le recrutement cellulaire à la suite d'une lésion ischémique myocardique⁴²⁷. Des

modèles de souris transgéniques dépourvus de eNOS inhibent ainsi la mobilisation des CEP⁴²⁷. En interférant avec la eNOS, la protéine C réactive diminue également le nombre de CEP mobilisées de la MO dans le sang⁴²⁸.

Tel que mentionné plus haut, plusieurs facteurs de croissance et diverses cytokines peuvent médier la mobilisation de CEP de la MO. Ces facteurs multiples peuvent inclure le facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF), le facteur de croissance granulocytaire (G-CSF), le facteur SDF-1 (« stromal cell-derived factor-1 »), l'angiopoïétine II, le facteur de croissance de fibroblastes (FGF), le facteur de croissance placentaire (PGF), l'érythropoïétine (EPO), le facteur de croissance des plaquettes (PDGF) et l'estrogène⁴²⁹⁻⁴³². Parmi ces facteurs, le G-CSF est certainement l'un des plus étudiés⁴³³. Enfin, certains médicaments augmentent le nombre de CEP disponibles en circulation. Les statines, par exemple, augmentent le nombre de CEP en circulation en modulant la biodisponibilité du NO⁴³⁴. Plusieurs études ont démontré l'effet bénéfique des statines sur le nombre de CEP mobilisées de la MO (tableau I)⁴³⁵⁻⁴³⁹. D'autres agents pharmacologiques aussi utilisés en IC, comme les inhibiteurs du récepteur de l'angiotensine II ou les inhibiteurs de la phosphodiesterase-5, augmentent également le nombre de CEP en circulation^{440, 441}.

6.5 Résumé des études cliniques

Il existe plusieurs essais cliniques qui ont examiné le rôle de la transplantation de cellules médullaires chez les patients souffrant de CMI⁴⁴²⁻⁴⁴⁵. Le plus important est certainement l'étude TOPCARE-CHD (« Transplantation of progenitor cells and recovery of LV function in patients with chronic ischemic heart disease »)⁴⁴⁶. Cette étude a exploré l'influence des CMN-MO sur 75 patients souffrant d'une CMI trois mois après un IDM. Vingt-huit patients ont reçu une injection intracoronaire de cellules mononucléaires dans l'artère coronaire perfusant le territoire le plus dyskinétique à l'ETT. Cette injection a été associée à une amélioration significative de la FÉVG à 6 mois (+ 2,9 % vs. - 1,2 % chez le groupe témoin)⁴⁴⁶.

D'autre part, des études cliniques ont aussi évalué le rôle de la transplantation des myoblastes provenant du muscle squelettique (SKM) dans l'IC chronique^{447, 448}. On note que ces cellules auraient un avantage potentiel sur les CMN-MO, puisqu'elles peuvent développer une force contractile et une résistance particulière à l'ischémie, caractéristique qui les rend utilisables dans le tissu cicatriciel⁴⁴⁹. On considère que leur désavantage principal est d'être incapables de s'associer sur le plan électromagnétique aux cardiomyocytes⁴⁴⁸. Des résultats préliminaires ont analysé l'utilisation et la faisabilité d'une injection directe de SKM dans la cicatrice de l'infarctus pendant une opération de pontage aorto-coronarien⁴⁵⁰. L'enthousiasme soulevé par ce traitement a cependant été freiné par la survenue d'arythmies ventriculaires nécessitant l'implantation d'un défibrillateur. Malgré ces effets néfastes, cette étude a démontré une amélioration

significative de la symptomatologie clinique observée (classe fonctionnelle NYHA) et de la FÉVG au cours d'un suivi à moyen terme de ces patients (18 à 58 mois)⁴⁵¹.

Chapitre 7: Manuscrit #4

7.1 Avant-propos au Manuscrit #4

Tel que décrit dans l'introduction qui précède ce manuscrit, les CEP et l'axe cœur/MO jouent un rôle prometteur dans l'évaluation du pronostic et le traitement des patients souffrant d'IC. Cette hypothèse de récupération fonctionnelle nous permet d'envisager que des CS provenant de la MO sont mobilisées au niveau du myocarde pour permettre de déclencher des mécanismes de réparation⁴⁵². Dans ce quatrième manuscrit, le candidat au doctorat en sciences biomédicales propose au lecteur une revue complète des mécanismes qui sous-tendent le rôle des CEP dans l'axe cœur/MO en thérapie cellulaire. Ce manuscrit est accepté pour publication dans le « *European Journal of Cardiothoracic Surgery* ».

The Bone Marrow-Cardiac Axis: Role of Endothelial Progenitor Cells in Heart Failure

Simon Maltais, M.D., M.Sc.¹, Louis P. Perrault, M.D., Ph.D.¹, and Hung Q. Ly, M.D.^{2†}

Department of Surgery¹ and Department of Medicine², Université de Montréal, Quebec, Canada

Running title: Progenitor Cells in Heart Failure

Word Count: 5988 (including references)

The authors have no financial associations or relationship with industry that might pose a conflict of interest with the submitted article.

Address correspondences to:

Hung Q. Ly, M.D.

Dept. of Medicine, Montreal Heart Institute, Université de Montréal; 5000 Belanger St. (east), Montréal, Québec, Canada, H1T 1C8. Phone: (514) 376-3330 (2438); Fax: (514) 593-6299.

[†] Drs. Maltais, Ly and Perrault are scholars of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). Dr. Perrault is supported by the National Institute of Health (NIH) and the Dept. of Surgery, Université de Montréal. Dr Ly is supported by the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC) and the Stem Cell Network of Canada.

Summary

Congestive heart failure (CHF) remains a leading cause of mortality in the developed world. The complex mechanisms involved in the pathophysiology of heart failure (HF) explain some of the limited impact of current recognized therapeutic strategies. There is therefore a definite need for new alternative molecular and biological pathways to address the treatment of this condition. Over the past decade, much research has focused upon identifying the ideal cell type to promote myocardial regeneration. Recently, striking reports suggested the concept that bone-marrow (BM)-derived endothelial progenitor cells participate in cardiac regeneration and function recovery in the setting of progressive HF. The modulation of this complex interaction between the BM and the circulating endothelial progenitor cells (EPCs) could be at the crossroad of multiple therapeutic strategies aimed to protect or restore the myocardium in the setting of CHF. However, there are uncertainties and unresolved issues regarding the mechanisms possibly responsible for the functional benefits observed in chronic experimental and pre-clinical studies. Hence, the BM-cardiac axis concept has created overwhelming enthusiasm and subsequent skepticism in the field of cardiac repair and regeneration. Further intensive research in basic science and clinical arenas are needed to elucidate the potential association between the BM and heart function recovery, particularly in the progression towards advanced stages of CHF. In this review, we focus on the importance of the BM-cardiac axis and BM-derived EPCs in the pathophysiology, clinical progression and potential treatment of CHF.

Keywords: Heart Failure; Bone Marrow Axis; Progenitor cells; Therapy

Introduction

Ischemic heart disease (IHD) remains a leading cause of mortality worldwide². There are currently more than 5 millions diagnosed cases of congestive heart failure (CHF) in North America^{1, 88}. Recent estimates put the incidence at 550 000 new cases per year⁸⁹. The complex pathophysiology of CHF involves alterations at numerous levels, from molecular signaling pathways to direct cardiomyocyte damages, which progressively result in deleterious changes in myocardial structure and function^{5, 6, 20}. Recently, mitochondrial uncoupling and impaired myocardial insulin signaling pathways have been recognized to contribute to the failing myocardium⁴⁵³. These novel mechanisms underscore the growing complexities involved in CHF and likely explain some of the limited (albeit important) impact of current therapeutic strategies^{454, 455}.

There is a growing interest for bone marrow (BM)-derived endothelial progenitor cells (EPCs) in the setting of CHF. Cells expressing early cardiac markers are known to reside in the BM and adult-derived stem cells have been identified in various organs (such as liver, brain and heart). Evidence suggests these progenitor cells not only act as markers of disease, but also contribute to myocardial healing in the setting of ischemic injury⁴⁵⁶.

With the recent paradigm shift towards a more cellular perspective of cardiac repair and recovery, the BM is recognized to actively contribute to reparative processes in the setting of chronic ischemic cardiac injury. Conversely, CHF induces important

alterations in BM cellular response³⁵³. This review will focus on the importance of the BM-cardiac axis in the pathophysiology, clinical progression and potential treatment of CHF, with emphasis on BM-derived EPCs.

EPC characteristics

The phenotype of EPCs is not consensual and they have been variably defined as cells mobilized from the BM in response to cytokines or ischemia. They express various combinations of antigens traditionally associated with hematopoietic stem or progenitor cells as well as endothelial cells (such as c-kit, CD133, Sca-1, CD34, VEGFR2, vascular endothelial cadherin)⁴⁵⁷. EPCs also display phenotypical aspects of endothelial cells in in-vitro clonogenic assays such as low-density lipoprotein-captation and endothelial nitric oxide synthase expression¹⁸⁰. There is a dynamic expression of EPCs antigens in consistence with the level of maturation of these cells. In brief, three surface markers characterize the early functional BM-derived endothelial precursor cells: CD133, CD34 and the vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2)¹⁷⁶. Progenitor cells localized predominantly in the BM are CD133+/CD34+/VEGFR-2+ cells, but lack the expression of endothelial peripheral circulation phenotypes such as vascular endothelial (VE) cadherin and von Willebrand factor (vWF)¹⁷⁸. As maturation into early adult EPCs occurs, late differentiated EPCs become negative for CD133, positive for VEGFR-2, and still express CD34¹⁷⁹. The final phenotype of adult peripheral blood EPCs varies, and becomes gradually CD34+/VEGFR-2+/CD133-¹⁷⁹. Multiple typical circulating markers of endothelial lineage such as platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1 or

CD31), VE-cadherin, vWF and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) also become expressed at the cell surface of late EPCs¹⁷⁴. Still, there is conflicting evidence regarding changes that occur on the EPC cell surface during the development of chronic pathologic processes such as CHF, and as to when or how an “early” endothelial precursor becomes a fully differentiated mature EPC.

Prognostic value of EPC

BM-derived circulating EPCs have a well-established role as biomarkers⁴⁵⁸. Clinical studies have shown that levels of circulating EPCs are associated with the presence of classic cardiovascular risk factors. The pioneering study by Hill et al. strongly correlated the number of circulating EPCs with the combined Framingham risk factor score of patients⁴⁰³. There was a significant association between the absolute number of BM-derived EPCs and the degree of endothelial dysfunction, as measured by brachial artery doppler studies. In a subsequent study on 519 coronary artery disease patients, levels of circulating CD34+KDR+ EPCs cells also predicted the occurrence of adverse cardiovascular events⁴⁰⁴. The cumulative event-free survival rates increased in a stepwise fashion with rising levels of EPCs. Recent evidences strengthened the link between the BM and CHF as BM-progenitor cells were mobilized differently. While CD34+ cells and CD34/CD133+ cells were inversely associated with functional class, CD133+ cells were quantitatively similar between CHF and healthy subjects⁴⁵⁹. Taken together, these studies suggest that BM-derived EPCs level is a biomarker of cardiovascular diseases able to identify patients at high risk for major cardiac events.

More importantly, reduced BM-derived circulating progenitor levels and impaired regenerative capacity in patients with CHF may have several underlying explanations: (a) exhaustion of the “reservoir” of BM progenitor cells, (b) reduced cell mobilization or (c) increased apoptosis⁴⁶⁰. Through a reduced migratory and homing capacity, BM-derived EPCs from patients with CHF have a reduced ability to improve neovascularization following hind limb ischemia⁴⁶¹. Recently, Kissel et al. reported that a functional exhaustion of BM-derived EPCs could be responsible for an unfavorable LV remodeling process in patients with CHF⁴¹². EPCs derived from patients with ischemic heart disease showed evidence of impaired migratory capacity compared with EPCs derived from healthy controls⁴¹². These observations point to a close association between BM-derived progenitor cells and functional CHF evolution.

EPC in disease states

The impact of EPC functional impairment has been studied in the context of various pathologies associated with CHF. Chronic exposure to classical risks factors in CHF leads to deterioration of BM-derived EPC quantity and function. Common risk factors such as increased age, diabetes, smoking, or hypertension impair EPCs function by decreasing cell mobilization from BM reservoirs, decreasing integration into damaged endothelium, and decreasing angiogenic capacity⁴⁵⁸. Evidences suggest that cardiovascular progenitor cells are subject to age-associated changes that impair their function, and these changes may contribute to the dysregulation of endogenous

cardiovascular repair mechanisms in the aging heart⁴⁶². Progressive EPC functional impairment is associated with dysfunctional telomerase activity, accumulating effects of oxygen free radicals or decreased levels of circulating and mitochondrial antioxidant molecules such as superoxide dismutase or glutathione⁴⁶³. Therefore, a blunted response of the BM-cardiac axis could lead to the progression towards CHF. Insufficient levels of EPCs as well as intrinsic function anomalies (increased apoptosis and exhaustion of BM-derived EPCs) are of paramount importance in the pathophysiology of delayed vascular repair^{464, 465}. Dimmeler et al. suggested that early activation of the cellular suicide pathway in EPCs could be an initial step in the development of atherosclerotic lesions and HF. These results suggest that BM-derived EPCs impairment accounts for CHF and progressively initiate the progressive loss in heart function (Figure 1). However, recent notable results showed in a large population study that hypertension, glycosylated haemoglobin and plasma triglycerides were positively correlated with circulating EPCs⁴⁶⁶. The authors speculated that this could represent a “protective”, compensatory response. Hence, the relation of circulating EPCs to cardiovascular risk factors may be more complicated than expected.

More importantly, the impaired functional capacity of peripheral blood vessels to dilate in response to increased flow could be a major determinant of the degree of exercise intolerance, an important clinical feature of patients with CHF⁴⁶⁰. CHF is further associated with elevated circulatory levels of pro-inflammatory cytokines, such as IL-6 or TNF- α ⁴⁶⁷. Endothelial cell dysfunction provides a potential pathophysiologic link between the loss of normal endothelial function and CHF. There is a close association

between endothelial injury and early events in the development of atherosclerosis and CHF⁴⁶⁸. Evidences suggest a strong relation between the number of endothelial colonies and the extent of endothelial dysfunction measured by flow-dependent relaxation⁴⁰³. EPCs have been shown to participate in re-endothelialization after vascular injuries as these cells are incorporated into sites of active angiogenesis¹⁷⁴. Human BM-derived CD34-/CD14+ monocyte lineage cells activated by MCP-1 adhere onto the luminal side of the injured artery, differentiate into endothelial-like cells, and inhibit neointimal hyperplasia⁴⁶⁹. These results suggest that BM-derived EPCs prevent vascular diseases and myocardial fibrosis by restoration of endothelial lining and preservation of vascular hemostasis. Early changes in the progression of CHF can prompt EPCs to provide a circulating pool of cells (niche or reservoir) able to renew the dysfunctional endothelium of the denuded artery. EPCs may counteract and protect the ischemic tissue from progressive end-organ injury and subsequent HF.

Mechanisms of mobilization from the bone marrow

The majority of EPCs remain quiescent in a microenvironment within the BM, termed the stem cell niche²⁷³. These cells are tethered within the BM by integrins to stromal cells²⁷³. The proliferation, release, and migration of EPCs anchored in stem cell niches, although incompletely understood, is tightly regulated by a complex interplay involving cytokines, proteinases, and several adhesion molecules. The relation between the BM (stem cell niches) and the circulation is dynamic. Various mediators are implicated in EPCs mobilization, and an exhaustive description of these pathways would

be beyond the scope of this clinically oriented review. Please refer to Tilling et al. for a complete review of mechanisms involved in EPC mobilization from the BM²⁸⁶.

Chemokines as facilitators of mobilization: the role of SDF-1

The chemokine stromal-derived factor 1 (SDF-1)/CXCR4 axis regulates adhesion/chemotaxis of BM progenitor cells through activation/regulation of specific integrin molecules²⁸⁷. This axis is central to the retention/mobilization within the BM of EPCs²⁸⁸. In a murine model of hindlimb ischemia, SDF-1 expression was downregulated in BM and up regulated in blood plasma favoring stem cell mobilization in peripheral blood and homing into ischemic tissues²⁸⁹. Hence, there is a direct correlation between the plasma concentration and the degree of EPC migration, implying that the response is determined by a concentration gradient of SDF-1⁴²⁴. SDF-1 has been shown to be the most potent chemoattractant of EPCs⁴²⁵. This molecule plays therefore a critical role in tissue repair in the setting of CHF by modulating BM-derived SPCs trafficking through mobilization, recruitment and proliferation of EPCs²⁹¹. SDF upregulation during hypoxia is also facilitated by the transcription factor hypoxic-inducible factor 1 (HIF-1)⁴²⁶. SDF-1 gene expression has been shown in murine models to be mediated by HIF-1, resulting in a proportionate selective expression of SDF-1 in ischaemic tissues⁴²⁶. On entering the BM microenvironment, SDF-1 activates several proteinases expressed by BM stromal cells such as matrix metalloproteinases 9 (MMP-9)²⁹³. MMP-9 is closely involved in the liberation of BM-derived EPCs to the circulation through the BM sinusoids²⁹⁴. One of the most powerful endogenous stimuli of BM stem cell recruitment is tissue ischemic injury.

Myocardial infarction induces strong tissue oxygen depletion and promotes mobilization of EPCs from the BM to the ischemic heart²⁹⁵. Chronic hypoxia has always been one of the most potent stimuli for neovascularization²⁹⁶. Animal studies have shown that adult vasculogenesis occurs partially through *in situ* recruitment and proliferation of circulating BM-derived cells²⁹⁷. Ischemia induces multiple processes such as cytokines release and up-regulation of surface markers that allow EPCs to mature and proliferate and promote end-organ recovery^{283, 298}. Hence, several pivotal factors/cytokines are also reported to promote the mobilization of BM-derived SPCs into the peripheral circulation including granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), IL-8, Grob, stem cell factor (SCF), vascular endothelial growth factor (VEGF), and erythropoietin (EPO)^{273, 299, 300}. Along with SDF-1, all of the latter factors are altered in the setting of CHF, which in turn modulate cardiac healing by controlling the efflux of BM-derived progenitor cells.

Conflicting Evidence in CHF

BM-derived EPCs are frequently described as “ischemic warriors” able to help the heart recover from an ischemic injury²⁹⁷. The concept of improving myocardial recovery in the setting of chronic IHD through BM-derived EPCs as generated conflicting results⁴⁷⁰. A recent study by Losordo et al. showed in a group of twenty-four patients presenting chronic intractable ischemia that injecting BM-derived CD34+ cells lead to a decrease in angina frequency compared to control subjects given placebo⁴⁷¹. Peripheral intravenous injection of cultured BM-derived CD34+ cells was shown to induce similar changes in the chronic ischemic setting by preventing cardiomyocytes

apoptosis, reducing LV remodeling and improving LV function¹⁵⁹. Gill et al. showed that chronic vascular traumas induce a rapid and transient rise in circulating EPCs⁴⁷². Kalka et al. reported histological evidences of cell incorporation and neoangiogenesis after injecting human peripheral blood EPCs in a murine model of chronic hindlimb ischemia¹⁸².

Conversely, numerous authors have shown that advanced stages of CHF were associated with reduced levels of circulating EPCs. Among others, Valgimigli et al. showed CD34+ cells and EPCs mobilization differs profoundly according to the clinical stage of CHF (Figure 15). They proposed a biphasic response with an initial elevation of circulating EPCs in the early stage followed by a progressive decline in advanced clinical stages³⁵³. Incubating serum from patients with severe CHF with umbilical vein endothelial cells downregulates eNOS and enhances apoptosis in *in vitro* cultures⁴⁷³. The migratory and colony-forming activity of BM-derived cells is reduced in patients with severe chronic IHD⁴⁶¹.

Thus, an active interaction between the heart and the BM likely occurs. Understanding the basic cellular changes and functional impairments occurring in patients during the course of progressive CHF is critical when establishing the clinical relevance of the crosstalk in the BM-cardiac axis. However, there is a lack of data with regard to the kinetics of BM-derived EPCs mobilization according to various clinical stages of patients with CHF. From both a mechanistic and clinical perspective, many questions concerning this interaction remain unresolved. The dynamic modifications

observed in BM-derived EPC levels and function (proliferating capacity, migratory potential, etc.) particularly during the development of CHF is still widely unknown. Clinically relevant, large animal models of chronic ischemia should be used to clarify questions regarding the cardiac-BM axis issue and potentially delineate the role of specific treatments such as statin therapy or CABG surgery on cell recruitment and its clinical importance in patients with CHF.

Potential new therapeutic targets

In addition to well-recognized mobilizing agents, numerous studies have shown that statin therapy can exert a protective action on EPCs (Table XIII). Dimmeler and colleagues demonstrated HMG-CoA reductase inhibitor therapy constantly induces an increase in the proliferation and differentiation of circulating EPCs levels possibly *via* an anti-apoptotic PI3-kinase/Akt (PI3K/Akt) pathway⁴³⁹. Pravastatin, a HMG-CoA reductase inhibitor, improved left heart function in a swine model of hibernating myocardium by mobilizing CD133+ and cKit+ bone marrow progenitor cells, and promoted cardiomyocytes to reenter in a favorable way the growth phase of the cardiac cell cycle⁴⁰⁹. Despite such promising animal and cellular data combined with their well-recognized role in both primary and secondary prevention, the use of statins in CHF patients remain controversial⁴⁷⁴. The Controlled Rosuvastatin Multinational Trial in Heart Failure (CORONA) reported no survival benefit in a group of 5011 patients with New York Heart Association class II, III, or IV ischemic, and systolic heart failure randomly assigned to receive 10 mg of rosuvastatin or placebo per day⁴⁷⁵. BM-derived EPCs

function could represent a new early target to identify subtle changes of statin therapy in patients with CHF.

Other key therapeutic options used to address CHF have been also been linked to EPC function. For example, Yao et al. demonstrated that oxydative stress plays a central role in the initiation and progression of CHF as experimental studies showed angiotensin II receptor blockers improved EPC function through antioxidative mechanisms⁴⁷⁶. Other protective non-pharmacological strategies such as exercise are also known to increase the circulating levels of EPCs⁴⁰⁹. Recent evidence suggests that EPC levels and their proliferative capacity could be increased after coronary artery bypass graft (CABG) surgery (Table XIV). Taken together, these findings suggest that BM-derived EPCs could be at the crossroad of multiple co-morbidities and closely linked to cardiovascular diseases, specific treatments or progression of subsequent CHF.

Newfound role of BM-derived EPCs

BM-derived progenitor cells, in particular EPCs, have been reported to have the ability to repair or regenerate tissue-specific somatic cells in the setting of either homeostasis or injury⁴⁷⁷. A number of studies of stem cell-based therapy have focused on BM-derived cells populations⁴⁷⁰. Orlic et al. were among the first to allude to an interaction between the latter cells and the injured myocardium, the BM-heart axis. These investigators reported that mobilization of endogenous BM cells lead to marrow cell conversion to cardiomyocytes and improvement in cardiac function^{7, 8}. The identification

of circulating BM-derived EPCs has changed our understanding of the mechanisms involved in new vessel growth¹⁸¹. Neovascularization is now believed to occur either through sprouting of tissue-resident stem cells regulated by cytokines and growth factors (angiogenesis) or by recruitment of BM-derived EPCs¹⁸¹. Using a murine model of GFP-labeled BM, Mouquet et al. demonstrated that BM-derived progenitors homed to areas of injured myocardium as early as 3 days after MI⁴⁷⁸. Recent studies have reported that BM-derived cells home to areas of myocardial injury and contribute to cardiac repair⁴⁷⁹. From a clinical practice, chronic ischemic cardiomyopathy has been treated by way of intracoronary delivery of cell-based therapy with small pilot studies reporting mitigated clinical results²⁶³. Moreover, the TOPCARE-CHD crossover study found that there was improvement in ventricular function in patients treated with undifferentiated BM-derived progenitor cells, but not with EPCs alone²²⁷. New innovative conducts to promote effective BM-derived EPCs mobilization from the BM, or durable engraftment to the myocardium could therefore be at the crossroad of multiple strategies involved in the treatment of patients with CHF.

