

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Technologies Biomédicales, Vectorisation, Nanomédecine, Thérapie Cellulaire et Génique, Médecine Régénératrice et Biomatériaux

Par

Alice RANNOU

Cellules souches adultes MuStem humaines : Potentiel thérapeutique dans un contexte d'infarctus du myocarde et vésicules extracellulaires

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 08 Novembre 2019

Unité de recherche : l'Institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Nantes
UMR 703 PAnTher INRA/Oniris, Nantes

Président du jury :

Karl ROUGER

Chargé de Recherche INRA, UMR 703 PAnTher INRA/Oniris, Nantes

Rapporteurs avant soutenance :

Florence SABATIER

Professeur des Universités – Praticien hospitalier, UMR 1076 INSERM, Université Aix Marseille

Jean-Sébastien SILVESTRE

Directeur de Recherche INSERM, UMR S970, Université Paris Descartes

Composition du Jury :

Examineurs : Marisa JACONI

Maître d'Enseignement et Recherche, laboratoire PATIM, Université de Genève

Pascal BERSON

Directeur de Recherche, Département Recherche Cardiovasculaire, SERVIER, Suresnes

Dir. de thèse : Laetitia GUEVEL

Maître de Conférences, Université de Nantes, UMR 703 PAnTher INRA/Oniris, Nantes

Co-dir. de thèse : Flavien CHARPENTIER

Directeur de Recherche INSERM, l'Institut du thorax, Nantes

REMERCIEMENTS

L'écriture des remerciements aura finalement été l'exercice le plus difficile dans la rédaction de cette thèse. Il n'y a pas de littérature, de résultats, de science pour argumenter ces quelques lignes, seuls mes sentiments envers toutes les personnes qui m'ont permis de réaliser ce travail et de vivre cette aventure !

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse. Florence Sabatier et Jean-Sébastien Sylvestre d'avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs. Marisa Jaconi et Pascal Berson d'avoir accepté d'être examinateurs lors de ma soutenance. Merci pour le temps que vous avez accordé à ce travail, pour vos précieux conseils et pertinentes remarques.

Je voudrais également remercier Nathalie Gaborit et Jean-Thomas Vilquin pour leur aide et leurs conseils lors de nos rendez-vous annuels.

Je remercie le Pr. Marie-Anne Colle pour m'avoir accueillie au sein de l'UMR703 PAnTher INRA/Oniris et le Dr. Richard Redon au sein de l'institut du Thorax et de l'unité de recherche U1087.

Je tiens à remercier Karl Rouger qui a permis mon intégration dans la team MuStem il y a maintenant cinq ans. Merci pour tous tes conseils et remarques au cours de ces années qui m'ont fait énormément murir et progresser. Merci également pour ton optimisme et ton soutien à toutes épreuves et m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet !

Je tiens à remercier particulièrement Laëtitia Guével de m'avoir donné ma chance en master et de m'avoir accompagné tout au long de ces années. Merci de m'avoir encouragé à faire de l'enseignement, cette expérience m'a énormément apporté. Merci également pour tous les bons moments autres, passés au laboratoire ou à l'extérieur en France comme à l'étranger.

Merci à Flavien Charpentier de m'avoir accueilli dans son équipe et d'avoir co-encadré ces 3 années de thèse. Eh oui, après un premier stage en L3 me voici de retour en cardio. Merci de m'avoir initié à l'analyse ECG, aux joies de la cardio et pour toutes ces discussions enrichissantes.

Enfin, merci aux membres des différentes plateformes avec qui j'ai eu l'opportunité de travailler, en particulier ceux de l'Unité Thérapeutique Expérimentale (Julien, Malek...), de la plateforme Biosit à Rennes et à Laurence De Beaurepaire de l'IECM pour ces nombreuses heures de discussion autour du qNano et toujours avec le sourire malgré les galères (et l'envie plus d'une fois de le passer par la fenêtre !).

Merci à tous les membres de l'UMR703 qui me supportent maintenant depuis 5 ans et sans qui tout ce travail n'aurait pas été possible. Merci à Thibaut pour sa disponibilité, ses conseils et son aide dans

l'observation des lames histologiques ; sans toi je n'aurai pas découvert les joies de l'histomorphométrie ! A Laurence et Romain qui, pour moi, auront dépoussiéré le scanner de lames et m'auront soutenu (que ce soit à renfort de spécialités régionales ou de musiques en tout genre) pendant toutes ces heures à l'annexe à chercher de la MuStem. Un grand merci à la team culture, Isabelle, Cindy et le petit nouveau, Samuel, vous m'avez toujours soutenu, disponible au quotidien pour essayer de m'aider. Isabelle, merci d'avoir essayé toi aussi, de trouver une MuStem battre, de t'être lancé dans la poursuite de ces innombrables mises au point d'immuno et d'avoir finalement toujours été là. Merci Candice, de m'avoir tout appris en BM, de m'avoir écouté et soutenu toutes ces années. Merci pour tous ces bons moments avec Cindy (et d'autres) au laboratoire comme à l'extérieur. Merci à Mireille, parmi de nombreuses choses, pour ses dizaines et dizaines de coupes réalisées. Merci à Dorothee, reine du bon de commande et de la débrouille et qui aura toujours été là pour m'aider dans tous les tracas administratifs. Merci également à toutes les autres personnes avec qui je n'ai pas forcément eu l'occasion de travailler mais que j'ai côtoyé durant toutes ces années, Johan, Isabelle C. sans oublier les petits nouveaux Rosalie et Mélanie, les anciens Virginie (et Doudou), Carine, Judith et Aurélie et les anciens nouveaux, Sabrina et Karim (maître de la bonne recherche !). Bref, merci à tous pour votre disponibilité et votre soutien.

Merci également aux différents étudiants que j'ai eu l'occasion d'encadrer ou de rencontrer au cours de ces 5 dernières années, un merci tout particulier à Mathilde, toujours là et de bonne humeur, quelques soit les galères et les manips à faire !

Sans oublier les (anciens, nouveaux et futurs) anapath diplômés du Board : Elie, Florian, Elodie et Bérengère. Flo cette année aurait été bien triste sans toi, tes récits que ce soit de covotages, de soirées ou d'autopsie m'auront bien fait rire. A vite pour fêter ton Board et celui d'Elodie ! Mon petit libanais préféré, j'ai essayé d'être la meilleure des pys pour toi (comme tu l'es maintenant pour moi), merci pour tes câlins réconfortants (on ne peut pas en dire autant de certain !) et pour ta gentillesse et ta disponibilité, que tes prochaines aventures (avec Michelle) te réussissent ! A vite à Nantes, Lyon ou au Liban (et oui je n'oublie pas !).

À la team « FoxOman et ses MuStemmettes », que dire à part que cette thèse c'est avec vous et surtout grâce à vous que je l'ai réalisée (toute en restant presque saine d'esprit !). Votre soutien, nos discussions et fous rires auront été essentiels à mon équilibre (mental et physique), que ce soit de manière quotidienne autour de bons plats gourmands au ru ; autour d'apéros (plus ou moins arrosés et dinatoire) ; enfin lors d'occasions plus exceptionnelles comme à Genève ou Lausanne (lors de longues marches nocturnes ou dans le train) ou dans une piscine au Croisic... Quoi qu'il en soit, ces

instants passés ensemble font pour moi partie des meilleurs souvenirs de cette aventure doctorale. Vivement de nouvelles épopées tous les trois !

Marine la meilleure des coupines, binôme depuis la fac, nous avons partagé depuis le début cette aventure. Je te remercie sincèrement d'avoir été à mes côtés pendant toutes ces années, merci pour ton soutien et ton amitié que ce soit dans les bons comme dans les moments difficiles, on en aura vécu des choses ensemble ! Je ne sais pas qui, à part toi, m'aurait suivi dans cette idée folle d'aller bosser à vélo, courir dans la boue, dans ces discussions improbables mais toujours existentielles, m'aurait supporter râler, me plaindre et passer des heures à parler de vacances et projets, hâte de réaliser tout ça maintenant que cette aventure se termine ! J'espère que notre amitié durera encore des années !

Pich-Pich, qui aurait dit en nous voyant en master que l'on finirait tel un vieux couple 5 ans plus tard dans notre petit bureau. Comme de vrais petits vieux, nous sommes les rois des commérages, des petits râleurs et du papotage (surtout moi, c'est vrai) et même si tu ronchannes parfois, au fond on sait tous que je te manque dès que je ne suis pas là. Plus sérieusement, merci d'avoir toujours été là, de m'avoir soutenu, d'avoir vécu tout ça avec moi et d'avoir toujours gardé un œil sur moi (nous). J'espère être à la hauteur et te rendre la pareille !

Claire, copine de galères de fin de thèse, de bureau et d'hôtel, merci pour se soutien mutuel que nous avons tenté de nous apporter mais également pour ses nombreuses discussions aux sujets improbables dont seuls nous deux avons le secret passant du coq à l'âne mais avec toujours autant d'enthousiasme. Tu auras également tenté d'enrichir mon vocabulaire et mes connaissances musicales, merci Pierre Billon (et Sophie !). En sus, tes créations culinaires resteront longtemps gravées dans ma mémoire !

Merci à tous les trois pour tous ces bons moments passés ensembles...

Merci à l'institut du thorax, mon laboratoire d'adoption...

Merci à Gilles Toumaniantz, de m'avoir accompagné tout au long de ce projet, de m'avoir formé à la chirurgie et à l'échographie, nous en aurons passés des heures autour de l'échographe ou d'un rat à parler de sports, de films, de voyages et j'en passe. Merci de m'avoir donné goût à tout ça et de m'avoir transmis ta passion. Ces moments auraient été bien différents sans toi, Agnès, mais comme tu es devenu bien plus qu'une collègue au cours de ces années, tu auras le droit à ton petit paragraphe à toi (surtout que tu l'as gentiment demandé) !

Merci au bureau 227 qui m'a accueilli les bras ouverts (Émeline, Andréa, Leslie et la machine à étiquettes), merci pour nos nombreux échanges (rarement scientifiques) mais qui ont fait du bien au moral !

Merci à Antoine, avec qui nous aurons cohabité dans la salle rat, grâce à toi, j'ai réalisé que finalement une double thoracotomie, c'était soft. Merci pour les quelques leçons d'escalade, de skate et tu resteras le meilleur partenaire de train, un Nantes-Lilles ne sera jamais passé aussi vite ! Hâte de découvrir tes prochaines photos de vacances !

Merci à Marie-Aude, voisine d'animalerie, ta bonne humeur et ton énergie au quotidien, auront été d'un grand soutien durant ses longues heures enfermées là-haut.

Merci à Constance, petite stagiaire devenue thésarde, plus amie que collègue, merci pour toutes ces discussions, ces fou-rires que j'espère encore nombreux.

Merci à Fouzia, tu as été la seule à réussir à me sortir à cette fin de thèse avec ton énergie et ta bonne humeur !

Merci à Stéphan, nouveau copain de bureau, meilleur dénicheur de nourriture et faiseur de bruits en tout genre, j'espère que tous ces connards vont finir par arrêter de faire n'importe quoi et commencer à citer leurs références !

Merci à Damien et Martin, toujours de bonne humeur et le mot pour rire ! Merci à vous deux, j'espère vous revoir au pays du caribou !

Merci à Justine, je crois que nous chantions aussi faux mais que nous en avions autant rien à faire, j'espère que ton voyage aura fini de peaufiner ton apprentissage de Wannabe ! J'espère que l'on aura l'occasion de revivre quelques soirées ensemble, le bal pop n'a pas encore eu une vision complète de nos talents de danseuse ! Nous nous sommes rencontrées bien trop tard ...

Merci également à tous les autres avec qui j'ai partagé un bon moment autour d'une discussion, un fou rire ou une bière, Agnès C., Aurore, Justine, Benjamin L., Sébastien, Corinne, Romain C., Sophie, Bérangère, Florian, Franck, Zeina, Robin et Bastien ...

Merci à tous ceux qui sont devenus plus que des collègues de laboratoire...