Conclusion

The BM-heart axis is pivotal as it is involved in the pathogenesis, staging and treatment of CHF. Multiple mechanisms could be involved in the degree of BM-derived EPC recruitment following an ischemic injury and, beyond their well-recognized role as biomarkers for cardiovascular events, EPC functional impairment remains a key mechanism in the setting of CHF, and a crucial element to bear in mind when

contemplating the therapeutic potential of this population of progenitor cells. A more thorough understanding of the temporal variations of BM-derived EPCs during the progression towards chronic ischemic myocardium could contribute to better target novel therapeutic strategies to “rescue” the BM in the setting of CHF.

TABLES

Table XIII. Summary of in vitro and in vivo studies linking EPCs properties, function and statin therapy

	Statin Used	Experimental Model	Modulated Mechanism
Dimmeler et al. 439	Simvastatin	EPC culture assay of blood or BM from statin-treated mice	Increase proliferation and differentiation through PI3K/Akt pathway
Suzuki et al. ⁴³⁵	Pravastatin	Swine model of chronic hibernating myocardium	Improves LV function in through mobilization of BM-derived EPCs
Llevadot et al. ⁴³⁶	Simvastatin	EPC culture assay of blood from statin-treated mice	Increases levels of BM-derived EPCs and by increasing migratory capacity and survival
Vasa et al. ⁴⁸⁰	Atorvastatin	Clinical study- human circulating EPCs in vitro	Increase circulating levels of EPCs in patients with stable CAD
Werner et al. ⁴³⁸	Rosuvastatin	Carotid injury mice model of endothelial injury	Enhances circulating pool of EPCs

Zhang et al. ⁴⁸¹	Rosuvastatin	Clinical study- human circulating EPCs in vitro	Enhances circulating pool of EPCs and reduces endothelial dysfunction
-----------------------------	--------------	-------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------

BM = bone marrow; CAD = coronary artery disease; EPC = endothelial progenitor cells;

LV = left ventricle

Table XIV. Summary of surgical evidences suggesting that EPC levels and their proliferative capacity are increased after coronary artery bypass graft (CABG) surgery

	Number of patients	Surgery	Modulated Mechanism
Scheubel et al. ⁴⁸²	50	On-pump CABG	Increased circulating levels of EPCs
Roberts et al. ⁴⁸³	30 / 24	On-pump CABG / off-pump CABG	Increased proliferation capacity of circulating EPCs postoperatively.
Ruel et al. ⁴⁸⁴	10 / 10	On-pump CABG / off-pump CABG	Increased levels of circulating EPCs. Migratory capacity impaired with on-pump CABG.

CABG = coronary artery bypass grafting; EPC = endothelial progenitor cells

Figure 15

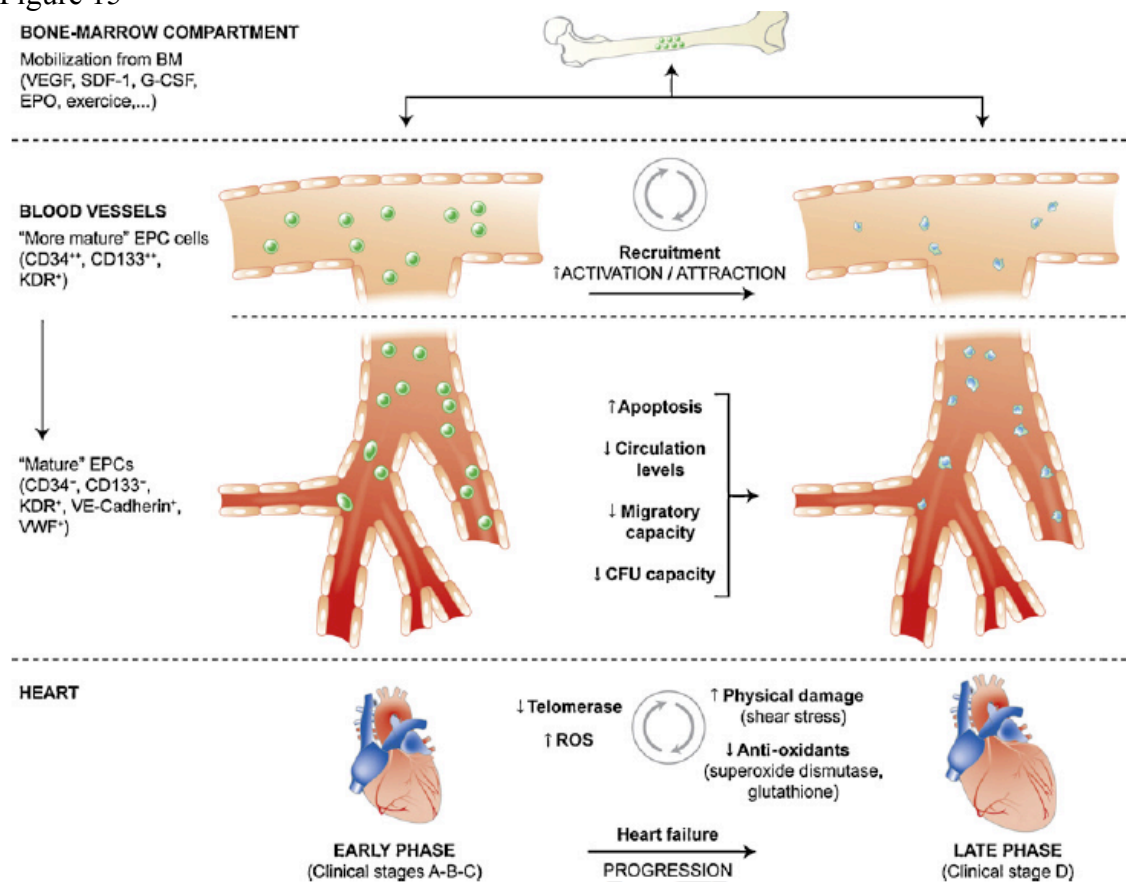


Figure 15: A schematic representation of the BM-cardiac axis for cell-based myocardial repair and summary of potential changes observed during the progression of HF. Early stages of HF are associated with enhanced mobilization and increased circulating levels of BM-derived EPCs. Advanced stages of HF are linked to dynamic modifications of BM-derived EPC levels and function (increased apoptosis, decreased migratory potential, and decreased proliferating capacity). Progressive accumulation of cellular effects such as decreased telomerase activity, accumulation of ROS, or decreased anti-oxidant levels may further impair endogenous repair mechanisms and promote rapid progression towards more advanced stages of HF.

BM = bone marrow; EPC = endothelial progenitor cells; EPO = erythropoietin; G-CSF = granulocyte colony-stimulating factor; HF = heart failure; ROS = reactive oxygen species; SDF-1 = stromal-derived factor-1; VEGF = vascular endothelial growth factor; vWF = von Willebrand factor

Chapitre 8: Manuscrit #5

8.1 Avant-propos au Manuscrit #5

Dans ce dernier article original, le candidat au doctorat en Sciences Biomédicales présente un modèle d'ischémie chronique qui nous permettra d'étudier le rôle de l'axe cœur/MO et des CEP au cours du développement d'une dysfonction ventriculaire gauche réversible. À l'aide de ce modèle translationnel de recherche, nous avons élaboré un moyen d'étudier le nombre et la fonction des CEP dérivées de la MO. Nous tentons d'élucider les mécanismes qui pourraient être à la base de l'activation/relâche de ces cellules provenant de la MO. Ce manuscrit est soumis pour publication dans le « *Journal of Physiology* ».

Functional Exhaustion of Bone Marrow-derived Endothelial Progenitor Cells in a Chronic Swine Model of Myocardial Ischemia

Simon Maltais¹, Jean-François Tanguay², Martin Sirois², Jean-Claude Tardif², Louis P. Perrault¹, and Hung Q. Ly^{2†}

From the Dept. of Cardiac Surgery¹ and the Dept. of Medicine², Montreal Heart Institute, Université de Montréal, Québec, Canada.

Running title: Stem cell functional exhaustion in myocardial ischemia model

Word Count: 4696 (excluding references)

Address correspondence to:

Hung Q. Ly, M.D., M.Sc., F.R.C.P.C

Dept. of Medicine, Montreal Heart Institute, Université de Montréal;

5000 Belanger st. (East), Montreal, Qc, H1T 1C8, Canada

T: 514-376-3330 F: 514-376-6299

† Drs. Maltais, Ly and Perrault are scholars of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). Dr. Perrault is supported by the National Institute of Health (NIH), the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), and the Dept. of Surgery, Université de Montréal. Dr Ly is supported by the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC), the ThéCell Network of the FRSQ and the Stem Cell Network of Canada. Dr Tardif holds the Université de Montréal research chair in atherosclerosis and is supported by CIHR.

ABSTRACT

Introduction

The functional impairment of bone marrow (BM)-derived endothelial progenitor cells (EPCs) remains an important barrier for cardiac cell-based therapies. Our aim was to create a relevant swine model of chronic ischemia and document its effect on BM-derived progenitor cells. We hypothesized that BM-derived EPCs would be functionally impaired in the setting of chronic cardiac dysfunction of ischemic origin.

Methods

At baseline, Landrace miniswine were instrumented with a fixed occluder to the proximal left anterior descending coronary artery (LAD). We evaluated the animals over a three months period (0, 45 and 90 days).

Results

Focal proximal LAD stenosis was angiographically confirmed in all animals (mean diameter stenosis=96±4%, n=12). The resulting ischemic myocardium had evidence of contractile dysfunction but preserved viability. A progressive decline in circulating levels of EPCs was documented 3 months following instrumentation (p<0.001). Quantitative PCR analysis revealed that chronic myocardial ischemia produced a biphasic response in both hypoxic-inducible factor 1 (HIF-1) and stromal-derived factor 1 (SDF-1) mRNA expression. While initially upregulated, a gradual decline in HIF-1 and SDF-1 mRNA expression was observed over time (from day 45 to 90). On serial assessment, EPC migration in response to chemoattractant gradients of vascular endothelial growth factor (10-200ng/mL) and stromal cell-derived factor-1 (10-100ng/mL) was progressively impaired.

Conclusion

Decreased circulating levels and migratory dysfunction of BM-derived EPCs were documented in a reproducible clinically relevant model of myocardial ischemia. Our model of chronic ischemic cardiac dysfunction could contribute to improved understanding of cellular mechanisms involved in the mobilization and exhaustion of EPCs in patients with heart failure.

Word Count: 250

Keywords:

Heart Failure; Bone Marrow; Progenitor cells; Therapy

INTRODUCTION

Ischemic heart disease (IHD) remains a leading cause of mortality worldwide². Currently, there are over five million diagnosed cases of congestive heart failure (CHF) in North America^{1, 88}. The complex pathophysiology of CHF involves alterations at numerous levels, from altered molecular signaling pathways to direct cardiomyocyte injury, which progressively result in deleterious changes in both myocardial structure and function^{5, 6, 20}. A myriad of novel pathophysiological mechanisms such as mitochondrial dysfunction underscore the growing complexities involved in CHF, which could explain some of the limited impact of current therapeutic strategies^{454, 455}.

Rahimtoola et al. proposed a thorough description of the "hibernation syndrome"³⁹⁶. They postulated that this condition resulted from reduced myocardial blood flow at rest whereby the heart downgrades its myocardial function to the extent that blood flow and function are maintained at equilibrium³⁹⁶. Serial studies using external coronary occluders on juvenile swine producing severe coronary stenosis demonstrated a systematic progression to myocardial hibernation / ischemia⁴⁸⁵⁻⁴⁸⁷. At the clinical level, hibernation leads to left ventricular systolic dysfunction and potentially CHF^{488, 489}.

A growing interest has emerged in the role of bone marrow (BM)-derived endothelial progenitor cells (EPCs) in the setting of CHF²⁸⁶, as these progenitor cells act as biomarkers of extent of coronary artery disease, but also contribute to myocardial healing in the setting of ischemic injuries^{403, 456}. A blunted response of the "BM-cardiac axis" has been observed to lead to the progression towards CHF⁴⁶¹. Insufficient levels and intrinsic functional abnormalities of EPCs such as increased apoptosis and exhaustion of BM-derived EPCs are of paramount importance in the setting of delayed vascular

repair^{412, 464-466}. There is currently poor longitudinal data on the alterations of BM-derived cells during the course of chronic myocardial ischemia in a clinically relevant *in vivo* model. Our study aim was to assess the underlying mechanisms driving the differences in cellular trafficking (mobilization and migration) of BM-derived EPCs. We hypothesized that BM-derived EPCs would be impaired in a chronic swine model of myocardial ischemia.

METHODS

Chronic Ischemic Cardiomyopathy Model Creation. Juvenile Landrace miniswine (10 to 15 kg) were obtained from Primiporc (St-Gabriel-de-Brandon, QC). All surgical procedures and postoperative care were carried out in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. The study protocol was approved by the Montreal Heart Institute Animal Experimentation Committee. Swine were anesthetized with sodium pentobarbital (30 mg/kg) and mechanically ventilated (Harvard Apparatus, South Natick, Mass.) according to our standard protocol³⁷⁰. Chronic instrumentation and experimental protocol have been previously detailed by Fallavolitta et al⁴⁸⁷. Briefly, at baseline, 14 juvenile pigs were instrumented through a left anterior thoracotomy with a 1.5 to 2.25 mm rigid Delran occluder (generously provided by Dr Canty, Buffalo, New York) on the proximal left anterior descending artery (LAD). Pigs were then weaned-off from ventilator and allowed to recover. All animals were instrumented by the same operator (S.M.) and housed under similar conditions. Blood samples for troponin measurement were drawn at baseline and after different timepoints to exclude myocardial infarction. Left ventriculogram and coronary angiography were performed at baseline and

at the end of the study for each animal to evaluate LV function and determine the severity of coronary artery stenosis.

Echocardiographic Measures. Echocardiographic (TTE) studies were performed with a M3S probe (2.0 ~ 4.3 Megahertz) and the Vivid 7 Dimension system (GE Healthcare Ultrasound, Horten, Norway). Transthoracic echocardiographic study was performed at baseline before surgery. Dobutamine stress echocardiographic (DSE) study was performed three months following LAD instrumentation. Dobutamine (Dobutrex; Eli Lilly, Toronto, Canada) was used in incremental doses. A low DSE dosage (5-10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) was used to increase the heart rate (HR) to approximately 120 beats per minute (bpm), whereas a high DSE dosage (15-40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) targeted a HR over 140 bpm. Parasternal short-axis views were recorded to visualize potential ischemic left ventricular (LV) wall segments. LV regional wall motion abnormalities were scored as: normal=1; hypokinesis=2; akinesis=3; dyskinesis=4 and aneurysmal=5. Wall thickness was measured at cardiac end-diastole (d) and end-systole (s) for the segments with abnormal wall motion, and wall thickening was calculated as: $(\text{wall thickness s} - \text{wall thickness d} / \text{wall thickness d} \times 100)$. Left ventricular dimensions (LVD) at both cardiac end-diastole (LVDd) and end-systole (LVDs) were measured in the short-axis view at the level of the papillary muscles (in M-mode). Left ventricular fractional shortening was calculated as: $(\text{LVDd} - \text{LVDs}) / \text{LVDd} \times 100$. Pulsed-wave Doppler measurements were used to trace the flow spectrum of the LV outflow tract in an apical 5-chamber view, and cardiac output was obtained subsequently. The average of 3 cardiac cycles was used for all measurements.

Isolation and Culture of Porcine Endothelial Progenitor Cells. BM cells were aspirated from the iliac bone at three different timepoints during the course of this study (0, 45, and 90 days). For each timepoint, fresh BM and peripheral blood mononuclear cells (MNCs) were isolated by Ficoll Histopaque density-gradient centrifugation (Life Sciences, Baie d'Urfé, QC). After isolation of MNCs, $1.3 \times 10^5/\text{cm}^2$ of MNCs were plated on fibronectin-coated culture dishes and maintained in endothelial cell basal medium-2 (EBM-2; Clonetics, San Diego, CA) supplemented with EGM-2 (Clonetics, San Diego, CA) microvascular single aliquots, 5% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Calgary, AB), and 1% penicillin (10 000 U/ml)/streptomycin (10 mg/ml). The cells were cultured for 4 days at 37°C with 5% CO₂ in a humidified atmosphere. After 4 days, non-adherent cells were discarded by washing with phosphate-buffered saline (PBS; Gibco, Calgary, AB). Thereafter, the adherent cells were cultured in complete EGM-2 medium and the medium was changed every 3 days until the first passage. Colonies of early EPCs appeared between 7 and 14 days of culture, and were identified as well-circumscribed monolayers of cobblestone-appearing cells. In this study, we focused mainly on the role of early EPCs, as late EPCs represent more differentiated cells. MNCs were also preserved at -80°C at a concentration of $1.0 \times 10^7/\text{mL}$ using the Bambanker serum-free medium (Wako, Richmond, VA).

Endothelial Progenitor Cell Characterization by Semi-quantitative Reverse-transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and FACS analysis. Total RNA was extracted before the first passage from cultured EPCs (approximately 2×10^6) using

the RNeasy Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's protocol. Any residual genomic DNA was eliminated by treatment with DNase (Ambion, Austin, TX). RNA was reverse-transcribed with Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) Reverse Transcriptase (RT) (Invitrogen Corporation; Carlsbad, CA). Negative controls contained RNA, but no M-MLV RT, while GAPDH was used as an internal positive control. PCR was carried out in a final volume of 50 μ l with 6 μ l of cDNA template, 0.75 μ l of forward and reverse primers (0.5 μ g/ μ l) (Qiagen, Valencia, CA) (Supplementary Table I), and 1.25 units of *Taq* DNA Polymerase (Amersham; Piscataway, NJ) on a Genius thermocycler (Techne Corporation; Minneapolis, MN). Initial denaturation for 4 minutes at 94°C was followed by 30 cycles of 1 minute at 94°C, 1 minute at 55°C for annealing, and 1 minute at 72°C (ARE THESE DETAILS NECESSARY?). The final step consisted of 7 minutes of extension at 72°C. PCR products were run on 2% agarose gels and visualized with ethidium bromide against a 100-bp ladder.

The expression of the monocyte marker CD14 was evaluated by direct immunofluorescence using standard techniques³⁶⁹ with a human monoclonal antibody directed against a porcine antigen (Coulter Immunology, Hialeah, FL). Immunofluorescence reactivity was determined by automated multi-parameter flow cytometry analyzing at least 10^4 cells (FACScan[®]; Becton Dickinson; Mountain View, CA).

Endothelial Progenitor Cell *In Vivo* Fluorescent Staining. Early passage (1–2) BM or peripheral-derived EPCs ($\sim 2.0 \times 10^5$ cells/well) were seeded on human fibronectin-coated

six-well plates (BD Biosciences, Mississauga, ON). The following day, attached cells were incubated with fluorescein *Griffonia simplicifolia* lectin I, isolectin B4 (Vector Laboratories, Burlingame, CA), acylated low-density lipoprotein labeled with 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI-ac-LDL; Biomedical Technologies, Stoughton, MA), and Topro-3 nuclear staining (Topro-3; Invitrogen, Carlsbad, CA). Using an inverted fluorescence microscope (Zeiss Axiovert, Toronto, ON), cells were examined for uptake of DiI-Ac-LDL, isolectin B4, and nucleus staining with Topro-3.

Migration Assays. Chemotactic migration assays were performed according to the original method described by Kucia et al.⁴⁵⁶. Briefly, cells were starved on fibronectin-coated six-well plates (BD Biosciences, Mississauga, ON) with 0.1% fetal bovine serum FBS for 24 hours. Cells were then placed in serum-free medium and equilibrated for 10 minutes at 37°C. The lower chambers of Corning® Transwell 24-well plates (polycarbonate membrane 8 mm pore size; BD Biosciences, Mississauga, ON) were filled with 650 mL of serum-free medium and 0.5% FBS containing either human SDF-1 (10, 100, and 200 ng/mL; R&D Systems, Minneapolis, MN), human VEGF (10, 50, and 100 ng/mL; R&D Systems, Minneapolis, MN), or medium alone (control). Subsequently, 2×10^5 cells were placed in the upper chamber and incubated for 6 hours at 37°C and 5% CO₂. The migrated cells on the lower side of the filter were fixed in methanol and stained with hematoxylin/eosin. Cell counting was performed in five random high-power fields (60x) for all time points and the results are expressed relative to baseline (control conditions). Results are given as the average of three experiments.

Assessment of SDF-1 and HIF-1 by Real-time Quantitative PCR. Total BM RNA was extracted using the RNeasy Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA), and RNA was reverse-transcribed using the MMLV-RT as described (Invitrogen Corporation; Carlsbad, CA). Quantitative assessment of SDF-1, HIF-1, and GAPDH mRNA levels was performed by real-time RT-PCR as detailed in the supplementary method section. The relative quantitation value of target, normalized to the endogenous control GAPDH (house-keeping) gene and relative to a calibrator, is expressed as $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (-fold difference), where $\Delta Ct = (Ct \text{ of target genes}) - (Ct \text{ of endogenous control gene, GAPDH})$, and $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ of samples for target gene}) - (\Delta Ct \text{ of calibrator for the target gene})$.

Statistical Analysis. Student's *t* test was used for comparisons. Data are presented as mean \pm standard deviation. Time-dependent changes were evaluated by ANOVA comparing data at each timepoint with the corresponding baseline. A level of $p < 0.05$ was considered statistically significant and all *p*-values are two-sided.

RESULTS

Chronic Ischemic Model. Fourteen miniswine (average weight, 53.0 ± 5.0 kg) were followed for an average of 92 ± 5 days after the creation of LAD stenosis. The mortality rate was 7%, as one animal died from hemorrhage caused by left atrial laceration. One animal was excluded because a significant myocardial infarction was observed, leaving 12 animals that were included in this study. All animals were in good health at the end of the study with no overt clinical signs of CHF. There were no significant changes in hematocrit or arterial blood gases on serial perioperative measures following the implantation of the occluder. A schematic representation of the proximal LAD occluding device is provided in Figure 16-a. Significant proximal LAD stenosis was documented for all animals with a mean diameter stenosis of $96 \pm 4\%$. Chronic stenosis of the LAD was progressively created as observed on the coronary angiogram at 3 months (Figures 16-c). The resulting narrowing created severe coronary stenosis without total LAD occlusion, and no significant collateral circulation was noted as already documented by Fallavollita et al.⁴⁹⁰. As troponin release occurs early after ischemic injury in the pig and the critical time for sampling is within the first hour³⁸³, troponin levels were measured 15 and 60 minutes as well as 24 and 48 hours following the implantation of the occluder. Troponin levels remained under 0.01mg/L in all animals. Moreover, continuous electrocardiogram recordings did not show any significant perioperative ST segment elevation while no significant hemodynamic changes were observed during the perioperative period.

Myocardial Dysfunction Assessment by Dobutamine Stress Echocardiography.

Transthoracic echocardiographic and DSE results are summarized in Table XV. Normal wall motion and wall thickening were observed at baseline studies, before surgery, and at rest of DSE tests 3 months following the intervention. Increased WMS and decreased wall thickening in the antero-septal wall were observed both at low and high dosage of dobutamine infusion. This indicated that the chronic LAD stenosis (90 days) induced a decrease in the anterior wall contractility confirming the underlying ischemic phenomenon. Normal wall motion was observed in all other visualized LV segments. Throughout all stages of DSE, dobutamine infusion produced a significant increase in FS and CO compared to rest and baseline. These results indicate well preserved compensation from non-ischemic segments.

Endothelial Progenitor Cell Phenotype and Numbers. EPCs were expanded *in vitro* from the isolated MNCs fraction as previously described. Adherent EPCs were identified 7 to 14 days following culture in complete EGM-2 medium as well-circumscribed cobblestone-appearing cells. These MNCs-derived adherent cells were positive for isolectin B4 staining and dil-ac-LDL uptake (Figure 18). Semi-quantitative RT-PCR showed that EPCs were positive for stem cell markers CD34 and CD133, expressed hematopoietic markers CD31 (PECAM-1), CD144 (VE-cadherin), von willebrand factor (vWF), and KDR (VEGFR-2), but were negative for the monocyte marker CD14 (data not shown). Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis further confirmed that the monocyte marker CD14 was not detectable at the cell surface before proceeding with experiments.

There were no differences in total peripheral MNCs isolated at each timepoint observed (Figure 17). As depicted in Figure 19, there was a decrease in the number of circulating EPCs at three months compared with baseline ($p<0.001$).

Endothelial Progenitor Cell Functional Assessment. Evaluation of the BM-derived EPC functional capacity was done by migration assays (Corning® Transwell 8mm polycarbonate membrane plates). The latter assays documented a reproducible and progressive decrease in EPCs chemotaxis along SDF-1 and VEGF gradients following LAD instrumentation (Figures 20-a, 20-b).

Alterations of BM Physiology by Cardiac Dysfunction. The effect of a chronic state of myocardial ischemia on the BM was evaluated by studying the expression levels of HIF-1 and SDF-1 in BM MNCs. Using fresh BM aspirates, whole BM MNCs were isolated using a Ficoll gradient. We evaluated BM-MNCs mRNA expression of HIF-1 and SDF-1 for all animals at every timepoints. The expression of these motomorphogens was maximally upregulated 45 days following LAD instrumentation ($p=0.008$). As demonstrated in Figure 6, chronic myocardial ischemia produced a biphasic response in mRNA expression with HIF-1 (Figure 21-a) and SDF-1 (Figure 21-b) initially upregulated 45 days following the intervention. Conversely, a relative decrease in mRNA expression at the end of the study (at 90 days) was found for both HIF-1 and SDF-1. Compared to baseline, only SDF-1 showed a significant decrease in mRNA expression at 3 months ($p=0.03$).

DISCUSSION

Mounting evidence from preclinical and clinical studies now support the concept that BM-derived cells are capable of inducing repair and, possibly, regeneration in various tissues and organs including the myocardium^{7, 169, 203, 228}. EPCs are a subtype of circulating BM-derived cells that have the ability to proliferate and differentiate into mature endothelial cells⁴⁹¹. Previous studies have shown that this process is involved in the prevention of endothelial dysfunction and cardiovascular disease progression⁴⁰³. BM-derived progenitor cells from patients with CHF have reduced homing ability to sites of ischemia and poorer neovascularization potential in models of hind limb ischemia⁴⁶¹. Kissel et al. recently reported that a functional exhaustion of BM-derived EPCs could account for the unfavorable LV remodeling process in patients with ischemic heart failure⁴¹². However, several questions remain concerning the kinetics of BM-derived EPCs mobilization at various clinical stages of CHF. Therefore, the objective of this study was to explore the functional capacity of BM-derived EPC in a reproducible swine model of myocardial ischemia. Our aims were also to investigate key underlying mechanisms involved in the mobilisation of BM-derived EPCs in patients with progressive CHF.

The major findings of the present study are: (1) chronic severe stenosis of the proximal LAD using the Delran occluder creates a reproducible chronic ischemic myocardium swine model, in accordance with prior evidence^{492, 493}; (2) progression towards myocardial ischemia was associated with an environment of active ischemia resulting in a decrease in the number of circulating EPCs at 3 months compared to baseline; (3) functional exhaustion of BM-derived EPCs was observed as attested by a

decreased chemotactic capacity of EPCs to SDF-1 and VEGF; (4) quantitative mRNA expression of HIF-1 and SDF-1 measured in the BM was maximally upregulated 45 days following LAD instrumentation, with a subsequent decrease of both genes at 90 days. EPC mobilization is a complex and multifaceted phenomenon with numerous elicited pathways according to injurious conditions. Among others, the stromal-derived factor 1 (SDF-1)/CXCR4 axis regulates the chemotaxis of BM progenitor cells through activation and regulation of integrin molecules²⁸⁷. New hormonal hypotheses have recently emerged and proposed evidence showing that mineralocorticoids could induce accelerated senescence of progenitor cells leading to their reduced survival in HF⁴⁹⁴. Standard mechanisms hypothesized also that the upregulation of SDF-1 during hypoxia can be facilitated by the transcription factor hypoxic-inducible factor 1 (HIF-1)⁴²⁶. SDF-1 activation is promoted by HIF-1 expression, resulting in an increased expression of SDF-1 in ischemic tissues⁴²⁶. Upon entering the BM environment, SDF-1 activates several proteinases expressed by BM stromal cells such as matrix metalloproteinases 9 (MMP-9)²⁹³. MMP-9 is closely involved in the egress of BM-derived EPCs into the circulation through BM sinusoids²⁹⁴. In the present study, there was a biphasic response in mRNA expression of both HIF-1 and SDF-1 genes. These genes were initially upregulated 45 days following the intervention, while we noted a subsequent relative decrease in mRNA expression of SDF-1 at the end of the study. This differential mRNA expression could be explained by a modification in BM-cell biology leading to a functional migratory exhaustion of BM-derived EPCs mobilized in the setting of chronic ischemic myocardial injury. Hence, the local microenvironment, also termed the « stem cell niche », provides

essential cues to maintain stem and progenitor cell functions and direct cell fate decisions in the bone marrow. A disturbed niche might lead to cell exhaustion⁴⁹⁵.

Clinical Correlation

We proposed that chronic myocardial ischemia could alter the BM physiology through an adverse alteration of BM-derived EPC number and migratory capacity in the setting of myocardial hibernation/ischemia. Our aim was to study the kinetics of BM-derived EPCs mobilization according to various stages of progressive ischemia in a clinically relevant, large animal model of myocardial ischemia. We postulate that, in the setting of chronic ischemia, there is a state of BM functional exhaustion (as evidenced by decreased EPC numbers and chemotactic properties) that could partially be mediated through a relative decrease in HIF-1 and SDF-1 expression over time. The concept of interdependence of the BM and the heart, supported by our findings, is consistent with previous reports on BM-derived cardiac progenitors in chronic ischemic cardiomyopathies^{318, 496}. The present observations have important conceptual implications in the understanding of BM-dependent cardiac repair and regeneration, and provide a rationale for further studies aimed at optimizing therapeutic cardiac cell-based therapy by modulation of BM-derived progenitors or BM microenvironment to promote progenitor cell mobilization. This large model provides a reproducible translational platform to investigate the role of more established EPCs-modulating agents such as granulocyte colony stimulating factor⁴²¹, statins⁴³⁵ or novel pharmacological strategies to mobilize BM-derived cells. Finally, our findings highlight that the BM functional response (through quantitative and qualitative assessment of its progenitor cells i.e. EPCs in this

study) may constitute a relevant clinical target, potentially amenable to pharmacological manipulation in order to promote cardiac healing after ischemic injury.

CONCLUSION

This study of altered BM-derived progenitor cell biology in the setting of chronic myocardial ischemia has shown that mechanisms driving the differences in BM-derived EPC mobilization can be investigated with a miniswine model of chronic myocardial ischemia. Progressive functional exhaustion of BM-derived EPCs occurs with time and is associated with a decreased migratory capacity related to a relative decrease in SDF-1 and HIF-1 mRNA expression. Thus, an interaction between the heart and the BM likely occurs. Understanding the basic cellular changes and potential functional impairment occurring in patients during the sequence of events leading to progressive CHF development will be critical when establishing the clinical relevance of the crosstalk in the BM-cardiac axis.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M.P. Mathieu, S. Blanchet, J. Lebel, S. Gilligan, P. Geoffroy and D. Lauzier for their precious help in this study, and Dr Yan Fen Shi for the echocardiographic analysis. Drs Maltais, Ly and Perrault are scholars of Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). Dr. Perrault is supported by the National Institute of Health (NIH), the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Department of Surgery, Université de Montréal. Dr Ly is supported by the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC), the Cell Network of the FRSQ and the Stem Cell Network of Canada.

CONFLICT OF INTEREST

None to disclose.

TABLES

Table XV. Echocardiographic results

Ischemic regional function

	Thickness (d) (cm)	Thickness (s) (cm)	Thickening (%)	WMS
Baseline	0.658±0.073	1.094±0.139	66.2±6.3	1.00±0.00
DSE(3 months)				
Rest	0.786±0.096	1.324±0.059	70.9±25.1	1.00±0.00
Low Dosage	1.040±0.200	1.674±0.221	63.4±22.1	2.00±0.63
High Dosage	0.987±0.189	1.484±0.437	49.7±30.7	2.33±0.82
Recovery	0.861±0.109	1.292±0.207	49.9±13.1	1.83±0.41

Left Ventricular Global Function

	LVDd (cm)	LVDs (cm)	FS (%)	CO l/min	HR bpm
Baseline	4.27±0.45	2.84±0.30	33.3±4.6	2.97±1.15	115±23
DSE (3 months)					
Rest	5.29±0.33	3.26±0.24	38.3±5.2	4.92±1.19	85±12
Low Dosage	4.49±0.82	2.13±0.49	52.4±6.9*	7.38±0.64	122±20
High Dosage	4.42±0.46	2.23±0.62	49.8±11.0*	9.22±0.66	136±61
Recovery	4.81±0.47	3.15±0.30	34.3±5.6	5.24±1.42	98±10

CO=cardiac output; DSE=dobutamine stress echocardiography at 3 months; FS=fractional shortening; LVDd=left ventricular dimension (at end-diastole); LVDs=left ventricular dimension (at end-systole); TTE = transthoracic echocardiography; WMS=wall motion score. *p<0.05 compared to rest.

FIGURES

Figure 16.

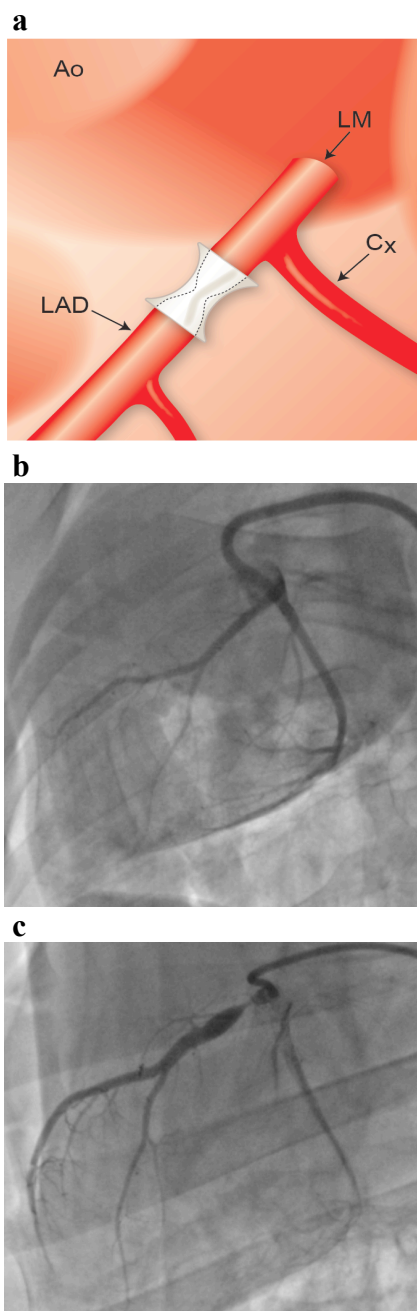


Figure 16. Chronic narrowing of the proximal left anterior descending coronary artery (LAD). A left anterior thoracotomy was performed to position a 1.5 to 2.25 mm rigid Delran occluder device on the proximal LAD. **Figure 16-a:** Schematic representation of the proximal LAD occluding device. **Figure 16-b:** Coronary angiogram performed at baseline following LAD instrumentation. **Figure 16-c:** Coronary angiogram showing severe proximal LAD stenosis 3 months following the implantation of the occluding device with few collaterals.

Figure 17.

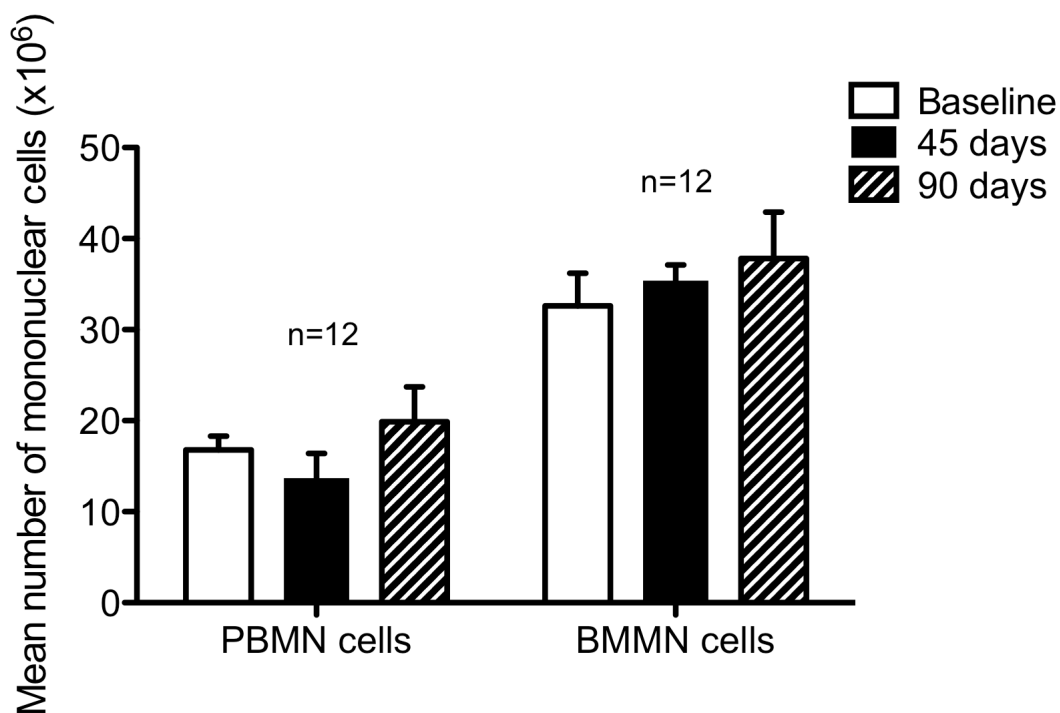


Figure 17. Mean number of peripheral blood (PB) and bone marrow (BM)-derived mononuclear cells at three timepoints following LAD instrumentation (baseline, 45 days, 90 days). Fresh peripheral blood and BM mononuclear cells (MNCs) were isolated by Ficoll Histopaque density-gradient centrifugation. There were no differences in the total peripheral or BM MNCs isolated for each timepoint observed ($p=NS$).

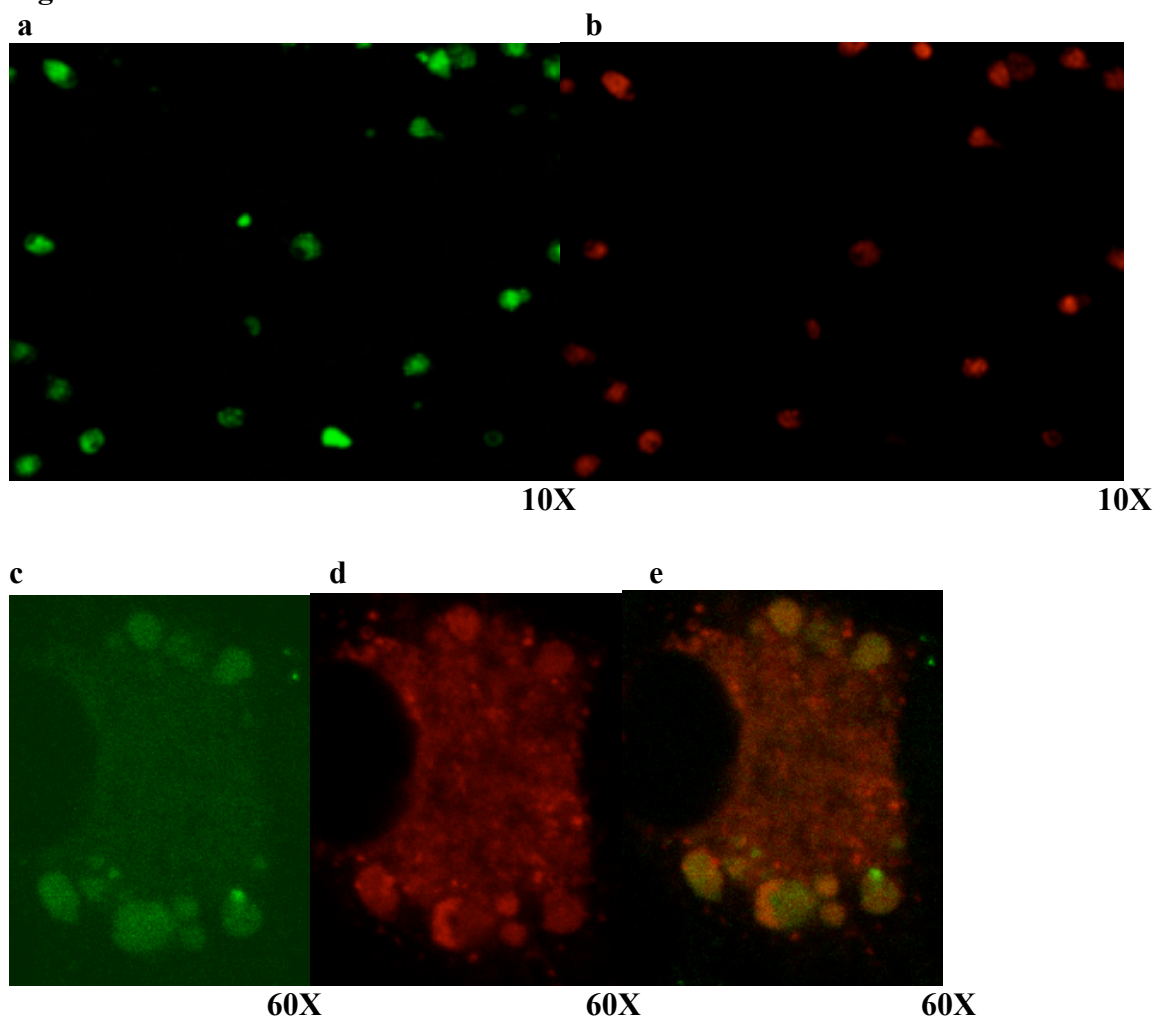
Figure 18

Figure 18. Direct fluorescent staining of endothelial progenitor cells from fresh mononuclear cells. Using an inverted fluorescence microscope, cells were examined for isolectin B4 (green, Figure 18-a; 18-c) and dil-ac-LDL uptake (red, Figure 18-b; 18-d). EPCs adherent cells were considered for analysis if there were positive for isolectin B4 staining and dil-ac-LDL uptake (yellow, Figure 18-e).

Figure 19.

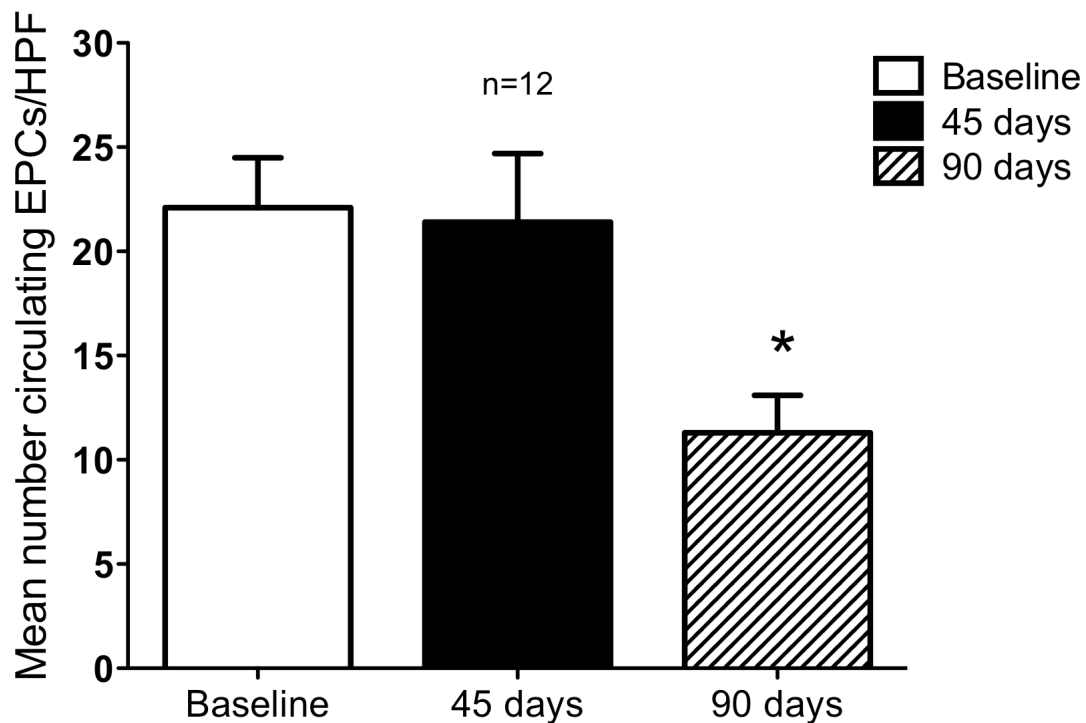


Figure 19. Mean number of circulating endothelial progenitor cells (EPCs) at three timepoints following LAD instrumentation (baseline, 45 days, 90 days). Progressive myocardial ischemia resulted in a decreased number of circulating EPCs 3 months following LAD instrumentation ($p < 0.001$).

Figure 20-a.

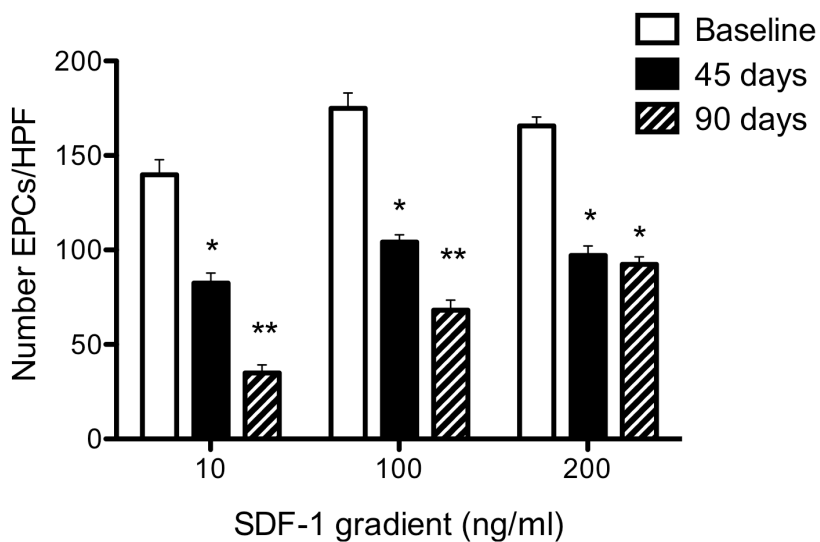


Figure 20-b.

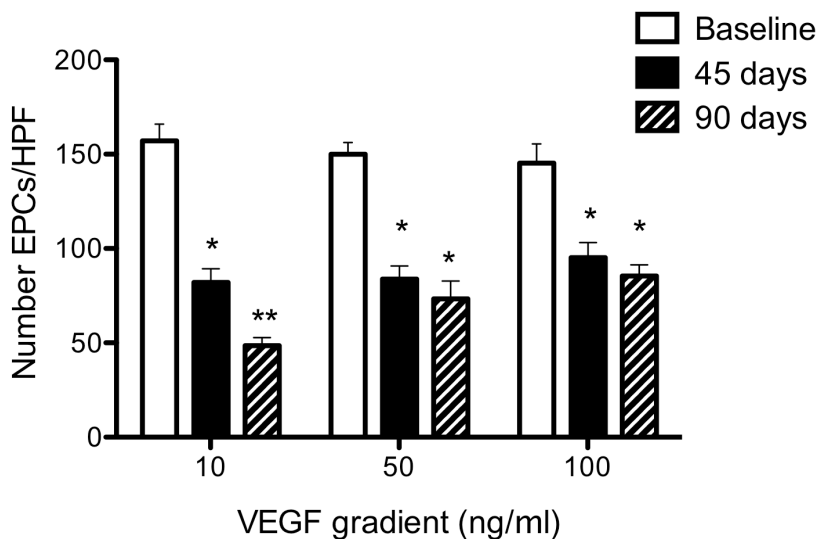


Figure 5. Migration assays using cultured EPCs. The evaluation of BM-derived EPCs migratory capacity was done using hSDF-1 (10, 100, and 200 ng/mL) and hVEGF (10, 50, and 100 ng/mL). Cell numbers of at least five high-power fields (100 x) were counted for all timepoints, and results are compared to previous timepoint. **Figure 5-a.** For all concentrations used (except 200ng/mL at 90 days), we observed a proportionate decrease in the migratory capacity of EPCs to SDF-1 (*p<0.05; and **p<0.05 compared with 45 days). **Figure 5-b.** Functional studies using VEGF showed also a decreased migration, however results obtained were less pronounced (*p<0.05; **p<0.05 compared with 45 days).