A Agnès H, partenaire de manips qui m'a appris à chuchoter à l'oreille des rongeurs. A nos longues discussions autour d'un café ou d'un rat et aux moments plus légers passés ensemble, sans toi cette année aurait été bien triste, ensemble nous aurons tenu bon et vaincu ! Sans oublier que tu resteras à jamais la nounou préférée de Matumba !

A Lydie (Lydouille), pas de science entre nous, juste une histoire d'amitié, de nombreux potins, apéros et émissions (cultes) partagées, sans oublier nos instants sport, que ce soit en nageant ou en courant (tu resteras à jamais la plus grande castreuse que je connaisse !).

A Charlotte (Cachachalot), merci pour ces 23 secondes de footing ensemble, ces discussions autour d'un thé (souvent accompagnées de petites douceurs) et d'avoir révélé en moi l'actrice, éditrice et chanteuse qui se cachait (et aurait p.e du y rester !). Même une fois partie, tu auras réussi à me changer les idées avec tes récits de voyage quand ma seule obsession pendant des semaines était d'observer une MuStem battre.

Merci à mes amis et à ma famille...

Je remercie également tous mes amis pour leur présence de près ou de loin durant ces quatre années. Merci notamment à Emeline, Antoine, Erell, Adèle, Elisa... pour tous les bons moments passés que soit autour d'un brunch, d'une coupe de cheveux, d'un footing ou d'un apéro. Hâte de vous retrouver, que ce soit sur Nantes, Paris ou à l'autre bout du monde !

Un merci, tout particulier, à Maud pour ton soutien sans faille durant toutes ces années et pour tous ces encouragements (qu'ils viennent de toi, d'une toute petite patate ou de Léonardo) ! Qu'est-ce que je serai devenue sans tes blagues (presque toujours drôles), nos vacances (j'espère que les prochaines sont réservées !) et toutes ses compétences parallèles que j'ai développé grâce à toi ! Merci pour tout, maintenant je vais pouvoir me concentrer pleinement sur la mission que tu m'as confié !

Merci également, à tous les copains de l'athlé, avec une pensée particulière pour les VIP, merci pour votre soutien sans faille et cet esprit d'équipe qui m'ont permis de m'évader et de me défouler à vos côtés, que ce soit à l'entraînement, autour d'un verre ou d'un fou rire !

A mes frères, Pierre, Maxime et Titouan, qui ont toujours été là pour me changer les idées. Pendant ces 3 ans, bien que l'on soit chacun à un bout de la France, on a toujours réussi à se retrouver ! Merci à ma maman, toujours prête à nous faire profiter des joies du sud, merci de ton soutien et d'avoir cru en moi jusqu'ici ! Merci également aux cousins et à toute la famille de la Champagne à la Vendée, de m'avoir supporté et permis de m'évader pendant toute cette période. Merci également à la famille Cros, toujours là, dans les bons comme dans les moments plus difficile et a Loustic pour ses léchouilles inopinées.

Au meilleur d'entre tous. Le seul est l'unique. Celui sans qui tout cela n'aurait été possible. Celui sans qui la vie n'aurait jamais été aussi belle.

Un gros big up,

A mon chat,

Matumba.

Enfin je ne peux terminer sans remercier celui qui a partagé toutes ces années que ce soit à distance ou à Nantes et qui a toujours cru en moi (surement même plus que moi !). Tu as toujours été là pour me soutenir et me changer les idées que ce soit en tentant de m'engraisser à base de nutella et pizza, en we à Turin, Paris ou au milieu de nulle part (je parle, bien sûr, de chez toi), de me transformer en boxeuse professionnelle, en me préparant un café quand les yeux ne s'ouvraient plus (ou une tartine), en (tentant) de développer mes talents artistiques (il y a encore du boulot) ou simplement en me prenant dans tes bras. Notre aventure à deux ne fait que commencer.

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS	1
CONTEXTE SCIENTIFIQUE	5
Chapitre 1 : Infarctus du myocarde	7
1. <i>Epidémiologie</i>	7
2. <i>Présentation de la maladie</i>	9
a) Définition de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)	9
b) Étiologie	13
c) Facteurs de risque	14
3. <i>Prise en charge thérapeutique</i>	14
a) Manifestations cliniques	14
b) Diagnostic	15
c) Traitement actuel	18
d) Complications précoces consécutives à un IDM	21
4. <i>Conséquences tissulaires et adaptations cardiaques</i>	22
a) Remodelage tissulaire et adaptation fonctionnelle	22
b) Évolution et développement d'une insuffisance cardiaque	27
5. <i>Modèles animaux expérimentaux : avantages et limites</i>	28
a) Le rat comme modèle de pathologies cardiaques	28
b) Autres modèles animaux utilisés	29
6. <i>Etat de la recherche actuelle sur l'infarctus du myocarde et l'insuffisance cardiaque</i>	30
Chapitre 2 : Médecine régénérative et cœur	33
1. <i>Concept</i>	33
2. <i>Étude des différents candidats cellulaires</i>	34
a) Agents de 1 ^{ère} génération	36
b) Types cellulaires de 2 ^{nde} génération	47
3. <i>Mécanismes cellulaires associés à la réparation cardiaque</i>	57
a) Différentiation cardiomyogénique/angiogénique directe	58
b) Fusion cellulaire	61
c) Stimulation indirecte du remodelage cardiaque par des effets paracrines	61
4. <i>Défis actuels, questions non résolues et orientations futures</i>	68
a) Candidat cellulaire	68
b) Dose cellulaire	69
c) Voie d'administration	69
d) Fréquence d'administration	71
e) Limites liées à l'amplification <i>ex vivo</i>	72
f) Greffe (rétention et survie)	72
g) Notion de greffe autologue <i>versus</i> allogénique	74
h) Tumorigénicité	75
5. <i>Optimisation</i>	75
a) Engagement dans la lignée cardiaque	76
b) Prétraitement tissulaire	79
c) Préconditionnement hypoxique	79