Figure 21-a.

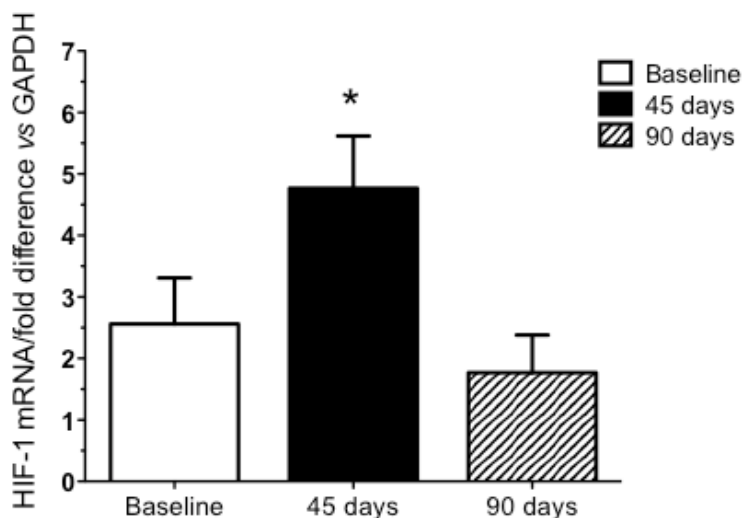


Figure 21-b

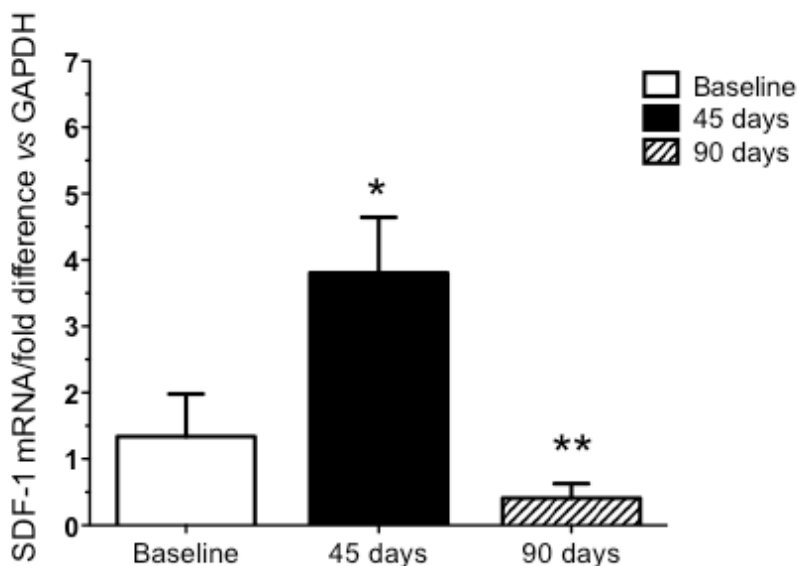


Figure 21. *Changes in the mRNA expression of HIF-1 and SDF-1 in the BM of swines according to three timepoints following LAD instrumentation (baseline, 45 days, 90 days).* Quantitative assessment of HIF-1, SDF-1, and GAPDH mRNA levels was performed by real-time RT-PCR. The relative quantitation value of the target is normalized to the endogenous control GAPDH (house-keeping) gene. **Figure 21-a.** HIF-1 was upregulated 45 days following the intervention, and returned to baseline at the end of the study (90 days) (* $p < 0.001$). **Figure 21-b.** SDF-1 mRNA expression was also initially increased (* $p < 0.001$), and was significantly decreased at the end of the study (** $p = 0.03$).

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

Real-time RT-PCR. For analysis of SDF-1 and HIF-1 mRNA levels, total BM mRNA was isolated using the RNeasy Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA), and RNA was reverse-transcribed as described using the MMLV-RT (Invitrogen Corporation; Carlsbad, CA). Quantitative assessment of SDF-1, HIF-1, and GAPDH levels was performed by real-time RT-PCR using an ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System (ABI, Foster City, CA). All of the primer sequences are provided in Table I. A 25 μ l reaction mixture containing 12.5 μ l SYBR Green PCR Master Mix (primers) and 10 ng of cDNA template was used. The threshold cycle (Ct), i.e., the cycle number at which the amount of amplified gene of interest reached a fixed threshold, was subsequently determined. Relative quantitation of SDF-1 and HIF-1 mRNA expression was performed with the comparative Ct method. The relative quantitation value of target, normalized to the endogenous control GAPDH (house-keeping) gene and relative to a calibrator, is expressed as $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (-fold difference), where $\Delta Ct = (Ct \text{ of target genes}) - (Ct \text{ of endogenous control gene, GAPDH})$, and $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ of samples for target gene}) - (\Delta Ct \text{ of calibrator for the target gene})$.

TABLE XVI

List of primers used for semi-quantitative and real-time quantitative RT-PCR

mRNA of interest	Primer	Primer sequences
GAPDH	Forward	5'-TGAAGGTCGGAGTGAACGGA-3'
	Reverse	5'-CCATTGATGACAAGCTTCCC-3'
HIF-1	Forward	5'-TGACGTGCTTGGTGCTGAT-3'
	Reverse	5'-TGGCAAGCATCCTGTACTGT-3'
SDF-1	Forward	5'-GAGCCAACATCAAGCATCTC-3'
	Reverse	5'-GCTCTCAAAGAATCGGCAAG-3'
CD14	Forward	5'-GTTGCTGCTGCTGCTGCC-3'
	Reverse	5'-AAGTTGCAGACGCAGCGGA-3'
CD31 (PECAM-1)	Forward	5'-GAACGGAAGGCTCCTTGA-3'
	Reverse	5'-AGGGCAGGTTTCATTAAATAAGTGC-3'
CD34	Forward	5'-GATTGCACTGGTCACCTCGG-3'
	Reverse	5'-TCCGTGTAATAAGGGTCTTCGC-3'
CD133	Forward	5'-GGAGAAATGCACCAGCGACA-3'
	Reverse	5'-CCTGGTGATTTGCCACAAAAC-3'
CD144 (VE-cadherin)	Forward	5'-CAACGAGGGCATCATCAAGC-3'
	Reverse	5'-TCGATGGTGGGGTCTGTGG-3'
Von Willebrand factor (VWf)	Forward	5'-TGCTCTGGGTTTCGTCAGAGTC-3'
	Reverse	5'-CAGGCAAGTCACTGTGTGGC-3'
KDR (VEGFR-2)	Forward	5'-TCACAATTCCAAAAGTGATCGG-3'
	Reverse	5'-GGTCACTAACAGAAGCAATAAATGG-3'

Chapitre 9 : Discussion

L'IC est une pathologie fréquente affectant chaque année plus de 400 000 Canadiens¹. La prévalence de cette pathologie est en hausse considérable dans les pays industrialisés⁴. Cette entité résulte d'un état de déséquilibre chronique complexe qui complique plusieurs maladies affectant le myocarde. L'impact à long terme et les mécanismes physiopathologiques de certaines nouvelles stratégies de traitement (revascularisation OPCAB, thérapie cellulaire) demeurent obscurs. Au cours de cette thèse, nous avons tenté de démontrer que 1) l'évolution chirurgicale à long terme des patients qui se présentent en IC grave est nettement défavorable malgré l'utilisation des techniques actuelles de revascularisation chirurgicale à cœur battant; 2) la thérapie cellulaire et, plus spécifiquement, l'injection intracoronaire précoce de milieu de culture cellulaire (effet paracrine), permet d'améliorer la récupération fonctionnelle précoce du VG suite à un IDM; et 3) la mobilisation de l'axe cœur-MO représente un mécanisme de réponse important lors de l'établissement d'un événement ischémique chronique affectant le myocarde.

Résumé et originalité de la thèse

Dans le premier chapitre, nous avons exploré la définition, l'importance clinique et les mécanismes physiopathologiques impliqués dans le l'évolution progressive de la défaillance cardiaque. Nous avons introduit plusieurs définitions et concepts physiologiques importants pour la compréhension des mécanismes qui sous-tendent cette pathologie, et nous nous sommes attardés à l'exploration des limites inhérentes au

traitement médical et chirurgical de cette pathologie complexe. Malgré l'éventail de traitements chirurgicaux actuellement disponibles, l'évolution à court ou moyen terme des patients présentant cette pathologie chronique reste sous-optimale. L'arsenal thérapeutique chirurgical distingue néanmoins deux approches de traitement différentes pour ces patients⁴⁰, soit les stratégies de réparation ou de remplacement. Nous avons analysé ces différentes approches en détail dans le premier chapitre afin d'identifier et de mettre en perspective les difficultés liées au traitement, au pronostic et au suivi à long terme des patients présentant une défaillance du VG. Grâce à cette analyse approfondie des limites du traitement standard, nous pouvons justifier et comprendre l'avènement de la thérapie cellulaire comme source alternative ou additionnelle de traitement chez ces patients. Parmi les techniques de réparation actuelles, la revascularisation OPCAB représente certainement une approche intéressante pour traiter cette population à haut risque. Plusieurs auteurs proposent cette technique lorsque la revascularisation des patients avec dysfonction du VG est envisagée^{9, 96}. Néanmoins, la pauvreté de données probantes nous empêche d'évaluer le rôle à long terme de ce type de revascularisation sur le devenir des patients présentant une diminution importante de la FÉVG.

Dans le manuscrit #1 (Chapitre 2), nous avons analysé l'évolution à long terme des patients qui présentent une diminution de la FÉVG dans une analyse rétrospective de données récoltées prospectivement de 1996 à 2006 à l'ICM. Cette étude rapporte les résultats à long terme (10 ans) de 1250 patients ayant subi une revascularisation OPCAB. Dans ce manuscrit, nous avons comparé l'évolution de 137 patients avec une FÉVG $\leq 35\%$ à celle d'un groupe de patients avec une fonction ventriculaire normale

(FÉVG > 35 %). La mortalité hospitalière à 30 jours observée était comparable dans les deux groupes à l'étude (1,5 % FÉVG > 35 % vs. 2,9 % FÉVG ≤ 35 %; $p = 0,19$). La survie observée à 10 ans a cependant été nettement inférieure chez les patients avec une FÉVG ≤ 35 % ($44 \pm 7\%$ vs. $76 \pm 2\%$, $p < 0,001$), et cet écart est demeuré significatif même après ajustement des courbes pour les différences entre les groupes (Figure 3, $p = 0,04$). La survie sans événement cardiaque ajustée à 10 ans était considérablement supérieure dans le groupe avec une fonction ventriculaire normale (Figure 4, $p = 0,008$). Après ajustement, la survie pour un devenir combiné à 10 ans comprenant la survie sans événement cardiaque, mort subite, retour pour revascularisation, angine instable ou défaillance cardiaque était comparable entre les deux groupes (Figure 5, $p = 0,48$). Cette étude décrit de façon rigoureuse l'évolution à long terme des patients qui subissent une revascularisation OPCAB avec une dysfonction ventriculaire gauche. Elle a démontré que cette stratégie de réparation pouvait être utilisée adéquatement et de façon sécuritaire pour ce groupe de patients. Ce travail permet aussi d'observer les limites de la revascularisation chez cette population de patients, puisque l'évolution des patients avec une diminution de la FÉVG est défavorable, en comparaison à ceux dont la fonction ventriculaire est normale. Cette constatation fait office d'introduction pour les chapitres suivants, qui s'intéressent à la thérapie cellulaire.

Afin de bien cerner les mécanismes qui sous-tendent l'application de la thérapie cellulaire lors d'un événement ischémique aigu, nous avons d'abord proposé, dans le chapitre 3, une revue approfondie des mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l'IDM. Un des aspects primordiaux présenté dans ce chapitre est le phénomène de

remodelage progressif. En réponse à un stress ischémique répété et significatif, plusieurs mécanismes compensateurs (physiologiques, cellulaires et moléculaires) sont activés pour tenter de s'adapter aux surcharges de volume et de pression enregistrées au niveau du myocarde¹⁴. La persistance de l'insulte myocardique entraîne un déséquilibre progressif de ces différentes voies, lequel engendre une augmentation de la consommation en oxygène du myocarde, une diminution de la perfusion coronarienne sous-endocardique, un déséquilibre énergétique et une perte irréversible de la fonction du VG¹¹⁷. Nous avons ensuite introduit le concept de thérapie cellulaire à titre de traitement potentiel pour freiner la perte de fonction associée à un dommage ischémique aigu prolongé. Dans le contexte de cette thèse de doctorat et des deux manuscrits présentés pour l'obtention du grade postulé, nous nous sommes particulièrement penchés sur les hypothèses paracrines de ce nouveau mode de traitement.

Dans le manuscrit #2 (Chapitre 4), nous avons exploré, dans une revue de littérature approfondie, l'effet paracrine des CS. L'effet paracrine permet de supposer que les cellules transplantées produisent des médiateurs inflammatoires (peptides actifs) qui sont bénéfiques et induisent la réparation du myocarde²¹³. En réponse à une insulte cardiaque ischémique, plusieurs mécanismes mal adaptés se mettent en marche pour altérer la dimension et la fonction du myocarde : ce processus complexe est appelé remodelage¹¹⁵. Les cellules souches transplantées agissent au niveau du myocarde en altérant plusieurs mécanismes propres au remodelage tels que les modifications de la matrice extracellulaire, la modulation de cytokines inflammatoires, le frein des phénomènes d'apoptose ou la stimulation de phénomènes endogènes de réparation

cellulaire¹¹⁸. Ces processus sont les cibles principales proposées pour expliquer les différents modes d'action paracrine de la thérapie cellulaire en période ischémique aiguë.

Le manuscrit #3 (Chapitre 5) étudie ces hypothèses à partir d'un modèle translationnel d'IDM chez le porc. Dans cet article original, nous présentons une étude utilisant un modèle animal chez le porc qui nous permet d'isoler l'action paracrine des CSM dans un phénomène ischémique aigu à 7 jours. Nous avons démontré qu'un traitement précoce suivant un IDM, utilisant le milieu de culture cellulaire conditionné produit par les CSM, résultait en une diminution importante des troponines T sanguines mesurées et une amélioration significative de la fonction du myocarde à 7 jours (analysée par échocardiographie transthoracique) (figures 10 et 11). Nous avons de plus observé une réduction des dommages infligés au myocarde en démontrant une réduction de la fibrose dans la zone à risque chez le groupe traité avec le milieu conditionné en comparaison avec le groupe témoin (figure 12). L'impact sur le remodelage ventriculaire de ce traitement a aussi été étudié dans ce modèle expérimental. Nous avons observé une diminution significative de l'apoptose dans la zone de transition de l'infarctus, une expression de facteurs anti-apoptotiques (Galectin-3, Smad-5, sRFP-1 et -4) et la présence de facteurs anti-remodelage (TIMP). Ainsi, nous avons pu démontrer que l'injection de facteurs biologiquement actifs seuls produits par les CSM favorise une protection précoce du myocarde suite à un événement ischémique aigu. Ces constatations nous ont permis d'étudier l'effet paracrine indirect des cellules souches en laboratoire et nous autorisent à entrevoir ce mode de thérapie comme une nouvelle option de traitement chez les patients souffrant de maladies cardiovasculaires.

Dans la troisième et dernière partie de cette thèse de doctorat, nous avons évalué les mécanismes qui sous-tendent potentiellement la réparation cellulaire dans le contexte d'une pathologie cardiovasculaire ischémique chronique. Nous avons d'abord introduit, dans le manuscrit #4 (Chapitre 7), le rôle des CEP et le concept de l'axe cœur/MO dans le contexte de l'IC. Nous avons ensuite présenté, dans une revue de littérature approfondie, la relation étroite entre la mobilisation des CEP dérivées de la MO et la CMI. Nous avons établi que les CEP pouvaient représenter de bons marqueurs diagnostiques et pronostiques des maladies cardiovasculaires⁴⁰². Nous avons démontré que plusieurs facteurs de risque cardiovasculaire (diabète, tabac) contribuaient à l'artériogénèse en induisant des lésions et des dysfonctions endothéliales, phénomènes intimement liés aux CEP. D'importants travaux de recherche qui permettent de supposer une corrélation étroite entre le nombre de CEP, le score de Framingham et le degré de gravité clinique de l'IC ont été rapportés⁴⁰³. Ensuite, nous avons exploré le concept important qu'est l'axe cœur/MO en thérapie cellulaire de réparation chronique du myocarde. Les mécanismes qui sous-tendent la mobilisation des CEP provenant de la MO sont complexes et encore mal définis. La revue de littérature présentée nous a permis de documenter que le facteur SDF-1 se retrouve au centre des mécanismes impliqués dans l'adhésion et la libération des CEP de la MO^{288, 289}. Enfin, nous avons proposé un modèle récapitulatif du rôle des CEP provenant de la MO, lequel suggère que ce mode de réparation soit activé suite à des insultes ischémiques cellulaires répétées (accumulation de ROS, phénomènes apoptotiques), mais que cet axe réflexe s'épuise graduellement pour contribuer à

l'évolution de la CMI (figure 15). Ce manuscrit introduit les travaux de recherche effectués par le candidat au doctorat dans le manuscrit #5.

Le dernier manuscrit #5, présenté au chapitre 8, intègre les concepts introduits dans le manuscrit #4. Dans cette dernière publication, nous avons mis en place un modèle animal d'ischémie chronique reproductible qui nous a permis d'évaluer à différents moments le nombre et les fonctions des CEP provenant de la MO. Ainsi, nous avons reproduit un modèle d'ischémie chronique tel que décrit par Fallavollita et *coll.*⁴⁹⁷, avec pour objectif de l'adapter à l'étude de l'axe cœur/MO et de proposer un modèle translationnel qui permette d'analyser les mécanismes moléculaires menant à la libération et à l'épuisement fonctionnel des CEP dérivées de la MO. Nous avons d'abord démontré qu'une occlusion chronique de l'IVA à 3 mois (% de réduction du diamètre moyen de l'artère coronaire : $96 \pm 4\%$, $n = 12$) provoquait de manière reproductible une dysfonction ventriculaire gauche (figure 16 et tableau XV). Dans ce modèle, nous avons de plus observé une viabilité préservée du myocarde antérieur dysfonctionnel en utilisant l'ETT avec stimulation à la dobutamine (5-40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) (tableau XV). De plus, nous avons été en mesure d'observer une diminution progressive significative à 90 jours du niveau circulant de CEP dérivées de la MO (figure 119). Ces observations ont aussi été associées à une diminution progressive (45 et 90 jours) de la fonction des CEP, telle que démontrée par une diminution de la migration des cellules en réponse au VEGF (10-200 ng/mL) ou au SDF-1 (10-100 ng/mL) (figure 20). Enfin, la PCR quantitative nous a montré que ce phénomène d'épuisement pourrait être lié à une réponse biphasique de l'expression de l'ARN messager de HIF-1 et SDF-1 (figure 21). Une diminution relative

de ces deux facteurs pourrait ainsi contribuer à la diminution fonctionnelle des CEP dérivées de la MO. Ces travaux de recherche nous ont permis de produire un modèle de recherche translationnel pertinent afin de mieux étudier une situation clinique (ischémie chronique du myocarde) et de mieux comprendre les mécanismes qui sont à la base de cette libération des CEP provenant de la MO.

Limitations et perspectives futures

Toutes les études présentées ici comportent certaines limitations inhérentes. Le premier manuscrit à l'étude est exclusivement clinique, tout en étant étroitement lié aux autres travaux présentés dans cette thèse de doctorat. Sa nature observationnelle nous permet de mettre en évidence certaines lacunes uniques et spécifiques à ce type d'études. Dans le manuscrit #1, les données ont été récoltées de manière prospective mais analysées de manière rétrospective en s'intéressant à un problème clinique spécifique : l'évolution à long terme des patients qui se présentent avec une dysfonction ventriculaire gauche et qui subissent une revascularisation à cœur battant. Bien que les analyses statistiques effectuées dans ce travail tentent de corriger les différences majeures entre les groupes analysés (FÉVG normale ou $\leq 35\%$), ce type d'étude introduit inévitablement un important biais de sélection. De plus, il est essentiel de définir clairement le concept de réussite du traitement chez cette cohorte de patients à haut risque. Dans le manuscrit présenté, nous avons observé, après ajustement des courbes pour les différences entre les groupes, que la survie globale ou sans événement cardiaque ajustée à 10 ans était considérablement supérieure pour le groupe avec une fonction ventriculaire normale. Néanmoins, la survie pour un devenir combiné à 10 ans, comprenant la survie sans événement cardiaque, mort subite, retour pour revascularisation, angine instable ou défaillance cardiaque, était comparable dans les deux groupes. Plusieurs considèrent que ce dernier paramètre reflète davantage l'évolution réelle de ce type de patients constamment confrontés avec le fardeau de cette pathologie chronique. Le suivi médical serré et les programmes de rétablissement ou de remise en forme font partie intégrante

des résultats obtenus dans cette population. Bien que plus coûteuses et difficiles à orchestrer, il apparaît alors évident que des études randomisées prospectives tenant compte de ces paramètres et portant sur l'évolution à long terme de ces patients à haut risque seront nécessaires. Arom *et coll.* ont ainsi observé, dans une brève étude randomisée prospective, que la revascularisation OPCAB chez les patients souffrant de dysfonction ventriculaire gauche importante se comparait aux résultats postopératoires immédiats obtenus avec la revascularisation ONCAB⁹⁶.

La seconde portion de cette thèse porte sur la thérapie cellulaire et les mécanismes de réparation aiguë du myocarde. Les manuscrits originaux présentés (#3, #5) font appel à des modèles animaux qui tentent de reproduire une situation clinique pour expliquer des phénomènes cellulaires de réparation du myocarde. Ces modèles translationnels encadrés nous permettent de pallier les limites acceptables de la recherche chez les êtres humains (la création délibérée d'un événement ischémique).

De manière plus spécifique, chacun des manuscrits proposés pour l'obtention du grade postulé comporte des limites qui lui sont propres. Dans le manuscrit #3, l'une des limitations est liée à la quantité de peptides vasoactifs injectés au site de l'IDM. Dans ce modèle expérimental, un conditionnement préalable par la création d'une ischémie transitoire brève avant l'injection du milieu conditionné aurait pu potentialiser l'effet de la thérapie dans le micro-environnement cellulaire étudié. Néanmoins, nous avons tenté de pallier ce problème en soumettant les CSM à un milieu cellulaire hypoxémique *in vitro* avant l'injection des facteurs de croissance au niveau du myocarde. Plusieurs

auteurs ont démontré que l'ischémie produit une altération importante de l'expression des gènes des CSM et cause la production de cytokines et de molécules inflammatoires, lesquelles ont des propriétés anti-apoptotiques et pro-angiogéniques^{223, 391}. Dans notre modèle, le milieu de culture conditionné contenant les facteurs biologiques actifs a été recueilli après 16 heures d'hypoxémie. De plus, au cours de cette étude, nous avons investigué le rôle d'une seule injection intracoronaire de milieu conditionné. Or, nous savons que plusieurs peptides vasoactifs ont une demi-vie très courte, particulièrement dans un environnement ischémique hostile⁴⁹⁸. L'utilisation de plusieurs injections de milieu conditionné ou d'une molécule permettant la rétention du peptide vasoactif au niveau du myocarde ischémique (construction de nanoparticules, thérapie génique ciblée) aurait peut-être permis d'observer une récupération plus importante de la fonction du VG. Enfin, la technique d'injection intracoronaire de milieu conditionné peut comporter certaines limitations méthodologiques. Plusieurs types cellulaires ont initialement été administrés à l'aide de cette méthode qui permet l'injection homogène d'un maximum de cellules au site du dommage au cours du premier passage¹⁹³⁻¹⁹⁶. Néanmoins, il apparaît évident que l'injection artérielle intracoronaire non sélective de milieu conditionné au niveau du myocarde entraîne une migration des facteurs de croissance hors des vaisseaux vers le tissu environnant. Les études animales préalables effectuées chez le rat portent d'ailleurs sur l'injection de ces peptides vasoactifs directement au niveau du myocarde^{222, 282}. L'administration locale du milieu conditionné dans le myocarde ischémique pourrait contribuer à augmenter la rétention des facteurs de croissance dans ce micro-environnement ischémique hostile.

Dans le manuscrit #5, nous avons choisi de façon arbitraire l'échéance de 45 jours pour étudier la fonction des CEP provenant de la MO. Or, cette période intermédiaire choisie pour analyser la fonction des CEP repose sur une extrapolation des travaux de Fallavollita *et coll.*, qui décrivent la mise au point progressive d'un modèle ischémique d'hibernation chronique du myocarde sur une période de 3 mois⁴⁹⁹. Une étude angiographique du degré d'occlusion à 45 jours aurait permis d'appuyer davantage les résultats présentés. Bien qu'aucun animal avec une occlusion complète de l'IVA n'ait été inclus dans cette étude, on peut supposer qu'une diminution partielle de l'expression de l'ARNm de HIF-1 et SDF-1 à 3 mois pourrait représenter une perte du signal ischémique par la création de vaisseaux collatéraux. Il est cependant important de noter que les travaux porcins rapportés qui étudient cet aspect décrivent peu de vaisseaux collatéraux chez les animaux présentant un rétrécissement important de l'IVA, en comparaison avec une occlusion complète de l'artère⁴⁹³. Dans ce travail de recherche, nous n'avons observé que peu de reperfusion par vaisseaux collatéraux endogènes.

D'autres études expérimentales et translationnelles devront être réalisées pour tenter de mieux comprendre les mécanismes de réparation cellulaire et leur rôle dans la protection et la régénération du myocarde ischémique. Par exemple, nous devons instaurer des protocoles de recherche éthiques et bien structurés nous permettant d'étudier la fonction des CEP dérivées de la MO chez l'être humain. À ce titre, en collaboration avec le laboratoire du Dr Jean-François Tanguay, nous avons récemment reçu l'approbation nécessaire au lancement du projet REPAIR-ICM (Impact d'une diminution de la fonction du ventricule gauche sur la récupération fonctionnelle et la

viabilité des cellules endothéliales progénitrices chez les patients avec une intervention de revascularisation coronarienne à l'Institut de Cardiologie de Montréal, Annexe 2; #09-1190). Cette étude examinera la récupération fonctionnelle des CEP circulantes après la revascularisation des patients avec dysfonction ventriculaire gauche en comparaison à ceux qui ont une fonction ventriculaire normale (annexe 2). Cette étude débutera sous peu à l'ICM.

Chapitre 10 : Conclusion

Nous avons présenté diverses approches médicales et chirurgicales pour le traitement des patients souffrant d'une dysfonction ventriculaire gauche. Plusieurs nouvelles techniques chirurgicales sont mises en œuvre pour améliorer l'évolution des patients qui présentent une diminution importante de la FÉVG. L'étude approfondie des limites actuelles de la chirurgie et l'analyse des résultats décevants liés à ces stratégies nous permettent de comprendre l'avènement de nouvelles voies de traitement comme la thérapie cellulaire. Une bonne compréhension des mécanismes cellulaires qui sous-tendent l'application de ce nouveau mode de traitement est primordiale à la mise en place de protocoles expérimentaux efficaces et sécuritaires qui nous permettront d'améliorer l'évolution des patients avec une CMI.

La recherche translationnelle est donc le « chaînon manquant » entre la recherche fondamentale et la recherche clinique. Elle permet d'accélérer la compréhension et l'applicabilité de traitements innovateurs aux bénéfices potentiels pour le patient. Elle sert donc de fil conducteur entre la recherche et les soins et permet aux patients de bénéficier plus rapidement des innovations diagnostiques et thérapeutiques. De nos jours, les progrès en matière de thérapie cellulaire de l'IC sont en partie dus à une meilleure connaissance de la mobilisation, de la biologie et des caractéristiques des CS utilisées dans des modèles animaux. Ces travaux de recherche nous permettent d'envisager les bienfaits et conséquences néfastes potentiels qui pourraient survenir chez l'être humain (amélioration FÉVG vs. arythmies/mort subite). Ceci permet dès lors la mise au point de traitements mieux ciblés pour cette population de patients à haut risque.

En résumé, nous avons montré que l'évolution à long terme des patients qui subissent une revascularisation coronarienne à cœur battant avec dysfonction du VG est encore très précaire, en comparaison à celle de patients qui présentent une fonction ventriculaire normale. De cette façon, nous avons introduit le concept de thérapie cellulaire, une stratégie nous permettant d'améliorer la récupération du myocarde après un événement ischémique aigu ou chronique. Nous avons démontré l'effet bénéfique paracrine potentiel à 7 jours de l'injection intracoronaire d'un milieu de culture cellulaire conditionné à la suite d'un dommage ischémique aigu. Ces travaux nous ont permis d'établir une corrélation entre l'injection de peptides vasoactifs provenant de CSM dans un modèle animal, l'amélioration de la récupération fonctionnelle du VG, et la modulation de certains phénomènes précoces comme le remodelage. Nous avons enfin démontré un épuisement fonctionnel progressif des CEP dérivées de la MO dans un modèle d'ischémie chronique du myocarde chez le porc, et nous avons proposé certaines hypothèses mécanistiques expliquant ce phénomène.

La thérapie cellulaire représente une nouvelle stratégie de traitement innovatrice qui nous permet d'envisager de nouvelles avenues pour prendre en charge les patients souffrant d'IC réfractaires au traitement médical ou chirurgical habituel. Le développement de modèles translationnels de recherche nous permettra de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent cette thérapie et d'envisager une récupération, voire même une régénération fonctionnelle du myocarde ischémique.

Chapitre 11 : Annexes

11.1 Annexe 1 : Lettre de modification de co-directeur

Montréal, le 10 octobre 2008

A/S : Dr Daniel Lajeunesse
Directeur programme Sciences Biomédicales
Bureau 760
Pavillon Roger-Gaudry
2900, boul. Édouard-Montpetit
Montréal (Québec) H3T 1J4

Objet : Co-directeur pour PhD Sciences Biomédicales

Dr Lajeunesse,

Suite à notre discussion concernant le sujet mentionné ci-haut et en accord avec le Dr Louis Perrault, mon directeur de PhD, je vous envoie les modifications pour la co-direction de mon PhD. Le **Dr Noiseux** qui agit présentement à titre de co-directeur de ma formation doctorale sera remplacé. Vous serez avisé bientôt du prochain co-directeur. J'estime qu'il existe un conflit personnel majeur avec le Dr Noiseux qui rendra la poursuite de mes études avec lui impossible. Dr Noiseux a été avisé de ces changements par mon directeur de recherche.

En espérant le tout conforme,

Simon Maltais; MD, MSc

Louis P Perrault; MD, PhD

11.2 Annexe 2 : Projet REPAIR-ICM

11.4 Annexe 3 : Articles publiés

1. Maltais S, Tremblay J, Perrault LP, Ly HQ. Paracrine mechanism: pivotal role in cell-based cardiac repair. (Review article) Accepted for publication in *Journal of Cardiovascular and Translational Research* 2010.
2. Maltais S, Perrault LP, Ly HQ. Bone marrow-heart interaction and potential role of circulating progenitor cells in heart failure: a clinically oriented review. Accepted for publication in *European Journal of Cardiothoracic Surgery* 2010.
3. Ba-Khoi Nguyen*, Maltais S*, Perrault P Louis, Tanguay Jean-Francois, Tardif Jean-Claude, Harel Francois, Mélanie Borie, Shi Yan Fen, Mansour Samer, Noiseux N. Improved function of myocardial repair of infarcted heart by intracoronary injection of mesenchymal stem cell-derived growth factors. Accepted for publication in *Journal of Cardiovascular and Translational Research* 2010.

11.4 Annexe 4 : Communications tirées des présentes études

1. Annual Research Day 2010

(Montreal Heart Institute, Montreal, Canada)

Functional Exhaustion of Bone Marrow-derived Endothelial Progenitor Cells in a Chronic Swine Model of Hibernating Myocardium

Simon Maltais, Jean-François Tanguay, Jean-Claude Tardif, Martin Sirois, Louis P Perrault, and Hung Quoc Ly

2. Annual Surgery-Anesthesiology Research Day 2010

(Montreal Heart Institute, Montreal, Canada)

Functional Exhaustion of Bone Marrow-derived Endothelial Progenitor Cells in a Chronic Swine Model of Hibernating Myocardium

Simon Maltais, Jean-François Tanguay, Jean-Claude Tardif, Martin Sirois, Louis P Perrault, and Hung Quoc Ly

3. Canadian Cardiovascular Society 2009 (Edmonton, Canada)

Novel approach for stem cell therapy: intracoronary injection of mesenchymal stem cell conditioned medium improves protection, repair and function recovery of infarcted myocardium.

B Nguyen, S Maltais, LP Perrault, J Tanguay, J Tardif, L Stevens, S Mansour, N Noiseux

4. Quebec Cardiac Team Meeting 2008 (Mont-Tremblant 2008)

Mesenchymal Stem Cells Improves Myocardial Protection and Function in Chronic Ischemic Porcine Model.

Maltais S, Perrault P Louis, Tanguay Jean-Francois, Tardif Jean-Claude, Harel Francois, Shi Yan Fen, Mansour Samer, Noiseux N. Paracrine Action of

5. Quebec Clinical Research Club 2008 (Mont-Tremblant, Quebec, Canada)

Paracrine Action of Mesenchymal Stem Cells Improves Myocardial Protection and Function in Chronic Ischemic Porcine Model.

Maltais S, Perrault P Louis, Tanguay Jean-Francois, Tardif Jean-Claude, Harel Francois, Shi Yan Fen, Mansour Samer, Noiseux N.

6. CHUM research day 2006 (Montreal, Quebec, Canada)

Paracrine Action of Mesenchymal Stem Cells Improves Myocardial Protection and Function in Acute Ischemic Porcine Model.

Maltais S, Perrault P Louis, Tanguay Jean-Francois, Tardif Jean-Claude, Harel Francois, Shi Yan Fen, Mansour Samer, Noiseux N.

7. Canadian Cardiovascular Society 2006 (Vancouver, Canada)

Paracrine Action of Mesenchymal Stem Cells Improves Myocardial Protection and Function in Acute Ischemic Porcine Model.

Maltais S, Perrault P Louis, Tanguay Jean-Francois, Tardif Jean-Claude, Harel Francois, Shi Yan Fen, Mansour Samer, Noiseux N.

8. French Cardiovascular Congress 2006 (Bordeaux, France)

Paracrine Action of Mesenchymal Stem Cells Improves Myocardial Protection and Function in Acute Ischemic Porcine Model.

Maltais S, Perrault P Louis, Tanguay Jean-Francois, Tardif Jean-Claude, Harel Francois, Shi Yan Fen, Mansour Samer, Noiseux N.

9. Annual Surgery Research Day 2006 (Montreal, Quebec, Canada)

Paracrine Action of Mesenchymal Stem Cells Improves Myocardial Protection and Function in Acute Ischemic Porcine Model.

Maltais S, Perrault P Louis, Tanguay Jean-Francois, Tardif Jean-Claude, Harel Francois, Shi Yan Fen, Mansour Samer, Noiseux N.

Chapitre 12 : Références

1. Howlett JG, McKelvie RS, Arnold JM, et al. Canadian Cardiovascular Society Consensus Conference guidelines on heart failure, update 2009: diagnosis and management of right-sided heart failure, myocarditis, device therapy and recent important clinical trials. *Can J Cardiol*. Feb 2009;25(2):85-105.
2. Hunt SA. 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*. Sep 20 2005;46(6):e1-82.
3. Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, et al. Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. Feb 23 2010;121(7):e46-e215.
4. Roger VL, Weston SA, Redfield MM, et al. Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population. *JAMA*. Jul 21 2004;292(3):344-350.
5. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*. Apr 1990;81(4):1161-1172.
6. Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*. Jun 27 2000;101(25):2981-2988.
7. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 28 2001;98(18):10344-10349.
8. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann N Y Acad Sci*. Jun 2001;938:221-229; discussion 229-230.
9. Milano CA, White WD, Smith LR, et al. Coronary artery bypass in patients with severely depressed ventricular function. *Ann Thorac Surg*. Sep 1993;56(3):487-493.
10. Christakis GT, Weisel RD, Fremes SE, et al. Coronary artery bypass grafting in patients with poor ventricular function. Cardiovascular Surgeons of the University of Toronto. *J Thorac Cardiovasc Surg*. Jun 1992;103(6):1083-1091; discussion 1091-1082.
11. Bouchart F, Tabley A, Litzler PY, Haas-Hubscher C, Bessou JP, Soyer R. Myocardial revascularization in patients with severe ischemic left ventricular dysfunction. Long term follow-up in 141 patients. *Eur J Cardiothorac Surg*. Dec 2001;20(6):1157-1162.
12. Harlan WR, oberman A, Grimm R, Rosati RA. Chronic congestive heart failure in coronary artery disease: clinical criteria. *Ann Intern Med*. Feb 1977;86(2):133-138.
13. Jessup M, Brozena S. Heart failure. *N Engl J Med*. May 15 2003;348(20):2007-2018.
14. Mann DL, Bristow MR. Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. *Circulation*. May 31 2005;111(21):2837-2849.

15. Schrier RW, Abraham WT. Hormones and hemodynamics in heart failure. *N Engl J Med*. Aug 19 1999;341(8):577-585.
16. Massie BM, Shah NB. Evolving trends in the epidemiologic factors of heart failure: rationale for preventive strategies and comprehensive disease management. *Am Heart J*. Jun 1997;133(6):703-712.
17. Carabello BA. Evolution of the study of left ventricular function: everything old is new again. *Circulation*. Jun 11 2002;105(23):2701-2703.
18. Zile MR, Brutsaert DL. New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part II: causal mechanisms and treatment. *Circulation*. Mar 26 2002;105(12):1503-1508.
19. Jessup M, Abraham WT, Casey DE, et al. 2009 focused update: ACCF/AHA Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Circulation*. Apr 14 2009;119(14):1977-2016.
20. Braunwald E. Biomarkers in heart failure. *N Engl J Med*. May 15 2008;358(20):2148-2159.
21. Bolt CL, Baur L, Stoffers J, Lenderink T, Winkens R. Novel strategies for the detection of systolic and diastolic heart failure. *Curr Cardiol Rev*. May 2009;5(2):112-118.
22. Malcom J, Arnold O, Howlett JG, et al. Canadian Cardiovascular Society Consensus Conference guidelines on heart failure--2008 update: best practices for the transition of care of heart failure patients, and the recognition, investigation and treatment of cardiomyopathies. *Can J Cardiol*. Jan 2008;24(1):21-40.
23. Chan PS, Soto G, Jones PG, et al. Patient health status and costs in heart failure: insights from the eplerenone post-acute myocardial infarction heart failure efficacy and survival study (EPHESUS). *Circulation*. Jan 27 2009;119(3):398-407.
24. Mehra MR, Rockman HA, Greenberg BH. Highlights of the 2008 Scientific Sessions of the Heart Failure Society of America. Toronto, Ontario, Canada, September 20-23, 2008. *J Am Coll Cardiol*. Feb 10 2009;53(6):514-522.
25. Remme WJ, Swedberg K. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure. *Eur Heart J*. Sep 2001;22(17):1527-1560.
26. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, et al. 2009 focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Circulation*. Apr 14 2009;119(14):e391-479.
27. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, et al. 2009 Focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines Developed in Collaboration With the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Am Coll Cardiol*. Apr 14 2009;53(15):e1-e90.

28. Bhatia RS, Tu JV, Lee DS, et al. Outcome of heart failure with preserved ejection fraction in a population-based study. *N Engl J Med*. Jul 20 2006;355(3):260-269.
29. Corsi C, Lang RM, Veronesi F, et al. Volumetric quantification of global and regional left ventricular function from real-time three-dimensional echocardiographic images. *Circulation*. Aug 23 2005;112(8):1161-1170.
30. Hein S, Arnon E, Kostin S, et al. Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation*. Feb 25 2003;107(7):984-991.
31. Zile MR, Brutsaert DL. New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part I: diagnosis, prognosis, and measurements of diastolic function. *Circulation*. Mar 19 2002;105(11):1387-1393.
32. Hess OM, Osakada G, Lavelle JF, Gallagher KP, Kemper WS, Ross J, Jr. Diastolic myocardial wall stiffness and ventricular relaxation during partial and complete coronary occlusions in the conscious dog. *Circ Res*. Apr 1983;52(4):387-400.
33. Redfield MM, Jacobsen SJ, Burnett JC, Jr., Mahoney DW, Bailey KR, Rodeheffer RJ. Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic. *JAMA*. Jan 8 2003;289(2):194-202.
34. Rudiger A, Harjola VP, Muller A, et al. Acute heart failure: clinical presentation, one-year mortality and prognostic factors. *Eur J Heart Fail*. Jun 2005;7(4):662-670.
35. Cleland JG, Freemantle N, Coletta AP, Clark AL. Clinical trials update from the American Heart Association: REPAIR-AMI, ASTAMI, JELIS, MEGA, REVIVE-II, SURVIVE, and PROACTIVE. *Eur J Heart Fail*. Jan 2006;8(1):105-110.
36. Packer M, Bristow MR, Cohn JN, et al. 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*. May 23 1996;334(21):1349-1355.
37. Flather MD, Yusuf S, Kober L, et al. 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*. May 6 2000;355(9215):1575-1581.
38. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. Sep 2 1999;341(10):709-717.
39. The effect of digoxin on mortality and morbidity in patients with heart failure. The Digitalis Investigation Group. *N Engl J Med*. Feb 20 1997;336(8):525-533.
40. Blom AS, Acker MA. The surgical treatment of end-stage heart failure. *Curr Probl Cardiol*. Oct 2007;32(10):553-599.
41. Mickleborough LL, Carson S, Tamariz M, Ivanov J. Results of revascularization in patients with severe left ventricular dysfunction. *J Thorac Cardiovasc Surg*. Mar 2000;119(3):550-557.
42. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. The SOLVD Investigators. *N Engl J Med*. Aug 1 1991;325(5):293-302.

43. Franciosa JA, Wilen M, Ziesche S, Cohn JN. Survival in men with severe chronic left ventricular failure due to either coronary heart disease or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* Mar 1 1983;51(5):831-836.
44. Holmes DR, Jr., Vlietstra RE, Fisher LD, et al. Follow-up of patients from the coronary artery surgery study (CASS) potentially suitable for percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am Heart J.* Nov 1983;106(5 Pt 1):981-988.
45. Eleven-year survival in the Veterans Administration randomized trial of coronary bypass surgery for stable angina. The Veterans Administration Coronary Artery Bypass Surgery Cooperative Study Group. *N Engl J Med.* Nov 22 1984;311(21):1333-1339.
46. Prospective randomised study of coronary artery bypass surgery in stable angina pectoris. Second interim report by the European Coronary Surgery Study Group. *Lancet.* Sep 6 1980;2(8193):491-495.
47. Yusuf S, Zucker D, Peduzzi P, et al. Effect of coronary artery bypass graft surgery on survival: overview of 10-year results from randomised trials by the Coronary Artery Bypass Graft Surgery Trialists Collaboration. *Lancet.* Aug 27 1994;344(8922):563-570.
48. Kirklin JW, Naftel CD, Blackstone EH, Pohost GM. Summary of a consensus concerning death and ischemic events after coronary artery bypass grafting. *Circulation.* Jun 1989;79(6 Pt 2):I81-91.
49. Arnese M, Cornel JH, Salustri A, et al. Prediction of improvement of regional left ventricular function after surgical revascularization. A comparison of low-dose dobutamine echocardiography with 201Tl single-photon emission computed tomography. *Circulation.* Jun 1 1995;91(11):2748-2752.
50. Haas F, Jennen L, Heinzmann U, et al. Ischemically compromised myocardium displays different time-courses of functional recovery: correlation with morphological alterations? *Eur J Cardiothorac Surg.* Aug 2001;20(2):290-298.
51. Serruys PW, Morice MC, Kappetein AP, et al. Percutaneous coronary intervention versus coronary-artery bypass grafting for severe coronary artery disease. *N Engl J Med.* Mar 5 2009;360(10):961-972.
52. Maxey TS, Keeling WB, Sommers KE. Surgical alternatives for the palliation of heart failure: a prospectus. *J Card Fail.* Dec 2005;11(9):670-676.
53. Kron IL, Flanagan TL, Blackbourne LH, Schroeder RA, Nolan SP. Coronary revascularization rather than cardiac transplantation for chronic ischemic cardiomyopathy. *Ann Surg.* Sep 1989;210(3):348-352; discussion 352-344.
54. Sedlis SP, Ramanathan KB, Morrison DA, Sethi G, Sacks J, Henderson W. Outcome of percutaneous coronary intervention versus coronary bypass grafting for patients with low left ventricular ejection fractions, unstable angina pectoris, and risk factors for adverse outcomes with bypass (the AWESOME Randomized Trial and Registry). *Am J Cardiol.* Jul 1 2004;94(1):118-120.
55. Kron IL, Cope JT, Baker LD, Jr., Spotnitz HM. The risks of reoperative coronary artery bypass in chronic ischemic cardiomyopathy: results of the CABG Patch Trial. *Circulation.* Nov 4 1997;96(9 Suppl):II-21-25.
56. Elefteriades JA, Tolis G, Jr., Levi E, Mills LK, Zaret BL. Coronary artery bypass grafting in severe left ventricular dysfunction: excellent survival with improved

- ejection fraction and functional state. *J Am Coll Cardiol*. Nov 1 1993;22(5):1411-1417.
57. Kolessov VI. Mammary artery-coronary artery anastomosis as method of treatment for angina pectoris. *J Thorac Cardiovasc Surg*. Oct 1967;54(4):535-544.
 58. Buffolo E, de Andrade CS, Branco JN, Teles CA, Aguiar LF, Gomes WJ. Coronary artery bypass grafting without cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*. Jan 1996;61(1):63-66.
 59. Moshkovitz Y, Sternik L, Paz Y, et al. Primary coronary artery bypass grafting without cardiopulmonary bypass in impaired left ventricular function. *Ann Thorac Surg*. Jun 1997;63(6 Suppl):S44-47.
 60. Akins CW, Boucher CA, Pohost GM. Preservation of interventricular septal function in patients having coronary artery bypass grafts without cardiopulmonary bypass. *Am Heart J*. Feb 1984;107(2):304-309.
 61. El-Hamamsy I, Cartier R, Demers P, Bouchard D, Pellerin M. Long-term results after systematic off-pump coronary artery bypass graft surgery in 1000 consecutive patients. *Circulation*. Jul 4 2006;114(1 Suppl):I486-491.
 62. Bainbridge D, Martin J, Cheng D. Off pump coronary artery bypass graft surgery versus conventional coronary artery bypass graft surgery: a systematic review of the literature. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*. Mar 2005;9(1):105-111.
 63. Bainbridge DT, Martin J, Cheng D. Is off-pump bypass grafting truly superior to conventional coronary artery bypass grafting? *Ann Thorac Surg*. Jan 2005;79(1):383; author reply 383.
 64. Parolari A, Alamanni F, Polvani G, et al. Meta-analysis of randomized trials comparing off-pump with on-pump coronary artery bypass graft patency. *Ann Thorac Surg*. Dec 2005;80(6):2121-2125.
 65. Cheng DC, Bainbridge D, Martin JE, Novick RJ. Does off-pump coronary artery bypass reduce mortality, morbidity, and resource utilization when compared with conventional coronary artery bypass? A meta-analysis of randomized trials. *Anesthesiology*. Jan 2005;102(1):188-203.
 66. Reston JT, Tregear SJ, Turkelson CM. Meta-analysis of short-term and mid-term outcomes following off-pump coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg*. Nov 2003;76(5):1510-1515.
 67. Suzuki T, Asai T, Matsubayashi K, et al. Off-pump coronary artery bypass grafting using in situ bilateral skeletonized internal thoracic arteries. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. Mar 2008;56(3):109-113.
 68. Youn YN, Chang BC, Hong YS, Kwak YL, Yoo KJ. Early and mid-term impacts of cardiopulmonary bypass on coronary artery bypass grafting in patients with poor left ventricular dysfunction: a propensity score analysis. *Circ J*. Sep 2007;71(9):1387-1394.
 69. Allman KC, Shaw LJ, Hachamovitch R, Udelson JE. Myocardial viability testing and impact of revascularization on prognosis in patients with coronary artery disease and left ventricular dysfunction: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. Apr 3 2002;39(7):1151-1158.
 70. McGee EC, Gillinov AM, McCarthy PM. Reverse ventricular remodeling: mechanical options. *Curr Opin Cardiol*. May 2006;21(3):215-220.