d)	Prétraitements pharmacologiques	79
e)	Ingénierie tissulaire	80
Chapitre 3 : Vésicules extracellulaires : de la biogenèse au potentiel impact clinique dans les pathologies cardiaques		81
1.	<i>Développements récents en terme de nomenclature, techniques d'isolement, détection et biogenèse</i>	81
a)	Généralités	81
b)	Classification des différents types de vésicules	82
c)	Caractéristiques biochimiques : composition	86
d)	Différentes techniques de purification	90
e)	Techniques d'analyse qualitative et quantitative	94
2.	<i>Rôle des vésicules extracellulaires cardiaques endogènes dans un contexte sain et pathologique</i>	97
3.	<i>MicroARN exosomiques cardiaques comme biomarqueurs diagnostiques de l'infarctus aigu du myocarde</i>	99
4.	<i>Vésicules extracellulaires/exosomes comme médiateurs de la thérapie cellulaire dans l'infarctus du myocarde et l'insuffisance cardiaque</i>	101
5.	<i>Thérapies à base d'exosomes ou de vésicules extracellulaires</i>	103
POSITIONNEMENT DES TRAVAUX DE THÈSE		107
1.	<i>Positionnement des travaux de thèse</i>	109
2.	<i>Objectifs des travaux de thèse</i>	110
RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX		111
Chapitre 1 : Remodelage tissulaire et fonctionnel du cœur infarci consécutivement à la greffe des cellules hMuStem		113
1.	<i>Positionnement</i>	113
2.	<i>Résumé de la démarche expérimentale</i>	114
a)	Prélèvement musculaire humain	114
b)	Caractérisation des cellules hMuStem : Digital gene expression sequencing	115
c)	Culture des cellules hMuStem en milieu de différenciation	115
d)	Réalisation de culots secs	116
e)	Extraction ARN et traitement DNase	116
f)	PCR quantitative	116
g)	Design expérimental de l'étude <i>in vivo</i>	117
h)	Animaux	117
i)	Préparation des sérums	118
j)	Cytométrie en flux	118
k)	Analyses statistiques	118
3.	<i>Résumé des résultats obtenus</i>	119
4.	<i>Résultats</i>	120
a)	Marqueurs cardiomyogéniques de la population hMuStem	120
b)	Etude du potentiel de différenciation cardiomyogénique des cellules hMuStem	121
c)	Validation du protocole expérimental chez le rat immunodéficient	124
d)	Implantation et survie des cellules hMuStem dans un myocarde sain	125
e)	Absence de réponse humorale consécutive à la xéno greffe	128
f)	Article	129
Chapitre 2 : Caractérisation des vésicules extracellulaires produites par les cellules hMuStem		189
1.	<i>Positionnement</i>	189
2.	<i>Matériel et Méthodes</i>	189

a)	Culture des cellules hMuStem	189
b)	Isolement et caractérisation des vésicules extracellulaires	190
3.	<i>Résultats expérimentaux obtenus</i>	198
a)	Production des VE ^{hMuStem} en condition normoxique	198
b)	Production des VE ^{hMuStem} en condition hypoxique	201
c)	Observation des VE ^{hMuStem} en microscopie confocale et super-résolution	203
d)	Etude d'internalisation des VE ^{hMuStem} par les myoblastes et les cellules hMuStem	205
DISCUSSION		207
1.	<i>Capacité des cellules hMuStem à s'implanter dans le tissu myocardique</i>	209
2.	<i>Mécanismes cellulaires impliqués dans la réparation cardiaque</i>	212
3.	<i>Vésicules extracellulaires secrétées par les cellules hMuStem</i>	218
4.	<i>Limites de l'étude</i>	219
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES		223
ANNEXES		272
1.	<i>Valorisation scientifique</i>	273
2.	<i>Curriculum Vitae</i>	274

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Proportion des différentes causes de mortalité en Europe chez les hommes (A) et les femmes (B) selon l'Organisation Mondiale de la Santé.....	8
Figure 2 : Classification des différents types d'infarctus du myocarde en fonction de l'atteinte coronarienne.....	10
Figure 3 : Anatomie cardiaque et circulation coronarienne.....	11
Figure 4 : Deux types d'infarctus du myocarde en fonction de l'occlusion coronarienne	12
Figure 5 : Deux types d'infarctus du myocarde (Stemi et Nstemi) en fonction de la modification du tracé ECG.....	12
Figure 6 : Développement d'une plaque d'athérome conduisant à la formation d'un thrombus.	13
Figure 7 : Différentes modifications du tracé ECG.....	16
Figure 8 : Évolution dans le temps des différents biomarqueurs cardiaques.....	18
Figure 9 : Prise en charge thérapeutique suite à un IDM.....	19
Figure 10 : Différentes phases du remodelage cardiaque après un IDM.....	23
Figure 11 : Rôle des cellules immunitaires au cours de la cicatrisation suite à un IDM	24
Figure 12 : Illustrations histologiques des différents stades tissulaires consécutif à un infarctus du myocarde chez l'Homme	26
Figure 13 : Principaux candidats investigués en thérapie cellulaire cardiaque.....	35
Figure 14 : Schéma récapitulatif des principaux mécanismes impliqués dans l'impact de la thérapie cellulaire cardiaque	58
Figure 15 : Mécanismes impliqués dans la régénération cardiaque	59
Figure 16 : Mécanismes impliqués dans la néovascularisation.....	62
Figure 17 : Biogenèse et mécanisme d'action des miARN	64
Figure 18 : Défis actuels de la thérapie cellulaire pour les pathologies cardiaques.....	68
Figure 19 : Différentes voies d'injection des cellules.....	70
Figure 20 : Mécanismes cellulaires limitant la rétention et la survie des cellules in situ	73
Figure 21: Comparaison de la thérapie cellulaire autologue et allogénique	75
Figure 22 : Stratégies d'optimisation de la thérapie cellulaire cardiaque	76
Figure 23 : Différentes classes de vésicules extracellulaires selon leur origine et leur taille .	82
Figure 24 : Synthèse schématique de la biogenèse et sécrétion des exosomes.....	85
Figure 25 : Composition des vésicules extracellulaires.....	89
Figure 26 : Concentration particulaire mesurée en fonction du diamètre des VE et de la technique utilisée.....	93
Figure 27 : Revue de six différents types cellulaires sécrétant des VE ayant un potentiel thérapeutique cardiaque.....	103
Figure 28 : Phénotype spécifique de la population de cellules souches hMuStem déterminé par une étude globale de DEseq.....	120
Figure 29 : Illustrations représentatives des deux types de culture obtenus grâce à la validation des premiers éléments après ajout des différentes combinaisons d'AR et de PDGF-BB.	122
Figure 30 : Morphologies cellulaires obtenues suite aux différentes combinaisons testées.	123
Figure 31: Analyse qPCR du gène musculaire myogénine sur différentes conditions de culture testées.	124
Figure 32 : Protocole expérimental de chirurgie chez le rat.	125