71. Dor V, Di Donato M, Sabatier M, Montiglio F, Civaia F. Left ventricular reconstruction by endoventricular circular patch plasty repair: a 17-year experience. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. Oct 2001;13(4):435-447.
72. Menicanti L, Di Donato M. The Dor procedure: what has changed after fifteen years of clinical practice? *J Thorac Cardiovasc Surg*. Nov 2002;124(5):886-890.
73. Athanasuleas CL, Stanley AW, Jr., Buckberg GD, Dor V, DiDonato M, Blackstone EH. Surgical anterior ventricular endocardial restoration (SAVER) in the dilated remodeled ventricle after anterior myocardial infarction. RESTORE group. Reconstructive Endoventricular Surgery, returning Torsion Original Radius Elliptical Shape to the LV. *J Am Coll Cardiol*. Apr 2001;37(5):1199-1209.
74. Jones RH, Velazquez EJ, Michler RE, et al. Coronary bypass surgery with or without surgical ventricular reconstruction. *N Engl J Med*. Apr 23 2009;360(17):1705-1717.
75. Coletta AP, Cleland JG, Freemantle N, Clark AL. Clinical trials update from the European Society of Cardiology Heart Failure meeting: SHAPE, BRING-UP 2 VAS, COLA II, FOSIDIAL, BETACAR, CASINO and meta-analysis of cardiac resynchronisation therapy. *Eur J Heart Fail*. Aug 2004;6(5):673-676.
76. McAlister FA, Ezekowitz JA, Wiebe N, et al. Systematic review: cardiac resynchronization in patients with symptomatic heart failure. *Ann Intern Med*. Sep 7 2004;141(5):381-390.
77. Cleland JG, Daubert JC, Erdmann E, et al. The effect of cardiac resynchronization on morbidity and mortality in heart failure. *N Engl J Med*. Apr 14 2005;352(15):1539-1549.
78. Epstein AE, Dimarco JP, Ellenbogen KA, et al. ACC/AHA/HRS 2008 guidelines for Device-Based Therapy of Cardiac Rhythm Abnormalities: executive summary. *Heart Rhythm*. Jun 2008;5(6):934-955.
79. Abraham WT, Fisher WG, Smith AL, et al. Cardiac resynchronization in chronic heart failure. *N Engl J Med*. Jun 13 2002;346(24):1845-1853.
80. Bleeker GB, Schalij MJ, Molhoek SG, et al. Relationship between QRS duration and left ventricular dyssynchrony in patients with end-stage heart failure. *J Cardiovasc Electrophysiol*. May 2004;15(5):544-549.
81. Yu CM, Lin H, Zhang Q, Sanderson JE. High prevalence of left ventricular systolic and diastolic asynchrony in patients with congestive heart failure and normal QRS duration. *Heart*. Jan 2003;89(1):54-60.
82. Yu CM, Chan YS, Zhang Q, et al. Benefits of cardiac resynchronization therapy for heart failure patients with narrow QRS complexes and coexisting systolic asynchrony by echocardiography. *J Am Coll Cardiol*. Dec 5 2006;48(11):2251-2257.
83. Bleeker GB, Holman ER, Steendijk P, et al. Cardiac resynchronization therapy in patients with a narrow QRS complex. *J Am Coll Cardiol*. Dec 5 2006;48(11):2243-2250.
84. Costanzo MR. Selection and treatment of candidates for heart transplantation. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. Apr 1996;8(2):113-125.
85. Catanese KA, Goldstein DJ, Williams DL, et al. Outpatient left ventricular assist device support: a destination rather than a bridge. *Ann Thorac Surg*. Sep 1996;62(3):646-652; discussion 653.

86. Rose EA, Gelijns AC, Moskowitz AJ, et al. Long-term mechanical left ventricular assistance for end-stage heart failure. *N Engl J Med*. Nov 15 2001;345(20):1435-1443.
87. Arom KV, Flavin TF, Emery RW, Kshetry VR, Janey PA, Petersen RJ. Safety and efficacy of off-pump coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg*. Mar 2000;69(3):704-710.
88. Schocken DD, Benjamin EJ, Fonarow GC, et al. Prevention of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association Councils on Epidemiology and Prevention, Clinical Cardiology, Cardiovascular Nursing, and High Blood Pressure Research; Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group; and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Group. *Circulation*. May 13 2008;117(19):2544-2565.
89. Rosamond W, Flegal K, Friday G, et al. Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. Feb 6 2007;115(5):e69-171.
90. Benetti FJ. Coronary artery bypass without extracorporeal circulation versus percutaneous transluminal coronary angioplasty: comparison of costs. *J Thorac Cardiovasc Surg*. Nov 1991;102(5):802-803.
91. Shennib H, Endo M, Benhamed O, Morin JF. Surgical revascularization in patients with poor left ventricular function: on- or off-pump? *Ann Thorac Surg*. Oct 2002;74(4):S1344-1347.
92. Stamou SC, Jablonski KA, Hill PC, Bafi AS, Boyce SW, Corso PJ. Coronary revascularization without cardiopulmonary bypass versus the conventional approach in high-risk patients. *Ann Thorac Surg*. Feb 2005;79(2):552-557.
93. Shroyer AL, Grover FL, Hattler B, et al. On-pump versus off-pump coronary-artery bypass surgery. *N Engl J Med*. Nov 5 2009;361(19):1827-1837.
94. Darwazah AK, Abu Sham'a RA, Hussein E, Hawari MH, Ismail H. Myocardial revascularization in patients with low ejection fraction $<$ or $=35\%$: effect of pump technique on early morbidity and mortality. *J Card Surg*. Jan-Feb 2006;21(1):22-27.
95. Kerendi F, Morris CD, Puskas JD. Off-pump coronary bypass surgery for high-risk patients: only in expert centers? *Curr Opin Cardiol*. Nov 2008;23(6):573-578.
96. Arom KV, Flavin TF, Emery RW, Kshetry VR, Petersen RJ, Janey PA. Is low ejection fraction safe for off-pump coronary bypass operation? *Ann Thorac Surg*. Sep 2000;70(3):1021-1025.
97. Suzuki T, Asai T, Matsubayashi K, et al. Early and midterm outcome after off-pump coronary artery bypass grafting in patients with poor left ventricular function compared with patients with normal function. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. Jul 2008;56(7):324-329.
98. Grundeman PF, Borst C, van Herwaarden JA, Mansvelt Beck HJ, Jansen EW. Hemodynamic changes during displacement of the beating heart by the Utrecht Octopus method. *Ann Thorac Surg*. Jun 1997;63(6 Suppl):S88-92.

99. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, White HD. Diagnostic application of the universal definition of myocardial infarction in the intensive care unit. *Curr Opin Crit Care*. Oct 2008;14(5):543-548.
100. Kern MJ, Lerman A, Bech JW, et al. Physiological assessment of coronary artery disease in the cardiac catheterization laboratory: a scientific statement from the American Heart Association Committee on Diagnostic and Interventional Cardiac Catheterization, Council on Clinical Cardiology. *Circulation*. Sep 19 2006;114(12):1321-1341.
101. Ohtani T, Ueda Y, Mizote I, et al. Number of yellow plaques detected in a coronary artery is associated with future risk of acute coronary syndrome: detection of vulnerable patients by angiography. *J Am Coll Cardiol*. Jun 6 2006;47(11):2194-2200.
102. Wasserman EJ, Shipley NM. Atherothrombosis in acute coronary syndromes: mechanisms, markers, and mediators of vulnerability. *Mt Sinai J Med*. Jan 2006;73(1):431-439.
103. Reffelmann T, Kloner RA. The no-reflow phenomenon: A basic mechanism of myocardial ischemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol*. Sep 2006;101(5):359-372.
104. Dinsmore JH, Dib N. Stem cell therapy for the treatment of acute myocardial infarction. *Cardiol Clin*. Feb 2010;28(1):127-138.
105. Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, Li C, Schumacker PT. Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *J Biol Chem*. Jul 17 1998;273(29):18092-18098.
106. Severs NJ, Bruce AF, Dupont E, Rothery S. Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovasc Res*. Oct 1 2008;80(1):9-19.
107. Schellings MW, Pinto YM, Heymans S. Matricellular proteins in the heart: possible role during stress and remodeling. *Cardiovasc Res*. Oct 1 2004;64(1):24-31.
108. Dewald O, Ren G, Duerr GD, et al. Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction. *Am J Pathol*. Feb 2004;164(2):665-677.
109. Shimazaki M, Nakamura K, Kii I, et al. Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction. *J Exp Med*. Feb 18 2008;205(2):295-303.
110. ten Hove M, Lygate CA, Fischer A, et al. Reduced inotropic reserve and increased susceptibility to cardiac ischemia/reperfusion injury in phosphocreatine-deficient guanidinoacetate-N-methyltransferase-knockout mice. *Circulation*. May 17 2005;111(19):2477-2485.
111. Ding YH, Young CN, Luan X, et al. Exercise preconditioning ameliorates inflammatory injury in ischemic rats during reperfusion. *Acta Neuropathol*. Mar 2005;109(3):237-246.
112. Kharbanda RK. Cardiac conditioning: a review of evolving strategies to reduce ischaemia-reperfusion injury. *Heart*. Aug 2010;96(15):1179-1186.
113. Cohn JN. Critical review of heart failure: the role of left ventricular remodeling in the therapeutic response. *Clin Cardiol*. Sep 1995;18(9 Suppl 4):IV4-12.

114. Cohn JN. Structural basis for heart failure. Ventricular remodeling and its pharmacological inhibition. *Circulation*. May 15 1995;91(10):2504-2507.
115. Fedak PW, Verma S, Weisel RD, Skrtic M, Li RK. Cardiac remodeling and failure: from molecules to man (Part III). *Cardiovasc Pathol*. May-Jun 2005;14(3):109-119.
116. Mann DL, Acker MA, Jessup M, Sabbah HN, Starling RC, Kubo SH. Rationale, design, and methods for a pivotal randomized clinical trial for the assessment of a cardiac support device in patients with New York health association class III-IV heart failure. *J Card Fail*. Jun 2004;10(3):185-192.
117. Francis GS, McDonald K, Chu C, Cohn JN. Pathophysiologic aspects of end-stage heart failure. *Am J Cardiol*. Jan 19 1995;75(3):11A-16A.
118. Fedak PW, Verma S, Weisel RD, Li RK. Cardiac remodeling and failure From molecules to man (Part II). *Cardiovasc Pathol*. Mar-Apr 2005;14(2):49-60.
119. Hunter JJ, Chien KR. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med*. Oct 21 1999;341(17):1276-1283.
120. Bovill E, Westaby S, Reji S, Sayeed R, Crisp A, Shaw T. Induction by left ventricular overload and left ventricular failure of the human Jumonji gene (JARID2) encoding a protein that regulates transcription and reexpression of a protective fetal program. *J Thorac Cardiovasc Surg*. Sep 2008;136(3):709-716.
121. Weisser-Thomas J, Piacentino V, 3rd, Gaughan JP, Margulies K, Houser SR. Calcium entry via Na/Ca exchange during the action potential directly contributes to contraction of failing human ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*. Mar 15 2003;57(4):974-985.
122. Katz AM. Heart failure in 2001: a prophecy revisited. *Am J Cardiol*. Jun 15 2001;87(12):1383-1386.
123. Lowes BD, Gilbert EM, Abraham WT, et al. Myocardial gene expression in dilated cardiomyopathy treated with beta-blocking agents. *N Engl J Med*. May 2 2002;346(18):1357-1365.
124. Heymans S, Lutun A, Nuyens D, et al. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med*. Oct 1999;5(10):1135-1142.
125. Etoh T, Joffs C, Deschamps AM, et al. Myocardial and interstitial matrix metalloproteinase activity after acute myocardial infarction in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Sep 2001;281(3):H987-994.
126. Hayashidani S, Tsutsui H, Ikeuchi M, et al. Targeted deletion of MMP-2 attenuates early LV rupture and late remodeling after experimental myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Sep 2003;285(3):H1229-1235.
127. Rahkonen OP, Koskivirta IM, Oksjoki SM, Jokinen E, Vuorio EI. Characterization of the murine Timp4 gene, localization within intron 5 of the synapsin 2 gene and tissue distribution of the mRNA. *Biochim Biophys Acta*. Aug 19 2002;1577(1):45-52.
128. Peterson JT, Li H, Dillon L, Bryant JW. Evolution of matrix metalloprotease and tissue inhibitor expression during heart failure progression in the infarcted rat. *Cardiovasc Res*. May 2000;46(2):307-315.
129. Sun Y, Zhang JQ, Zhang J, Lamparter S. Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats. *J Lab Clin Med*. Apr 2000;135(4):316-323.

130. Bristow MR. beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation*. Feb 8 2000;101(5):558-569.
131. Foo RS, Mani K, Kitsis RN. Death begets failure in the heart. *J Clin Invest*. Mar 2005;115(3):565-571.
132. Daunt DA, Hurt C, Hein L, Kallio J, Feng F, Kobilka BK. Subtype-specific intracellular trafficking of alpha2-adrenergic receptors. *Mol Pharmacol*. May 1997;51(5):711-720.
133. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol*. Jul 1960;70:68-78.
134. Reimer KA, Ideker RE. Myocardial ischemia and infarction: anatomic and biochemical substrates for ischemic cell death and ventricular arrhythmias. *Hum Pathol*. May 1987;18(5):462-475.
135. Baroldi G. Different types of myocardial necrosis in coronary heart disease: a pathophysiologic review of their functional significance. *Am Heart J*. Jun 1975;89(6):742-752.
136. Buja LM. Modulation of the myocardial response to ischemia. *Lab Invest*. Nov 1998;78(11):1345-1373.
137. Buja LM, Entman ML. Modes of myocardial cell injury and cell death in ischemic heart disease. *Circulation*. Oct 6 1998;98(14):1355-1357.
138. Jugdutt BI, Idikio HA. Apoptosis and oncosis in acute coronary syndromes: assessment and implications. *Mol Cell Biochem*. Feb 2005;270(1-2):177-200.
139. Kunapuli S, Rosanio S, Schwarz ER. "How do cardiomyocytes die?" apoptosis and autophagic cell death in cardiac myocytes. *J Card Fail*. Jun 2006;12(5):381-391.
140. Kajstura J, Bolli R, Sonnenblick EH, Anversa P, Leri A. Cause of death: suicide. *J Mol Cell Cardiol*. Apr 2006;40(4):425-437.
141. Kajstura J, Cheng W, Reiss K, et al. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest*. Jan 1996;74(1):86-107.
142. Takashi E, Ashraf M. Pathologic assessment of myocardial cell necrosis and apoptosis after ischemia and reperfusion with molecular and morphological markers. *J Mol Cell Cardiol*. Feb 2000;32(2):209-224.
143. Garg S, Hofstra L, Reutelingsperger C, Narula J. Apoptosis as a therapeutic target in acutely ischemic myocardium. *Curr Opin Cardiol*. Sep 2003;18(5):372-377.
144. Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation*. Jan 21 1997;95(2):320-323.
145. Olivetti G, Quaini F, Sala R, et al. Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart. *J Mol Cell Cardiol*. Sep 1996;28(9):2005-2016.
146. Veinot JP, Gattinger DA, Fliss H. Early apoptosis in human myocardial infarcts. *Hum Pathol*. Apr 1997;28(4):485-492.
147. Lee P, Sata M, Lefer DJ, Factor SM, Walsh K, Kitsis RN. Fas pathway is a critical mediator of cardiac myocyte death and MI during ischemia-reperfusion in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Feb 2003;284(2):H456-463.

148. Brocheriou V, Hagege AA, Oubenaissa A, et al. Cardiac functional improvement by a human Bcl-2 transgene in a mouse model of ischemia/reperfusion injury. *J Gene Med.* Sep-Oct 2000;2(5):326-333.
149. Chen Z, Chua CC, Ho YS, Hamdy RC, Chua BH. Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* May 2001;280(5):H2313-2320.
150. Mann DL. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. *Circ Res.* Nov 29 2002;91(11):988-998.
151. Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, Young JB, White BG, Mann DL. Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST). *Circulation.* Apr 24 2001;103(16):2055-2059.
152. Sugden PH. Ras, Akt, and mechanotransduction in the cardiac myocyte. *Circ Res.* Dec 12 2003;93(12):1179-1192.
153. Wilkins BJ, Molkentin JD. Calcineurin and cardiac hypertrophy: where have we been? Where are we going? *J Physiol.* May 15 2002;541(Pt 1):1-8.
154. Knoll R, Hoshijima M, Hoffman HM, et al. The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell.* Dec 27 2002;111(7):943-955.
155. Soonpaa MH, Daud AI, Koh GY, et al. Potential approaches for myocardial regeneration. *Ann N Y Acad Sci.* Mar 27 1995;752:446-454.
156. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet.* Jan 27 2001;357(9252):279-280.
157. Menasche P, Hagege A, Scorsin M, et al. [Autologous skeletal myoblast transplantation for cardiac insufficiency. First clinical case]. *Arch Mal Coeur Vaiss.* Mar 2001;94(3):180-182.
158. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Merante F, Mickle DA. Smooth muscle cell transplantation into myocardial scar tissue improves heart function. *J Mol Cell Cardiol.* Mar 1999;31(3):513-522.
159. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med.* Apr 2001;7(4):430-436.
160. Reinecke H, Zhang M, Bartosek T, Murry CE. Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts. *Circulation.* Jul 13 1999;100(2):193-202.
161. Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest.* Mar 2005;115(3):572-583.
162. Anversa P, Leri A, Kajstura J. Cardiac regeneration. *J Am Coll Cardiol.* May 2 2006;47(9):1769-1776.
163. Quesenberry PJ, Abedi M, Aliotta J, et al. Stem cell plasticity: an overview. *Blood Cells Mol Dis.* Jan-Feb 2004;32(1):1-4.
164. Korbli M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med.* Aug 7 2003;349(6):570-582.
165. Mathur A, Martin JF. Stem cells and repair of the heart. *Lancet.* Jul 10-16 2004;364(9429):183-192.

166. Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol.* Nov 2002;12(11):502-508.
167. Krause DS, Theise ND, Collector MI, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell.* May 4 2001;105(3):369-377.
168. Wang FS, Trester C. Bone marrow cells and myocardial regeneration. *Int J Hematol.* May 2004;79(4):322-327.
169. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* Apr 5 2001;410(6829):701-705.
170. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature.* Apr 8 2004;428(6983):664-668.
171. Albaneze-Walker J, Bazaral C, Leavey T, Dormer PG, Murry JA. Improved carbonylation of heterocyclic chlorides and electronically challenging aryl bromides. *Org Lett.* Jun 24 2004;6(13):2097-2100.
172. Deten A, Volz HC, Clamors S, et al. Hematopoietic stem cells do not repair the infarcted mouse heart. *Cardiovasc Res.* Jan 1 2005;65(1):52-63.
173. Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development.* Feb 1998;125(4):725-732.
174. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* Feb 14 1997;275(5302):964-967.
175. Shi Q, Rafii S, Wu MH, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood.* Jul 15 1998;92(2):362-367.
176. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: isolation and characterization. *Trends Cardiovasc Med.* Jul 2003;13(5):201-206.
177. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Jul 1 2003;23(7):1185-1189.
178. Quirici N, Soligo D, Caneva L, Servida F, Bossolasco P, Deliliers GL. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *Br J Haematol.* Oct 2001;115(1):186-194.
179. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest.* Feb 2002;109(3):337-346.
180. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med.* Jun 2003;9(6):702-712.
181. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* Aug 6 1999;85(3):221-228.
182. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 28 2000;97(7):3422-3427.
183. Fazel S, Cimini M, Chen L, et al. Cardioprotective c-kit+ cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines. *J Clin Invest.* Jul 2006;116(7):1865-1877.

184. Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest.* Jun 2001;107(11):1395-1402.
185. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* Jul 4 2002;418(6893):41-49.
186. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation.* Jan 1 2002;105(1):93-98.
187. Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs.* 2001;169(1):12-20.
188. Pittenger MF, Mosca JD, McIntosh KR. Human mesenchymal stem cells: progenitor cells for cartilage, bone, fat and stroma. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2000;251:3-11.
189. Gao J, Dennis JE, Solchaga LA, Awadallah AS, Goldberg VM, Caplan AI. Tissue-engineered fabrication of an osteochondral composite graft using rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.* Aug 2001;7(4):363-371.
190. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* Apr 2 1999;284(5411):143-147.
191. Hakuno D, Fukuda K, Makino S, et al. Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation.* Jan 22 2002;105(3):380-386.
192. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest.* Mar 1999;103(5):697-705.
193. Ge J, Li Y, Qian J, et al. Efficacy of emergent transcatheter transplantation of stem cells for treatment of acute myocardial infarction (TCT-STAMI). *Heart.* Dec 2006;92(12):1764-1767.
194. Wollert KC, Drexler H. Cell therapy for acute myocardial infarction: where are we heading? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* Dec 2004;1(2):61.
195. Erbs S, Linke A, Adams V, et al. Transplantation of blood-derived progenitor cells after recanalization of chronic coronary artery occlusion: first randomized and placebo-controlled study. *Circ Res.* Oct 14 2005;97(8):756-762.
196. Chen SL, Fang WW, Qian J, et al. Improvement of cardiac function after transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction. *Chin Med J (Engl).* Oct 2004;117(10):1443-1448.
197. Aicher A, Brenner W, Zuhayra M, et al. Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling. *Circulation.* Apr 29 2003;107(16):2134-2139.
198. Beauchamp JR, Morgan JE, Pagel CN, Partridge TA. Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source. *J Cell Biol.* Mar 22 1999;144(6):1113-1122.
199. Murad-Netto S, Moura R, Romeo LJ, et al. Stem cell therapy with retrograde coronary perfusion in acute myocardial infarction. A new technique. *Arq Bras Cardiol.* Oct 2004;83(4):352-354; 349-351.

200. Hou D, Youssef EA, Brinton TJ, et al. Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials. *Circulation*. Aug 30 2005;112(9 Suppl):I150-156.
201. Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, et al. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation*. May 3 2005;111(17):2198-2202.
202. Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 9 2005;102(32):11474-11479.
203. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation*. May 13 2003;107(18):2294-2302.
204. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*. Apr 8 2004;428(6983):668-673.
205. Badorff C, Brandes RP, Popp R, et al. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation*. Feb 25 2003;107(7):1024-1032.
206. Yeh ET, Zhang S, Wu HD, Korbling M, Willerson JT, Estrov Z. Transdifferentiation of human peripheral blood CD34+-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo. *Circulation*. Oct 28 2003;108(17):2070-2073.
207. Mangi AA, Noiseux N, Kong D, et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med*. Sep 2003;9(9):1195-1201.
208. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*. Feb 6 2001;103(5):634-637.
209. Nishida M, Carley WW, Gerritsen ME, Ellingsen O, Kelly RA, Smith TW. Isolation and characterization of human and rat cardiac microvascular endothelial cells. *Am J Physiol*. Feb 1993;264(2 Pt 2):H639-652.
210. Fuchs S, Satler LF, Kornowski R, et al. Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery disease: a feasibility study. *J Am Coll Cardiol*. May 21 2003;41(10):1721-1724.
211. Reinecke H, Murry CE. Taking the death toll after cardiomyocyte grafting: a reminder of the importance of quantitative biology. *J Mol Cell Cardiol*. Mar 2002;34(3):251-253.
212. Rehman J, Traktuev D, Li J, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. Mar 16 2004;109(10):1292-1298.
213. Heil M, Ziegelhoeffer T, Mees B, Schaper W. A different outlook on the role of bone marrow stem cells in vascular growth: bone marrow delivers software not hardware. *Circ Res*. Mar 19 2004;94(5):573-574.

214. Fedak PW. Paracrine effects of cell transplantation: modifying ventricular remodeling in the failing heart. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* Summer 2008;20(2):87-93.
215. Formigli L, Perna AM, Meacci E, et al. Paracrine effects of transplanted myoblasts and relaxin on post-infarction heart remodelling. *J Cell Mol Med.* Sep-Oct 2007;11(5):1087-1100.
216. Payne TR, Oshima H, Okada M, et al. A relationship between vascular endothelial growth factor, angiogenesis, and cardiac repair after muscle stem cell transplantation into ischemic hearts. *J Am Coll Cardiol.* Oct 23 2007;50(17):1677-1684.
217. Yau TM, Kim C, Li G, et al. Enhanced angiogenesis with multimodal cell-based gene therapy. *Ann Thorac Surg.* Mar 2007;83(3):1110-1119.
218. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* May 2 2003;92(8):827-839.
219. Fedak PW, Szmítko PE, Weisel RD, et al. Cell transplantation preserves matrix homeostasis: a novel paracrine mechanism. *J Thorac Cardiovasc Surg.* Nov 2005;130(5):1430-1439.
220. Murtuza B, Suzuki K, Bou-Gharios G, et al. Transplantation of skeletal myoblasts secreting an IL-1 inhibitor modulates adverse remodeling in infarcted murine myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 23 2004;101(12):4216-4221.
221. Uemura R, Xu M, Ahmad N, Ashraf M. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. *Circ Res.* Jun 9 2006;98(11):1414-1421.
222. Gneocchi M, He H, Liang OD, et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med.* Apr 2005;11(4):367-368.
223. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation.* Mar 30 2004;109(12):1543-1549.
224. Singla DK, McDonald DE. Factors released from embryonic stem cells inhibit apoptosis of H9c2 cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Sep 2007;293(3):H1590-1595.
225. Laflamme MA, Murry CE. Regenerating the heart. *Nat Biotechnol.* Jul 2005;23(7):845-856.
226. Fazel S, Chen L, Weisel RD, et al. Cell transplantation preserves cardiac function after infarction by infarct stabilization: augmentation by stem cell factor. *J Thorac Cardiovasc Surg.* Nov 2005;130(5):1310.
227. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation.* Dec 10 2002;106(24):3009-3017.
228. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation.* Oct 8 2002;106(15):1913-1918.
229. Schachinger V, Assmus B, Britten MB, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year

- results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol*. Oct 19 2004;44(8):1690-1699.
230. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*. Jul 10-16 2004;364(9429):141-148.
 231. Fernandez-Aviles F, San Roman JA, Garcia-Frade J, et al. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res*. Oct 1 2004;95(7):742-748.
 232. Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, et al. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation*. Mar 14 2006;113(10):1287-1294.
 233. Gneocchi M, He H, Melo LG, et al. Early beneficial effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing Akt on cardiac metabolism after myocardial infarction. *Stem Cells*. Apr 2009;27(4):971-979.
 234. Antman EM, Hand M, Armstrong PW, et al. 2007 Focused Update of the ACC/AHA 2004 Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration With the Canadian Cardiovascular Society endorsed by the American Academy of Family Physicians: 2007 Writing Group to Review New Evidence and Update the ACC/AHA 2004 Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction, Writing on Behalf of the 2004 Writing Committee. *Circulation*. Jan 15 2008;117(2):296-329.
 235. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, et al. 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*. Sep 20 2005;112(12):e154-235.
 236. Segers VF, Lee RT. Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature*. Feb 21 2008;451(7181):937-942.
 237. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell*. Mar 5 2004;116(5):639-648.
 238. Hristov M, Weber C. The therapeutic potential of progenitor cells in ischemic heart disease--Past, present and future. *Basic Res Cardiol*. Jan 2006;101(1):1-7.
 239. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev*. Oct 2005;85(4):1373-1416.
 240. Fraser JK, Schreiber RE, Zuk PA, Hedrick MH. Adult stem cell therapy for the heart. *Int J Biochem Cell Biol*. Apr 2004;36(4):658-666.
 241. Muller P, Beltrami AP, Cesselli D, Pfeiffer P, Kazakov A, Bohm M. Myocardial regeneration by endogenous adult progenitor cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*. Aug 2005;39(2):377-387.

242. Caplice NM, Gersh BJ, Alegria JR. Cell therapy for cardiovascular disease: what cells, what diseases and for whom? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. Jan 2005;2(1):37-43.
243. Fukuda K, Yuasa S. Stem cells as a source of regenerative cardiomyocytes. *Circ Res*. Apr 28 2006;98(8):1002-1013.
244. Gepstein L. Cardiovascular therapeutic aspects of cell therapy and stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. Oct 2006;1080:415-425.
245. Anversa P, Kajstura J, Leri A, Bolli R. Life and death of cardiac stem cells: a paradigm shift in cardiac biology. *Circulation*. Mar 21 2006;113(11):1451-1463.
246. Wang QD, Sjoquist PO. Myocardial regeneration with stem cells: pharmacological possibilities for efficacy enhancement. *Pharmacol Res*. Apr 2006;53(4):331-340.
247. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med*. Jun 7 2001;344(23):1750-1757.
248. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. Sep 19 2003;114(6):763-776.
249. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 14 2003;100(21):12313-12318.
250. Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N, et al. Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *The Journal of biological chemistry*. Mar 19 2004;279(12):11384-11391.
251. Martin CM, Meeson AP, Robertson SM, et al. Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, *Abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol*. Jan 1 2004;265(1):262-275.
252. Pfister O, Mouquet F, Jain M, et al. CD31- but Not CD31+ cardiac side population cells exhibit functional cardiomyogenic differentiation. *Circ Res*. Jul 8 2005;97(1):52-61.
253. Lipinski MJ, Biondi-Zoccai GG, Abbate A, et al. Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *Journal of the American College of Cardiology*. Oct 30 2007;50(18):1761-1767.
254. Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, et al. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med*. May 28 2007;167(10):989-997.
255. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, et al. 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*. Nov 10 2006.
256. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. Jan 14 2006;367(9505):113-121.
257. Oettgen P, Boyle AJ, Schulman SP, Hare JM. Controversies in cardiovascular medicine. *Circulation*. Jul 25 2006;114(4):353-358.

258. Murry CE, Field LJ, Menasche P. Cell-based cardiac repair: reflections at the 10-year point. *Circulation*. Nov 15 2005;112(20):3174-3183.
259. Boyle AJ, Schulman SP, Hare JM, Oettgen P. Controversies in cardiovascular medicine: ready for the next step. *Circulation*. Jul 25 2006;114(4):339-352.
260. Charwat S, Gyongyosi M, Lang I, et al. Role of adult bone marrow stem cells in the repair of ischemic myocardium: current state of the art. *Exp Hematol*. Jun 2008;36(6):672-680.
261. Burt RK, Loh Y, Pearce W, et al. Clinical applications of blood-derived and marrow-derived stem cells for nonmalignant diseases. *JAMA*. Feb 27 2008;299(8):925-936.
262. Sussman MA, Murry CE. Bones of contention: marrow-derived cells in myocardial regeneration. *J Mol Cell Cardiol*. Jun 2008;44(6):950-953.
263. Rosenzweig A. Cardiac cell therapy--mixed results from mixed cells. *N Engl J Med*. Sep 21 2006;355(12):1274-1277.
264. Gersh BJ, Simari RD. Cardiac cell-repair therapy: clinical issues. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. Mar 2006;3 Suppl 1:S105-109.
265. Murry CE, Reinecke H, Pabon LM. Regeneration gaps: observations on stem cells and cardiac repair. *J Am Coll Cardiol*. May 2 2006;47(9):1777-1785.
266. Ott HC, McCue J, Taylor DA. Cell-based cardiovascular repair--the hurdles and the opportunities. *Basic Res Cardiol*. Nov 2005;100(6):504-517.
267. Rosen MR. Are stem cells drugs? The regulation of stem cell research and development. *Circulation*. Oct 31 2006;114(18):1992-2000.
268. Ly HQ, Hoshino K, Pomerantseva I, et al. In Vivo Myocardial Distribution of Multipotent Progenitor Cells Following Intracoronary Delivery in a Swine Model of Myocardial Infarction. *Eur Heart J*. 2009;In Press.
269. Schachinger V, Aicher A, Dobert N, et al. Pilot trial on determinants of progenitor cell recruitment to the infarcted human myocardium. *Circulation*. Sep 30 2008;118(14):1425-1432.
270. Beeres SL, Bengel FM, Bartunek J, et al. Role of imaging in cardiac stem cell therapy. *J Am Coll Cardiol*. Mar 20 2007;49(11):1137-1148.
271. Yau TM, Kim C, Li G, Zhang Y, Weisel RD, Li RK. Maximizing ventricular function with multimodal cell-based gene therapy. *Circulation*. Aug 30 2005;112(9 Suppl):I123-128.
272. Jain M, DerSimonian H, Brenner DA, et al. Cell therapy attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction. *Circulation*. Apr 10 2001;103(14):1920-1927.
273. Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol*. Sep 2002;30(9):973-981.
274. Thum T, Bauersachs J, Poole-Wilson PA, Volk HD, Anker SD. The dying stem cell hypothesis: immune modulation as a novel mechanism for progenitor cell therapy in cardiac muscle. *J Am Coll Cardiol*. Nov 15 2005;46(10):1799-1802.
275. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. Jan 2002;53(1):31-47.

276. Riese U, Brenner S, Docke WD, et al. Catecholamines induce IL-10 release in patients suffering from acute myocardial infarction by transactivating its promoter in monocytic but not in T-cells. *Mol Cell Biochem.* Sep 2000;212(1-2):45-50.
277. Kranz A, Rau C, Kochs M, Waltenberger J. Elevation of vascular endothelial growth factor-A serum levels following acute myocardial infarction. Evidence for its origin and functional significance. *J Mol Cell Cardiol.* Jan 2000;32(1):65-72.
278. Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S, et al. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res.* Feb 6 2004;94(2):230-238.
279. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res.* Mar 19 2004;94(5):678-685.
280. Gneocchi M, He H, Noiseux N, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *Faseb J.* Apr 2006;20(6):661-669.
281. Noiseux N, Gneocchi M, Lopez-Illasaca M, et al. Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Mol Ther.* Dec 2006;14(6):840-850.
282. Mirotsoy M, Zhang Z, Deb A, et al. Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 30 2007;104(5):1643-1648.
283. Brogi E, Schattman G, Wu T, et al. Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression. *J Clin Invest.* Jan 15 1996;97(2):469-476.
284. Perez-Illarbe M, Agbulut O, Pelacho B, et al. Characterization of the paracrine effects of human skeletal myoblasts transplanted in infarcted myocardium. *Eur J Heart Fail.* Nov 2008;10(11):1065-1072.
285. Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood.* Sep 15 2005;106(6):1901-1910.
286. Tilling L, Chowienczyk P, Clapp B. Progenitors in motion: mechanisms of mobilization of endothelial progenitor cells. *Br J Clin Pharmacol.* Oct 2009;68(4):484-492.
287. Tashiro K, Tada H, Heilker R, Shirozu M, Nakano T, Honjo T. Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science.* Jul 30 1993;261(5121):600-603.
288. Levesque JP, Hendy J, Takamatsu Y, Simmons PJ, Bendall LJ. Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by G-CSF or cyclophosphamide. *J Clin Invest.* Jan 2003;111(2):187-196.
289. De Falco E, Porcelli D, Torella AR, et al. SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells. *Blood.* Dec 1 2004;104(12):3472-3482.

290. Burns JM, Summers BC, Wang Y, et al. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med*. Sep 4 2006;203(9):2201-2213.
291. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. Feb 1 2000;95(3):952-958.
292. Ceradini DJ, Gurtner GC. Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue. *Trends Cardiovasc Med*. Feb 2005;15(2):57-63.
293. Heissig B, Hattori K, Dias S, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. May 31 2002;109(5):625-637.
294. Petit I, Jin D, Rafii S. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends Immunol*. Jul 2007;28(7):299-307.
295. Massa M, Rosti V, Ferrario M, et al. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood*. Jan 1 2005;105(1):199-206.
296. Isner JM. Tissue responses to ischemia: local and remote responses for preserving perfusion of ischemic muscle. *J Clin Invest*. Sep 2000;106(5):615-619.
297. Tepper OM, Capla JM, Galiano RD, et al. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood*. Feb 1 2005;105(3):1068-1077.
298. Minchenko A, Salceda S, Bauer T, Caro J. Hypoxia regulatory elements of the human vascular endothelial growth factor gene. *Cell Mol Biol Res*. 1994;40(1):35-39.
299. Laterveer L, Zijlmans JM, Lindley IJ, Hamilton MS, Willemze R, Fibbe WE. Improved survival of lethally irradiated recipient mice transplanted with circulating progenitor cells mobilized by IL-8 after pretreatment with stem cell factor. *Exp Hematol*. Oct 1996;24(12):1387-1393.
300. King AG, Horowitz D, Dillon SB, et al. Rapid mobilization of murine hematopoietic stem cells with enhanced engraftment properties and evaluation of hematopoietic progenitor cell mobilization in rhesus monkeys by a single injection of SB-251353, a specific truncated form of the human CXC chemokine GRObeta. *Blood*. Mar 15 2001;97(6):1534-1542.
301. Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science*. Jun 26 2009;324(5935):1673-1677.
302. Yla-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol*. Mar 13 2007;49(10):1015-1026.
303. Hattori K, Dias S, Heissig B, et al. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. May 7 2001;193(9):1005-1014.
304. Hiasa K, Egashira K, Kitamoto S, et al. Bone marrow mononuclear cell therapy limits myocardial infarct size through vascular endothelial growth factor. *Basic Res Cardiol*. May 2004;99(3):165-172.

305. Laguens R, Cabeza Meckert P, Vera Janavel G, et al. Entrance in mitosis of adult cardiomyocytes in ischemic pig hearts after plasmid-mediated rhVEGF165 gene transfer. *Gene Ther.* Dec 2002;9(24):1676-1681.
306. Zarnegar R, Michalopoulos GK. The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. *J Cell Biol.* Jun 1995;129(5):1177-1180.
307. Nakamura T, Mizuno S, Matsumoto K, Sawa Y, Matsuda H. Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF. *J Clin Invest.* Dec 2000;106(12):1511-1519.
308. Niagara MI, Haider H, Jiang S, 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.* Mar 2 2007;100(4):545-555.
309. Miyagawa S, Sawa Y, Taketani S, et al. Myocardial regeneration therapy for heart failure: hepatocyte growth factor enhances the effect of cellular cardiomyoplasty. *Circulation.* May 28 2002;105(21):2556-2561.
310. Duan HF, Wu CT, Wu DL, et al. Treatment of myocardial ischemia with bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing hepatocyte growth factor. *Mol Ther.* Sep 2003;8(3):467-474.
311. Urbanek K, Torella D, Sheikh F, et al. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 14 2005;102(24):8692-8697.
312. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med.* Feb 12 1998;338(7):436-445.
313. Murphy PM. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. *N Engl J Med.* Sep 13 2001;345(11):833-835.
314. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell.* May 6 2005;121(3):335-348.
315. Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, Moch H, Oakeley EJ, Krek W. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature.* Sep 18 2003;425(6955):307-311.
316. Schutyser E, Su Y, Yu Y, et al. Hypoxia enhances CXCR4 expression in human microvascular endothelial cells and human melanoma cells. *European cytokine network.* Jul 2007;18(2):59-70.
317. Abbott JD, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS, 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.* Nov 23 2004;110(21):3300-3305.
318. Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet.* Aug 30 2003;362(9385):697-703.
319. Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, et al. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation.* Mar 11 2003;107(9):1322-1328.

320. Heldin CH, Westermark B, Wasteson A. Platelet-derived growth factor. Isolation by a large-scale procedure and analysis of subunit composition. *The Biochemical journal*. Mar 1 1981;193(3):907-913.
321. Raines EW, Ross R. Platelet-derived growth factor. I. High yield purification and evidence for multiple forms. *J Biol Chem*. May 10 1982;257(9):5154-5160.
322. Raines EW. PDGF and cardiovascular disease. *Cytokine & growth factor reviews*. Aug 2004;15(4):237-254.
323. Sarzani R, Arnaldi G, Chobanian AV. Hypertension-induced changes of platelet-derived growth factor receptor expression in rat aorta and heart. *Hypertension*. Jun 1991;17(6 Pt 2):888-895.
324. Edelberg JM, Lee SH, Kaur M, et al. 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*. Feb 5 2002;105(5):608-613.
325. Zheng J, Shin JH, Xaymardan M, et al. Platelet-derived growth factor improves cardiac function in a rodent myocardial infarction model. *Coronary artery disease*. Feb 2004;15(1):59-64.
326. Xaymardan M, Tang L, Zagreda L, et al. Platelet-derived growth factor-AB promotes the generation of adult bone marrow-derived cardiac myocytes. *Circ Res*. Mar 19 2004;94(5):E39-45.
327. Hao X, Mansson-Broberg A, Blomberg P, et al. Angiogenic and cardiac functional effects of dual gene transfer of VEGF-A165 and PDGF-BB after myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun*. Sep 10 2004;322(1):292-296.
328. Hao X, Mansson-Broberg A, Gustafsson T, et al. Angiogenic effects of dual gene transfer of bFGF and PDGF-BB after myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun*. Mar 19 2004;315(4):1058-1063.
329. Schweigerer L, Neufeld G, Friedman J, Abraham JA, Fiddes JC, Gospodarowicz D. Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. *Nature*. Jan 15-21 1987;325(6101):257-259.
330. Schumacher B, Pecher P, von Specht BU, Stegmann T. Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors: first clinical results of a new treatment of coronary heart disease. *Circulation*. Feb 24 1998;97(7):645-650.
331. Henry TD, Grines CL, Watkins MW, et al. 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*. Sep 11 2007;50(11):1038-1046.
332. Lu H, Xu X, Zhang M, et al. Combinatorial protein therapy of angiogenic and arteriogenic factors remarkably improves collateralogenesis and cardiac function in pigs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 17 2007;104(29):12140-12145.
333. Padua RR, Kardami E. Increased basic fibroblast growth factor (bFGF) accumulation and distinct patterns of localization in isoproterenol-induced cardiomyocyte injury. *Growth Factors*. 1993;8(4):291-306.
334. Kardami E. Stimulation and inhibition of cardiac myocyte proliferation in vitro. *Mol Cell Biochem*. Feb 9 1990;92(2):129-135.

335. Sakakibara Y, Nishimura K, Tambara K, et al. Prevascularization with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor enhances the benefits of cardiomyocyte transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. Jul 2002;124(1):50-56.
336. Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*. Oct 8 1993;75(1):73-82.
337. Le Roith D. Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Insulin-like growth factors. *N Engl J Med*. Feb 27 1997;336(9):633-640.
338. Werner H, 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(1):71-92.
339. Ishii DN, Lupien SB. Insulin-like growth factors protect against diabetic neuropathy: effects on sensory nerve regeneration in rats. *J Neurosci Res*. Jan 1 1995;40(1):138-144.
340. Arsenijevic Y, Weiss S, Schneider B, 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*. Sep 15 2001;21(18):7194-7202.
341. de Pablo F, de la Rosa EJ. The developing CNS: a scenario for the action of proinsulin, insulin and insulin-like growth factors. *Trends Neurosci*. Mar 1995;18(3):143-150.
342. Urbanek K, Rota M, Cascapera S, et al. Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival. *Circ Res*. Sep 30 2005;97(7):663-673.
343. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med*. Nov 10 1994;331(19):1286-1292.
344. Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med*. May 4 2000;342(18):1350-1358.
345. Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, Kulkarni AB, Karlsson S, Akhurst RJ. Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development*. Jun 1995;121(6):1845-1854.
346. Oshima M, Oshima H, Taketo MM. TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol*. Oct 10 1996;179(1):297-302.
347. Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, et al. Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res*. Dec 1995;1(12):1623-1634.
348. Bartram U, Molin DG, Wisse LJ, et al. 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*. Jun 5 2001;103(22):2745-2752.
349. Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J*. Apr 2 2002;21(7):1743-1753.
350. Li J, Hampton T, Morgan JP, Simons M. Stretch-induced VEGF expression in the heart. *J Clin Invest*. Jul 1 1997;100(1):18-24.

351. Li TS, Hayashi M, Ito H, et al. Regeneration of infarcted myocardium by intramyocardial implantation of ex vivo transforming growth factor-beta-preprogrammed bone marrow stem cells. *Circulation*. May 17 2005;111(19):2438-2445.
352. Dimmeler S, Leri A. Aging and disease as modifiers of efficacy of cell therapy. *Circ Res*. Jun 6 2008;102(11):1319-1330.
353. Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, et al. CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation*. Sep 7 2004;110(10):1209-1212.
354. Seeger FH, Tonn T, Krzossok N, Zeiher AM, Dimmeler S. Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. Mar 2007;28(6):766-772.
355. Woo YJ, Panlilio CM, Cheng RK, et al. Therapeutic delivery of cyclin A2 induces myocardial regeneration and enhances cardiac function in ischemic heart failure. *Circulation*. Jul 4 2006;114(1 Suppl):I206-213.
356. Kuhn B, del Monte F, Hajjar RJ, et al. Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair. *Nat Med*. Aug 2007;13(8):962-969.
357. Chien KR, Domian IJ, Parker KK. Cardiogenesis and the complex biology of regenerative cardiovascular medicine. *Science*. Dec 5 2008;322(5907):1494-1497.
358. Bursac N. Stem cell therapies for heart disease: why do we need bioengineers? *IEEE Eng Med Biol Mag*. Jul-Aug 2007;26(4):76-79.
359. Timmermans F, De Sutter J, Gillebert TC. Stem cells for the heart, are we there yet? *Cardiology*. 2003;100(4):176-185.
360. Dowell JD, Rubart M, Pasumarthi KB, Soonpaa MH, Field LJ. Myocyte and myogenic stem cell transplantation in the heart. *Cardiovasc Res*. May 1 2003;58(2):336-350.
361. Raeburn CD, Zimmerman MA, Arya J, Banerjee A, Harken AH. Stem cells and myocardial repair. *J Am Coll Surg*. Nov 2002;195(5):686-693.
362. Tomita S, Mickle DA, Weisel RD, et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. Jun 2002;123(6):1132-1140.
363. Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation*. Nov 9 1999;100(19 Suppl):II247-256.
364. Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg*. Jun 2002;73(6):1919-1925; discussion 1926.
365. Mangi AA, Noiseux N, Kong D, et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med*. 2003;9(9):1195-1201. Epub 2003 Aug 11.
366. Takahashi M, Li TS, Suzuki R, et al. 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*. Aug 2006;291(2):H886-893.

367. 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*. Jun 2009;296(6):H1888-1897.
368. Allan DS, Dubé P, Roy J, Busque L, DC R. Endothelial-like vascular progenitor cells from autologous and allogeneic donors: mobilization features distinct from hematopoietic progenitors. *Biology of Blood & Marrow Transplantation*. 2007;13(4):433-439.
369. Guimond M, Balassy A, Barrette M, Brochu S, Perreault C, Roy DC. P-glycoprotein targeting: a unique strategy to selectively eliminate immunoreactive T cells. *Blood*. Jul 15 2002;100(2):375-382.
370. Perrault LP, Malo O, Desjardins N, et al. Surgical experience with retroperitoneal heterotopic heart transplantation in the large white domestic swine. *J Invest Surg*. Jan-Feb 2002;15(1):45-55.
371. Pye J, Ardeshirpour F, McCain A, et al. Proteasome inhibition ablates activation of NF-kappa B in myocardial reperfusion and reduces reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Mar 2003;284(3):H919-926.
372. Berry MF, Engler AJ, Woo YJ, et al. Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Jun 2006;290(6):H2196-2203.
373. Ananiadou OG, Bibou K, Drossos GE, et al. Effect of profound hypothermia during circulatory arrest on neurologic injury and apoptotic repressor protein Bcl-2 expression in an acute porcine model. *J Thorac Cardiovasc Surg*. Apr 2007;133(4):919-926.
374. Wollert KC, Drexler H. Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ Res*. Feb 4 2005;96(2):151-163.
375. Gneocchi M, He H, Melo LG, et al. Early beneficial effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing Akt on cardiac metabolism after myocardial infarction. *Stem Cells*. Apr 2009;27(4):971-979.
376. Benzhi C, Limei Z, Ning W, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells upregulate transient outward potassium currents in postnatal rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. Jul 2009;47(1):41-48.
377. Braga LM, Rosa K, Rodrigues B, et al. Systemic delivery of adult stem cells improves cardiac function in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. Feb 2008;35(2):113-119.
378. Xu RX, Chen X, J.H. C, Han Y, B.M. H. Mesenchymal stem cells promote cardiomyocyte hypertrophy in vitro through hypoxia-induced paracrine mechanisms. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009;36(2):176-180.
379. Guo J, Lin GS, Bao CY, Hu ZM, Hu MY. Anti-inflammation role for mesenchymal stem cells transplantation in myocardial infarction. *Inflammation*. Aug 2007;30(3-4):97-104.
380. Nakanishi C, Yamagishi M, Yamahara K, et al. Activation of cardiac progenitor cells through paracrine effects of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. Sep 12 2008;374(1):11-16.
381. De Sousa E, Veksler V, Minajeva A, et al. Subcellular creatine kinase alterations. Implications in heart failure. *Circ Res*. Jul 9 1999;85(1):68-76.