Figure 33 : Implantation des cellules hMuStem dans le cœur de rat sain à différents temps.	126
Figure 34 : Mise en évidence de la présence de cellules humaines à J1 post-transplantation dans la lumière des vaisseaux au niveau des poumons.....	127
Figure 35 : Analyse de la présence d'anticorps anti-IgG humaines dans les sérums de rats.	129
Figure 36 : Protocole d'isolement des VE issues des cellules hMuStem basé sur des centrifugations différentielles.....	191
Figure 37 : A) Appareillage qNano qui va être relié à un ordinateur qui suite à une analyse des données va fournir les schémas suivants. B) Schémas explicatifs de l'analyse qNano	192
Figure 38 : Microscope électronique 200 kV et porte-échantillon.....	194
Figure 39 : Principe de fonctionnement du marquage au Membright.....	196
Figure 40 : Distribution de la population de VE obtenue en condition normoxique. Expérience réalisée au qNano avec un nanopore 200 sur quatre lots indépendants de VE ^{hMuStem}	199
Figure 41 : Illustrations des différents types de vésicules observées en cryo-TEM.	200
Figure 42 : Caractérisation phénotypique des VE par WB.	201
Figure 43 : Distribution et concentration en particules des VE obtenues au qNano après conditionnement normoxique et hypoxique des cellules.....	202
Figure 44 : A) Illustrations représentatives des VE ^{hMuStem} Hypo en cryo-TEM. B) Analyse comparative de la taille des vésicules obtenues selon le conditionnement.....	203
Figure 45 : Visualisation en microscopie confocale spectrale de VE marquées MemBright couplé à la Cyanine 3 ou 5	204
Figure 46 : VE imagées en super résolution au microscope dSTORM.	205
Figure 47 : A) Instantané du live imaging de l'internalisation des VE par des cellules hMuStem. B) Visualisation de VE internalisées dans des cellules fixées.	206
Figure 48 : Mécanismes impliqués dans la réparation tissulaire suite à l'injection des cellules hMuStem.	213

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Différentes techniques d'imagerie non-invasive disponibles pour le diagnostic de l'IDM	17
Tableau II : Différents modèles animaux d'IDM.	30
Tableau III : Récapitulatif des principaux essais cliniques réalisés avec des cellules souches adultes cardiaques	53
Tableau IV : Récapitulatif des principaux candidats cellulaires testés en essais cliniques	56
Tableau V : miRNA cardiaques impliqués dans la réparation cardiovasculaire	66
Tableau VI : Cytokines et facteurs de croissance impliqués dans la différenciation cardiaque	77
Tableau VII : Petites molécules impliquées dans la différenciation cardiaque	78
Tableau VIII : Avantages et limites des principales techniques utilisées pour isoler les VE. ...	91
Tableau IX : Tableau récapitulatif des différents paramètres testés en culture 2D.	115
Tableau X : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour la caractérisation des VE.....	195

LISTE DES ABREVIATIONS

ATMSC : Cellule souche mésenchymateuse issue du tissu adipeux
BMMNC : Cellule souche mononucléée issue de la moëlle osseuse
CABG : Pontage coronarien
CAD : Coronopathie
cATMSC : Cellule souche mésenchymateuse issue du tissu adipeux cardiaque
CDC : Cardiosphère
CM : Cardiomyocyte
CPE : Cellule progénitrice endothéliale
CS : Cellule souche
CSA : Cellule souche adulte
CSC : Cellule souche cardiaque
CSE : Cellule souche embryonnaire
CSH : Cellule souche hématopoïétique
CSM : Cellule souche mésenchymateuse
DCI : Défibrillateur cardiovertteur implantable
ECG : Electrocardiogramme
FEVG : Fraction d'éjection ventriculaire gauche
FGF : Facteur de croissance fibroblastique
HES : Hemalun éosine safran
HGF : Facteur de croissance hépatocytaire
IC : Insuffisance cardiaque
IDM : Infarctus du myocarde
IGF : Facteur de croissance insuline-like
iPSC : Cellule souche pluripotente induite
LBBB : Bloc de branche gauche
LVESV : Volume de fin de systole du ventricule gauche
MCV : Maladies Cardiovasculaires
MDSC : Cellule souche dérivée du muscle
MEC : Matrice extracellulaire
miARN : microARN

MMP : Metalloprotéinase de la matrice

MP : Membrane plasmique

MV : Microvésicule

MVB : Corps multivésiculaire

NK : Natural killer

NSTEMI : Infarctus du myocarde sans élévation du segment ST

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

SP : Side population

STEMI : Infarctus du myocarde avec élévation du segment ST

TGF- β : Facteur de croissance transformant bêta

UCBMSC : Cellule souche mésenchymateuse issue du sang de cordon ombilical

VD : Ventricule droit

VE : Vésicule extracellulaire

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VG : Ventricule gauche

WJMSC : Cellule souche mésenchymateuse issue de la gelée de Wharton

AVANT-PROPOS

L'insuffisance cardiaque est un problème majeur de santé publique dans les pays industrialisés. D'un point de vue médical, sa prise en charge reste imparfaite et ne permet qu'un ralentissement de l'évolution de la maladie. Les pathologies coronariennes dont la plus fréquente est l'infarctus du myocarde représente la cause majeure de développement d'insuffisance cardiaque. Sur la base des résultats précliniques et des enseignements tirés des premiers essais chez l'Homme, l'approche de thérapie cellulaire représente une proposition thérapeutique prometteuse. Cependant, une faible viabilité et une absence de prise de greffe à moyen-long terme des différents candidats cellulaires testés ont été observées, limitant fortement les bénéfices structurels et fonctionnels sur le cœur infarcté.