382. O'Brien PJ, Dameron GW, Beck ML, et al. Cardiac troponin T is a sensitive, specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals. *Lab Anim Sci.* Oct 1997;47(5):486-495.
383. Vikenes K, Westby J, Matre K, Kuiper KK, Farstad M, Nordrehaug JE. Release of cardiac troponin I after temporally graded acute coronary ischaemia with electrocardiographic ST depression. *Int J Cardiol.* Oct 2002;85(2-3):243-251; discussion 252-243.
384. Abbate A, Bussani R, Amin MS, Vetrovec GW, Baldi A. Acute myocardial infarction and heart failure: role of apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(11):1834-1840.
385. Galasko GI, Basu S, Lahiri A, Senior R. A prospective comparison of echocardiographic wall motion score index and radionuclide ejection fraction in predicting outcome following acute myocardial infarction. *Heart.* Sep 2001;86(3):271-276.
386. Noiseux N, Lopez Iلاسaca M, Gnechi M, et al. Mesenchymal Stem Cells Over-Expressing Akt Dramatically Repairs Infarcted Myocardium and Improves Cardiac Function Despite Infrequent Cellular Fusion or Differentiation. *In Press, Molecular Therapy Journal.* 2006.
387. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* Sep 21 2006;355(12):1199-1209.
388. Vulliet PR, Greeley M, Halloran SM, MacDonald KA, Kittleson MD. Intracoronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet.* Mar 6 2004;363(9411):783-784.
389. Freyman T, Polin G, Osman H, et al. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *Eur Heart J.* May 2006;27(9):1114-1122.
390. Buschmann I, Heil M, Jost M, Schaper W. Influence of inflammatory cytokines on arteriogenesis. *Microcirculation.* Jun 2003;10(3-4):371-379.
391. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Epstein SE. Bone marrow-derived cells for enhancing collateral development: mechanisms, animal data, and initial clinical experiences. *Circ Res.* Aug 20 2004;95(4):354-363.
392. Zisa D, Shabbir A, Suzuki G, Lee T. Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a key therapeutic trophic factor in bone marrow mesenchymal stem cell-mediated cardiac repair. *Biochem Biophys Res Commun.* Dec 18 2009;390(3):834-838.
393. Topol EJ. Current status and future prospects for acute myocardial infarction therapy. *Circulation.* Oct 21 2003;108(16 Suppl 1):III6-13.
394. Ince H, Valgimigli M, Petzsch M, et al. Cardiovascular events and re-stenosis following administration of G-CSF in acute myocardial infarction: systematic review and meta-analysis. *Heart.* May 2008;94(5):610-616.
395. Mansour S, Roy DC, Bouchard V, et al. COMPARE-AMI Trial: Comparison of Intracoronary Injection of CD133+ Bone Marrow Stem Cells to Placebo in Patients After Acute Myocardial Infarction and Left Ventricular Dysfunction: Study Rationale and Design. *J. of Cardiovasc. Trans. Res.* 2009 in press.

396. Rahimtoola SH. The hibernating myocardium. *Am Heart J.* Jan 1989;117(1):211-221.
397. Frangogiannis NG. The pathological basis of myocardial hibernation. *Histol Histopathol.* Apr 2003;18(2):647-655.
398. Frangogiannis NG. Myocardial hibernation. Clinical and pathological perspectives. *Minerva Cardioangiol.* Jun 2003;51(3):261-274.
399. Schwarz ER, Schaper J, vom Dahl J, et al. Myocyte degeneration and cell death in hibernating human myocardium. *J Am Coll Cardiol.* Jun 1996;27(7):1577-1585.
400. Elsasser A, Schlepper M, Zimmermann R, et al. The extracellular matrix in hibernating myocardium--a significant factor causing structural defects and cardiac dysfunction. *Mol Cell Biochem.* Sep 1998;186(1-2):147-158.
401. Ausma J, Thone F, Dispersyn GD, et al. Dedifferentiated cardiomyocytes from chronic hibernating myocardium are ischemia-tolerant. *Mol Cell Biochem.* Sep 1998;186(1-2):159-168.
402. Boos CJ, Lip GY, Blann AD. Circulating endothelial cells in cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* Oct 17 2006;48(8):1538-1547.
403. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* Feb 13 2003;348(7):593-600.
404. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med.* Sep 8 2005;353(10):999-1007.
405. Adams V, Lenk K, Linke A, et al. Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Apr 2004;24(4):684-690.
406. Kunz GA, Liang G, Cuculi F, et al. Circulating endothelial progenitor cells predict coronary artery disease severity. *Am Heart J.* Jul 2006;152(1):190-195.
407. Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation.* Jun 7 2005;111(22):2981-2987.
408. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation.* Nov 26 2002;106(22):2781-2786.
409. Laufs U, Werner N, Link A, et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation.* Jan 20 2004;109(2):220-226.
410. Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, et al. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Aug 2004;24(8):1442-1447.
411. Walter DH, Dimmeler S, Zeiher AM. Effects of statins on endothelium and endothelial progenitor cell recruitment. *Semin Vasc Med.* Nov 2004;4(4):385-393.
412. Kissel CK, Lehmann R, Assmus B, et al. Selective functional exhaustion of hematopoietic progenitor cells in the bone marrow of patients with postinfarction heart failure. *J Am Coll Cardiol.* Jun 19 2007;49(24):2341-2349.
413. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, et al. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med.* Jan 3 2002;346(1):5-15.

414. Chamuleau SA, Vrijisen KR, Rokosh DG, Tang XL, Piek JJ, Bolli R. Cell therapy for ischaemic heart disease: focus on the role of resident cardiac stem cells. *Neth Heart J*. May 2009;17(5):199-207.
415. Vrijisen KR, Chamuleau SA, Noort WA, Doevendans PA, Sluijter JP. Stem cell therapy for end-stage heart failure: indispensable role for the cell? *Curr Opin Organ Transplant*. Oct 2009;14(5):560-565.
416. Tang Y, Zhang D, Fallavollita L, Brodt P. Vascular endothelial growth factor C expression and lymph node metastasis are regulated by the type I insulin-like growth factor receptor. *Cancer Res*. Mar 15 2003;63(6):1166-1171.
417. Chavakis E, Urbich C, Dimmeler S. Homing and engraftment of progenitor cells: a prerequisite for cell therapy. *J Mol Cell Cardiol*. Oct 2008;45(4):514-522.
418. Lagostena L, Avitabile D, De Falco E, et al. Electrophysiological properties of mouse bone marrow c-kit⁺ cells co-cultured onto neonatal cardiac myocytes. *Cardiovasc Res*. Jun 1 2005;66(3):482-492.
419. Deb A, Wang S, Skelding KA, Miller D, Simper D, Caplice NM. Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation*. Mar 11 2003;107(9):1247-1249.
420. Akatsuka Y, Torikai H, Inamoto Y, et al. Bone marrow may be a reservoir of long-lived memory T cells specific for minor histocompatibility antigen. *Br J Haematol*. Nov 2006;135(3):413-414.
421. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*. Apr 1999;5(4):434-438.
422. Fazel SS, Chen L, Angoulvant D, et al. Activation of c-kit is necessary for mobilization of reparative bone marrow progenitor cells in response to cardiac injury. *FASEB J*. Mar 2008;22(3):930-940.
423. Xiang FL, Lu X, Hammoud L, et al. Cardiomyocyte-specific overexpression of human stem cell factor improves cardiac function and survival after myocardial infarction in mice. *Circulation*. Sep 22 2009;120(12):1065-1074, 1069 p following 1074.
424. Hattori K, Heissig B, Tashiro K, et al. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood*. Jun 1 2001;97(11):3354-3360.
425. Wright DE, Bowman EP, Wagers AJ, Butcher EC, Weissman IL. Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines. *J Exp Med*. May 6 2002;195(9):1145-1154.
426. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med*. Aug 2004;10(8):858-864.
427. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med*. Nov 2003;9(11):1370-1376.
428. Verma S, Kuliszewski MA, Li SH, et al. C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a

- mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease. *Circulation*. May 4 2004;109(17):2058-2067.
429. Westenbrink BD, Lipsic E, van der Meer P, et al. Erythropoietin improves cardiac function through endothelial progenitor cell and vascular endothelial growth factor mediated neovascularization. *Eur Heart J*. Aug 2007;28(16):2018-2027.
430. Delgaudine M, Gothot A, Beguin Y. Spontaneous and granulocyte-colony-stimulating factor-enhanced marrow response and progenitor cell mobilization in mice after myocardial infarction. *Cytotherapy*. Mar 15 2010.
431. Lemieux C, Cloutier I, Tanguay JF. Menstrual cycle influences endothelial progenitor cell regulation: a link to gender differences in vascular protection? *Int J Cardiol*. Aug 14 2009;136(2):200-210.
432. Simons D, Grieb G, Hristov M, et al. Hypoxia-induced endothelial secretion of macrophage migration inhibitory factor and role in endothelial progenitor cell recruitment. *J Cell Mol Med*. Feb 22 2010.
433. Honold J, Lehmann R, Heeschen C, et al. Effects of granulocyte colony stimulating factor on functional activities of endothelial progenitor cells in patients with chronic ischemic heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Oct 2006;26(10):2238-2243.
434. Landmesser U, Engberding N, Bahlmann FH, et al. Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. Oct 5 2004;110(14):1933-1939.
435. Suzuki G, Iyer V, Cimato T, Canty JM, Jr. Pravastatin improves function in hibernating myocardium by mobilizing CD133+ and cKit+ bone marrow progenitor cells and promoting myocytes to reenter the growth phase of the cardiac cell cycle. *Circ Res*. Jan 30 2009;104(2):255-264, 210p following 264.
436. Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, et al. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow--derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest*. Aug 2001;108(3):399-405.
437. Srinivasan R, Takahashi Y, McCoy JP, et al. Overcoming graft rejection in heavily transfused and allo-immunised patients with bone marrow failure syndromes using fludarabine-based haematopoietic cell transplantation. *Br J Haematol*. May 2006;133(3):305-314.
438. Werner N, Priller J, Laufs U, et al. Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Oct 1 2002;22(10):1567-1572.
439. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest*. Aug 2001;108(3):391-397.
440. Bahlmann FH, de Groot K, Mueller O, Hertel B, Haller H, Fliser D. Stimulation of endothelial progenitor cells: a new putative therapeutic effect of angiotensin II receptor antagonists. *Hypertension*. Apr 2005;45(4):526-529.

441. Foresta C, Lana A, Cabrelle A, et al. PDE-5 inhibitor, Vardenafil, increases circulating progenitor cells in humans. *Int J Impot Res.* Jul-Aug 2005;17(4):377-380.
442. Losordo DW, Schatz RA, White CJ, et al. Intramyocardial transplantation of autologous CD34+ stem cells for intractable angina: a phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial. *Circulation.* Jun 26 2007;115(25):3165-3172.
443. Tse HF, Thambar S, Kwong YL, et al. Prospective randomized trial of direct endomyocardial implantation of bone marrow cells for treatment of severe coronary artery diseases (PROTECT-CAD trial). *Eur Heart J.* Dec 2007;28(24):2998-3005.
444. van Ramshorst J, Atsma DE, Beeres SL, et al. Effect of intramyocardial bone marrow cell injection on left ventricular dyssynchrony and global strain. *Heart.* Feb 2009;95(2):119-124.
445. Assmus B, Fischer-Rasokat U, Honold J, et al. Transcoronary transplantation of functionally competent BMCs is associated with a decrease in natriuretic peptide serum levels and improved survival of patients with chronic postinfarction heart failure: results of the TOPCARE-CHD Registry. *Circ Res.* Apr 27 2007;100(8):1234-1241.
446. Assmus B, Honold J, Schachinger V, et al. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med.* Sep 21 2006;355(12):1222-1232.
447. Menasche P. Skeletal myoblasts and cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol.* Dec 4 2007.
448. Menasche P. Current status and future prospects for cell transplantation to prevent congestive heart failure. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* Summer 2008;20(2):131-137.
449. Menasche P, Alfieri O, Janssens S, et al. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) Trial. First Randomized Placebo-Controlled Study of Myoblast Transplantation. *Circulation.* Feb 19 2008.
450. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* Apr 2 2003;41(7):1078-1083.
451. Hagege AA, Marolleau JP, Vilquin JT, et al. Skeletal myoblast transplantation in ischemic heart failure: long-term follow-up of the first phase I cohort of patients. *Circulation.* Jul 4 2006;114(1 Suppl):I108-113.
452. Dimmeler S, Burchfield J, Zeiher AM. Cell-based therapy of myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Feb 2008;28(2):208-216.
453. Boudina S, Bugger H, Sena S, et al. Contribution of impaired myocardial insulin signaling to mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the heart. *Circulation.* Mar 10 2009;119(9):1272-1283.
454. McMurray J, Pfeffer MA. New therapeutic options in congestive heart failure: Part II. *Circulation.* May 7 2002;105(18):2223-2228.
455. McMurray J, Pfeffer MA. New therapeutic options in congestive heart failure: Part I. *Circulation.* Apr 30 2002;105(17):2099-2106.

456. Kucia M, Dawn B, Hunt G, et al. Cells expressing early cardiac markers reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood after myocardial infarction. *Circ Res*. Dec 10 2004;95(12):1191-1199.
457. Nolan DJ, Ciarrocchi A, Mellick AS, et al. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization. *Genes Dev*. Jun 15 2007;21(12):1546-1558.
458. Shantsila E, Watson T, Lip GY. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders. *J Am Coll Cardiol*. Feb 20 2007;49(7):741-752.
459. Fritzenwanger M, Lorenz F, Jung C, et al. Differential number of CD34+, CD133+ and CD34+/CD133+ cells in peripheral blood of patients with congestive heart failure. *Eur J Med Res*. Mar 17 2009;14(3):113-117.
460. Dimmeler S, Zeiher AM. Vascular repair by circulating endothelial progenitor cells: the missing link in atherosclerosis? *J Mol Med*. Oct 2004;82(10):671-677.
461. Heeschen C, Lehmann R, Honold J, et al. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation*. Apr 6 2004;109(13):1615-1622.
462. Ballard VL, Edelberg JM. Stem cells and the regeneration of the aging cardiovascular system. *Circ Res*. Apr 27 2007;100(8):1116-1127.
463. Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. Aug 2004;15(8):1983-1992.
464. Rochefort GY. Circulating progenitor cells in coronary heart disease. *Heart*. Jun 2008;94(6):793-794; author reply 794.
465. Eizawa T, Ikeda U, Murakami Y, et al. Decrease in circulating endothelial progenitor cells in patients with stable coronary artery disease. *Heart*. Jun 2004;90(6):685-686.
466. Xiao Q, Kiechl S, Patel S, et al. Endothelial progenitor cells, cardiovascular risk factors, cytokine levels and atherosclerosis--results from a large population-based study. *PLoS One*. 2007;2(10):e975.
467. Testa M, Yeh M, Lee P, et al. Circulating levels of cytokines and their endogenous modulators in patients with mild to severe congestive heart failure due to coronary artery disease or hypertension. *J Am Coll Cardiol*. Oct 1996;28(4):964-971.
468. Karra R, Vemullapalli S, Dong C, et al. Molecular evidence for arterial repair in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 15 2005;102(46):16789-16794.
469. Fujiyama S, Amano K, Uehira K, et al. Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells. *Circ Res*. Nov 14 2003;93(10):980-989.
470. Burchfield JS, Iwasaki M, Koyanagi M, et al. Interleukin-10 from transplanted bone marrow mononuclear cells contributes to cardiac protection after myocardial infarction. *Circ Res*. Jul 18 2008;103(2):203-211.
471. Losordo DW, Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapies. *Circulation*. Jun 8 2004;109(22):2692-2697.

472. Gill M, Dias S, Hattori K, et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res*. Feb 2 2001;88(2):167-174.
473. Agnoletti L, Curello S, Bachetti T, et al. Serum from patients with severe heart failure downregulates eNOS and is proapoptotic: role of tumor necrosis factor- α . *Circulation*. Nov 9 1999;100(19):1983-1991.
474. Rupp S, Badorff C, Koyanagi M, et al. Statin therapy in patients with coronary artery disease improves the impaired endothelial progenitor cell differentiation into cardiomyogenic cells. *Basic Res Cardiol*. Jan 2004;99(1):61-68.
475. Metra M, Zaca V, Nodari S, Cas LD, Maggioni AP. [The CORONA study]. *G Ital Cardiol (Rome)*. Apr 2008;9(4):229-233.
476. Yao EH, Yu Y, Fukuda N. Oxidative stress on progenitor and stem cells in cardiovascular diseases. *Curr Pharm Biotechnol*. Apr 2006;7(2):101-108.
477. Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. *Cell*. Jan 7 2000;100(1):143-155.
478. Mouquet F, Pfister O, Jain M, et al. Restoration of cardiac progenitor cells after myocardial infarction by self-proliferation and selective homing of bone marrow-derived stem cells. *Circ Res*. Nov 25 2005;97(11):1090-1092.
479. Wang Y, Haider HK, Ahmad N, Xu M, Ge R, Ashraf M. Combining pharmacological mobilization with intramyocardial delivery of bone marrow cells over-expressing VEGF is more effective for cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol*. May 2006;40(5):736-745.
480. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation*. Jun 19 2001;103(24):2885-2890.
481. Zhang Q, Liu L, Zheng XY. Protective roles of HDL, apoA-I and mimetic peptide on endothelial function: through endothelial cells and endothelial progenitor cells. *Int J Cardiol*. Apr 17 2009;133(3):286-292.
482. Scheubel RJ, Zorn H, Silber RE, et al. Age-dependent depression in circulating endothelial progenitor cells in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *J Am Coll Cardiol*. Dec 17 2003;42(12):2073-2080.
483. Roberts N, Xiao Q, Weir G, Xu Q, Jahangiri M. Endothelial progenitor cells are mobilized after cardiac surgery. *Ann Thorac Surg*. Feb 2007;83(2):598-605.
484. Ruel M, Suuronen EJ, Song J, et al. Effects of off-pump versus on-pump coronary artery bypass grafting on function and viability of circulating endothelial progenitor cells. *J Thorac Cardiovasc Surg*. Sep 2005;130(3):633-639.
485. Fallavollita JA, Perry BJ, Canty JM, Jr. 18F-2-deoxyglucose deposition and regional flow in pigs with chronically dysfunctional myocardium. Evidence for transmural variations in chronic hibernating myocardium. *Circulation*. Apr 1 1997;95(7):1900-1909.
486. Fallavollita JA, Malm BJ, Canty JM, Jr. Hibernating myocardium retains metabolic and contractile reserve despite regional reductions in flow, function, and oxygen consumption at rest. *Circ Res*. Jan 10 2003;92(1):48-55.
487. Fallavollita JA, Logue M, Canty JM, Jr. Stability of hibernating myocardium in pigs with a chronic left anterior descending coronary artery stenosis: absence of

- progressive fibrosis in the setting of stable reductions in flow, function and coronary flow reserve. *J Am Coll Cardiol*. Jun 1 2001;37(7):1989-1995.
488. Schulz R, Guth BD, Pieper K, Martin C, Heusch G. Recruitment of an inotropic reserve in moderately ischemic myocardium at the expense of metabolic recovery. A model of short-term hibernation. *Circ Res*. Jun 1992;70(6):1282-1295.
489. Schulz R, Rose J, Martin C, Brodde OE, Heusch G. Development of short-term myocardial hibernation. Its limitation by the severity of ischemia and inotropic stimulation. *Circulation*. Aug 1993;88(2):684-695.
490. Cauty JM, Jr., Suzuki G, Banas MD, Verheyen F, Borgers M, Fallavollita JA. Hibernating myocardium: chronically adapted to ischemia but vulnerable to sudden death. *Circ Res*. Apr 30 2004;94(8):1142-1149.
491. Bompais H, Chagraoui J, Canron X, et al. Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood*. Apr 1 2004;103(7):2577-2584.
492. Cauty JM, Jr., Fallavollita JA. Hibernating myocardium represents a primary downregulation of regional myocardial oxygen consumption distal to a critical coronary stenosis. *Basic Res Cardiol*. Jan-Feb 1995;90(1):5-8.
493. Cauty JM, Jr., Fallavollita JA. Hibernating myocardium. *J Nucl Cardiol*. Jan-Feb 2005;12(1):104-119.
494. Boilson BA, Larsen K, Harbuzariu A, et al. Regulation of Circulating Progenitor Cells in Left Ventricular Dysfunction. *Circ Heart Fail*. Jun 23 2010.
495. Dimmeler S. Regulation of bone marrow-derived vascular progenitor cell mobilization and maintenance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Jun 2010;30(6):1088-1093.
496. Chen L, Feng P, Li S, et al. Effect of hypoxia-inducible factor-1alpha silencing on the sensitivity of human brain glioma cells to doxorubicin and etoposide. *Neurochem Res*. May 2009;34(5):984-990.
497. Fallavollita JA, Cauty JM, Jr. Ischemic cardiomyopathy in pigs with two-vessel occlusion and viable, chronically dysfunctional myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Apr 2002;282(4):H1370-1379.
498. Chen L, Endler A, Shibasaki F. Hypoxia and angiogenesis: regulation of hypoxia-inducible factors via novel binding factors. *Exp Mol Med*. Dec 31 2009;41(12):849-857.
499. Cauty JM, Jr., Fallavollita JA. Chronic hibernation and chronic stunning: a continuum. *J Nucl Cardiol*. Sep-Oct 2000;7(5):509-527.

Chapitre 13 : Curriculum vitæ

Lieu de naissance : Laval, Québec (Canada)
 Lieu de pratique actuel : Formation postdoctorale en transplantation et assistance circulatoire
 Mayo Clinic
 Adresse : 200 First Street SW
 Rochester, Minnesota 55905
 Unites States
 Téléphone : Téléphone : 1-507-206-0735

EXPÉRIENCE PROFESSIONNELLE

Chirurgien cardiaque associé (assistant) 2010
 Institut de Cardiologie de Montréal
 5000, rue Bélanger est, Montréal (Qc) Canada H1T 1C8

Chirurgien-Intensiviste (soins intensifs chirurgicaux) 2009
 Hôpital Régional de Georges-Dumont (Moncton)
 330, rue Université, Moncton, Nouveau Brunswick E1C 2Z3

ÉDUCATION

M.D., Université de Sherbrooke 1998-2003
 M.Sc. (Physiologie), Université de Sherbrooke 2001-2003
 Résidence en chirurgie cardiaque adulte, Université de Montréal 2003-2009
 Ph.D Sciences Biomédicales, Université de Montréal 2007-2010
 Fellowship transplantation cardiaque et assistance circulatoire, Mayo Clinic 2010-

PUBLICATIONS

Articles : 15 articles avec comités de pair; 7 sans comités de pair
 1 chapitre de livre : « La régénération du cœur par les cellules »
 Résumés : 45 présentés
 Documents audiovisuels : 3 présentés