Au sein du laboratoire, nous avons successivement décrit chez le Chien puis chez l'Homme une population de cellules souches dérivées du muscle squelettique - nommées MuStem - qui présente une capacité à promouvoir la réparation des muscles squelettiques après leur administration en contexte lésionnel. Consécutivement à un protocole de transplantation allogénique, une amélioration du taux de survie, de la greffe à long terme et de la participation à la formation de fibres musculaires de ces cellules ont été mis en évidence comparativement aux myoblastes, premiers candidats testés en médecine réparatrice. Par ailleurs, un remodelage tissulaire important et persistant ainsi que des bénéfices cliniques ont été décrits chez le chien dystrophique positionnant la population MuStem comme candidat thérapeutique prometteur pour les affections musculo-squelettiques.

Ces dernières années, des cellules murines similaires ont montré un effet bénéfique dans un contexte de lésion cardiaque (Oshima et al. 2005; Payne et al. 2007; Sekiya et al. 2013). Par ailleurs, les CSM ont été présentées comme étant capables de moduler la fonction cardiaque principalement par l'intermédiaire de leurs facteurs trophiques, notamment ceux véhiculés par les VE (Valadi et al. 2007). L'ensemble de ces données laisse suggérer que des cellules primitives non résidentes du muscle cardiaque pourraient constituer un support biologique intéressant pour la mise en place d'approches de thérapie cellulaire cardiaque. Sur la base de ce constat et des propriétés attribuées aux cellules MuStem, il apparaît intéressant de s'interroger sur le potentiel de réparation de cette population de cellules adultes oligopotentes dans un contexte d'infarctus du myocarde.

Ainsi, l'objectif général de mon projet de thèse a été de définir si les cellules souches hMuStem peuvent s'implanter dans le tissu cardiaque en contexte sain et pathologique, interagir avec

les cellules environnantes et influencer positivement sur le remaniement tissulaire du cœur infarci. Pour cela, un protocole d'induction d'infarctus par ligature coronaire a été réalisé sur un modèle de rat immunodéficient suivi d'une xénotransplantation intramyocardique des cellules hMuStem une semaine après. Une exploration fonctionnelle (ECG /échocardiographique), moléculaire et histologique a été réalisée.

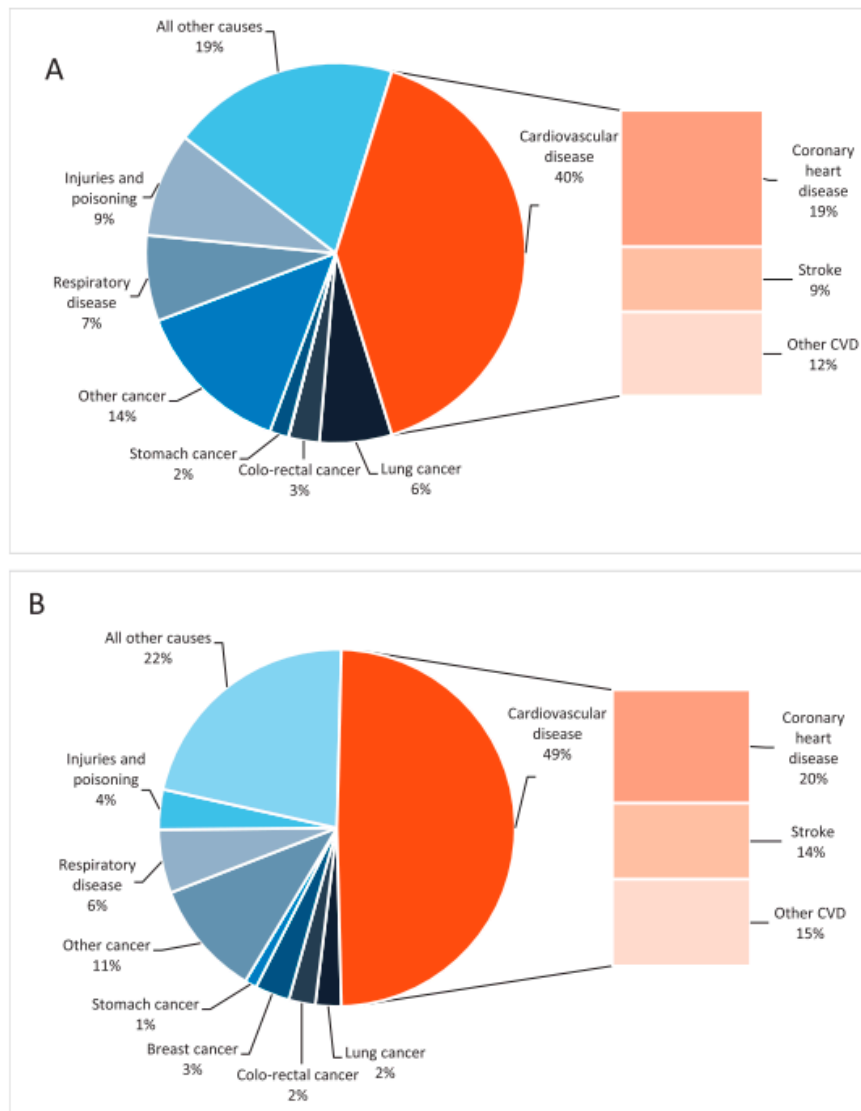
Pour compléter cette première étude *in vivo*, des travaux ont été engagés *in vitro* sur l'activité sécrétoire à travers une exploration des VE.

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Chapitre 1 : Infarctus du myocarde

1. Épidémiologie

Les maladies cardiovasculaires (MCV) constituent la première cause de mortalité dans le monde avec 17.3 millions de décès selon les données de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Cela représente environ 34% de la mortalité mondiale totale (Townsend et al. 2015). Cette prévalence est en constante augmentation, puisqu'en 1990, elle ne représentait que 25.9% de la mortalité mondiale totale. En Europe, malgré une baisse de la mortalité due aux MCV, plus de 4 millions de personnes en meurent chaque année, représentant environ 45% de la mortalité globale. On dénombre 1.4 millions de décès prématurés c'est-à-dire avant l'âge de 75 ans. De façon surprenante, bien que les MCV soient souvent considérées comme des maladies touchant préférentiellement les hommes, depuis 1984 aux États-Unis, le taux de mortalité annuel lié à une pathologie cardiaque est plus élevé chez les femmes (Figure 1). Ce taux de mortalité est plus élevé chez les femmes (2.2 millions) que chez les hommes (1.8 millions), représentant respectivement 49% et 40% de la mortalité globale (Sanchis-Gomar et al. 2016) (Figure 1). Afin de diminuer l'écart entre les femmes et les hommes et le manque de connaissances en recherche sur ce sujet, l'*American Heart Association* a réalisé un premier rapport scientifique sur l'infarctus aigu du myocarde chez la femme ce qui a permis de mettre en évidence de nombreuses différences liées au genre. Par exemple, les femmes vont avoir une prévalence accrue de décès due à l'érosion de plaques comparé aux hommes. De plus, bien qu'ils partagent des facteurs de risque similaires pour les pathologies coronariennes, comme la consommation de tabac, le diabète de type 2, la dépression et le stress émotionnel, ces facteurs sont plus puissants chez les femmes. Des différences liées au genre vont également exister au niveau des signes cliniques avec une présentation plus fréquente chez les femmes de signes atypiques ayant des conséquences dramatiques en termes de diagnostic et traitement ce qui conduit à une augmentation du taux de décès. Malgré cela, la prise en charge thérapeutique (reperfusion) est similaire pour les deux sexes bien que les risques d'hémorragies et de complications soient plus élevés chez les femmes. Pour remédier à ces lacunes, les politiques doivent élaborer des solutions afin d'accroître la participation des femmes dans les essais cliniques mais, en amont, seul une recherche sexe-spécifique permettrait d'atténuer le manque de connaissance (Mehta et al. 2016).



Note: no data available for Andorra.
Source: WHO Mortality Database.

Figure 1 : Proportion des différentes causes de mortalité en Europe chez les hommes (A) et les femmes (B) selon l'Organisation Mondiale de la Santé. (Townsend et al., 2015)

Parmi les MCV, les pathologies coronaires représentent la première cause de mortalité avec 1.8 millions de décès. L'infarctus du myocarde (IDM), qui est la coronopathie (CAD) la plus fréquente, constitue une urgence cardiologique absolue dont l'incidence reste encore élevée avec 120 000 cas par an en France. En effet, son pronostic reste sévère puisque l'IDM est responsable de 10 à 12% de la mortalité totale annuelle chez l'adulte. A cette mortalité, il faut ajouter une morbidité importante et un retentissement socio-économique conséquent. L'IDM est une pathologie avec un risque fatal important à court et à moyen terme mais sa morbi-

mortalité a toutefois été réduite de façon significative depuis 20 ans grâce aux progrès réalisés à plusieurs niveaux d'intervention conduisant à une prise en charge rapide et efficiente.

2. Présentation de la maladie

a) Définition de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)

L'IDM est caractérisé par une réduction de la perfusion myocardique qui conduit à une ischémie prolongée et une mort cellulaire massive. En 2007, une nouvelle définition de l'IDM a été adoptée par l'OMS. Cette définition, contrairement aux précédentes, qui impliquait toute nécrose dans le cadre d'une ischémie myocardique, intègre les différentes causes pouvant conduire à un IDM. Cette nouvelle définition a conduit à une classification clinique de l'IDM chez l'Homme basée sur les différences cliniques, physiopathologiques et pronostiques. Il en découle 5 grands types (Thygesen et al. 2007) :

- *Type 1 : IDM spontané*

L'IDM spontané est lié à l'ulcération, la fissuration, l'érosion ou la rupture d'une plaque d'athérome résultant en un thrombus intraluminal dans une ou plusieurs des artères coronaires. Ce thrombus va entraîner une diminution du flux sanguin myocardique ou une embolie plaquettaire distale avec nécrose myocytaire.

Cliniquement, le patient peut avoir une coronaropathie grave sous-jacente, mais dans 5 à 20% des cas, il peut simplement présenter une coronaropathie non-obstructive ou même une absence de coronaropathie à l'angiographie, en particulier chez les femmes.

- *Type 2 : IDM consécutif à une ischémie*

Dans les cas de lésions du myocarde avec nécrose, lorsqu'une affection autre qu'une coronopathie contribue à un déséquilibre entre l'approvisionnement en oxygène du myocarde et/ou la demande, le terme « IDM de type 2 » est employé (Figure 2). Le vasospasme coronarien et/ou le dysfonctionnement endothélial peuvent également causer des IDM tout comme une embolie coronarienne, des brady/tachy-arythmies, l'anémie, des défauts respiratoires, une hypotension ou hypertension associée ou non avec une hypertrophie du myocarde (Moore et al. 2019).

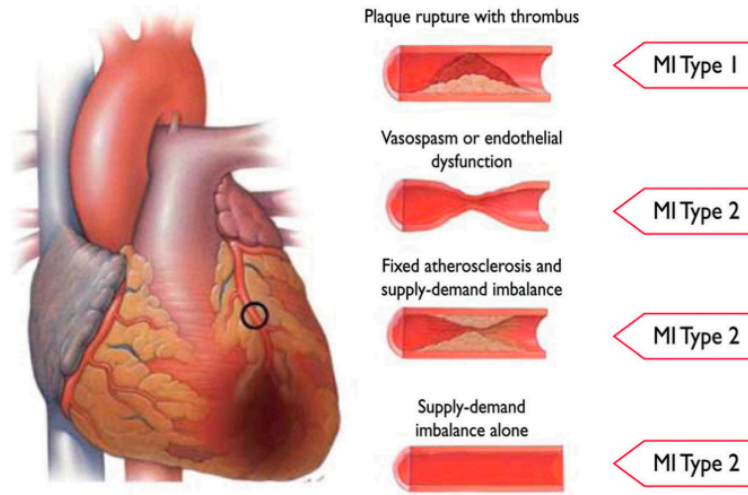


Figure 2 : Classification des différents types d'IDM en fonction de l'atteinte coronarienne. (Thygesen et al., 2012)

- *Type 3 : IDM conduisant au décès du patient avec indisponibilité des biomarqueurs sériques*

Les morts subites avec des symptômes suggérant une ischémie myocardique accompagnée de changements présumés de l'électrocardiogramme (ECG) ischémique ou d'un blocage de conduction - sans résultats des valeurs des biomarqueurs - représentent un groupe de diagnostic difficile. Ces personnes peuvent décéder avant que des échantillons de sang ne soient prélevés ou avant que les biomarqueurs ne soient détectables (troponine T et I, créatine kinase...).

- *Type 4a, b et 5 : IDM lié à une intervention coronarienne percutanée ; une thrombose d'endoprothèse (stent) ; un pontage coronarien*

Suite à une lésion périprocédurale ou à certaines étapes de l'instrumentation cardiaque nécessaire à la revascularisation mécanique, soit par intervention coronarienne percutanée, soit par pontage aortocoronarien, un IDM peut survenir. Des valeurs élevées ou faibles de la troponine cardiaque peuvent être détectées à la suite de ces procédures et traduire une complication.

Cette classification permet une prise en charge thérapeutique facilitée et efficiente (Thygesen et al., 2007).

L'IDM va principalement affecter le ventricule gauche, mais des lésions peuvent s'étendre jusqu'au ventricule droit ou aux oreillettes. L'obstruction de l'artère coronaire droite dominante ou d'une artère circonflexe gauche dominante va conduire à un infarctus du ventricule droit (VD) caractérisé par une élévation de la pression de remplissage du VD, souvent associée à une insuffisance tricuspide et une réduction du débit cardiaque. Un infarctus inféro-postérieur entraîne des dysfonctionnements du VD chez environ la moitié des patients et des troubles hémodynamiques dans 10 à 15% des cas.

Chez tout patient présentant un infarctus postéro-inférieur et une hypotension ou un choc avec pression veineuse jugulaire augmentée, un dysfonctionnement du VD doit être suspecté. Un infarctus touchant à la fois le VD et le VG augmente significativement le risque de décès. Les infarctus localisés en antérieur, sont souvent plus étendus et ont un plus mauvais pronostic que les infarctus inféro-postérieurs. Ces derniers sont généralement consécutifs à une obstruction partielle ou permanente de l'artère coronaire gauche (artère interventriculaire antérieure). Les infarctus inféro-postérieurs reflètent, eux, une obstruction de l'artère coronaire droite ou de l'artère circonflexe gauche (Wang et al. 2004) (Figure 3).

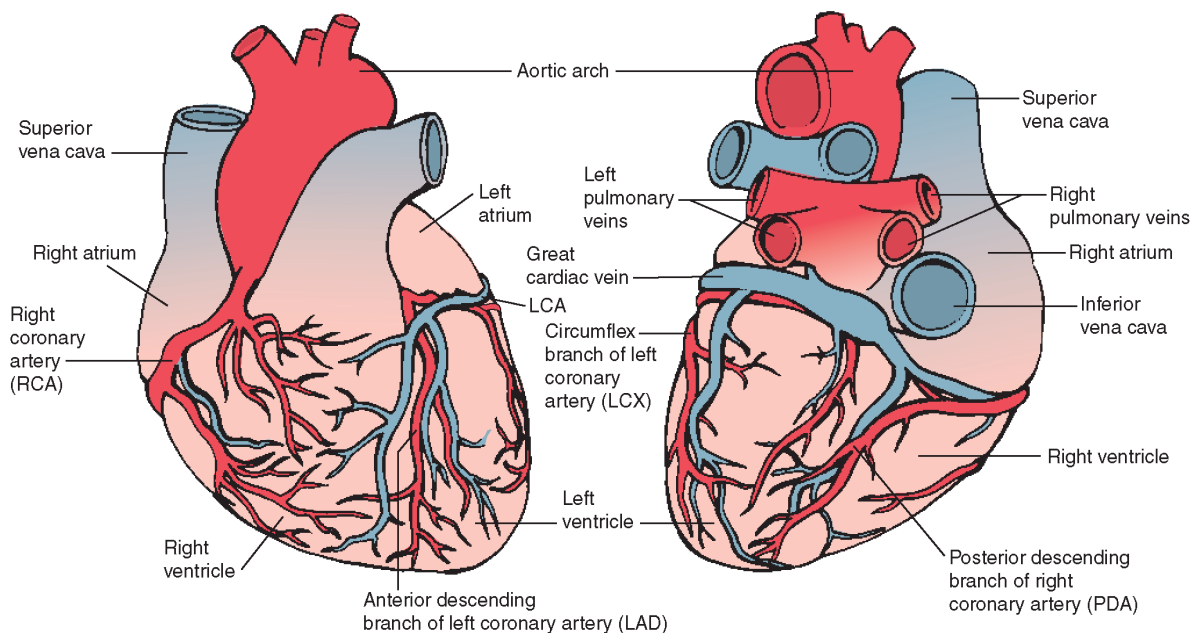


Figure 3 : Anatomie cardiaque et circulation coronarienne. (<http://what-when-how.com/nursing/the-cardiovascular-system-structure-and-function-nursing-part-2/>)

De plus, l'infarctus peut être de deux types : transmural ou non-transmural (Figure 4). Les infarctus transmuraux vont toucher toute l'épaisseur du myocarde, de l'épicarde à

l'endocarde et sont habituellement caractérisés par la présence d'ondes Q pathologiques à l'ECG. Les infarctus non-transmuraux ou sous-endocardiques ne traversent pas la paroi ventriculaire et n'entraînent que des anomalies du segment ST et de l'onde T (ST-T). Les infarctus sous-endocardiques ne concernent habituellement que le tiers interne du myocarde, où la tension pariétale est maximale et où le débit myocardique est le plus sensible aux troubles circulatoires. Ces infarctus peuvent survenir après une hypotension prolongée.

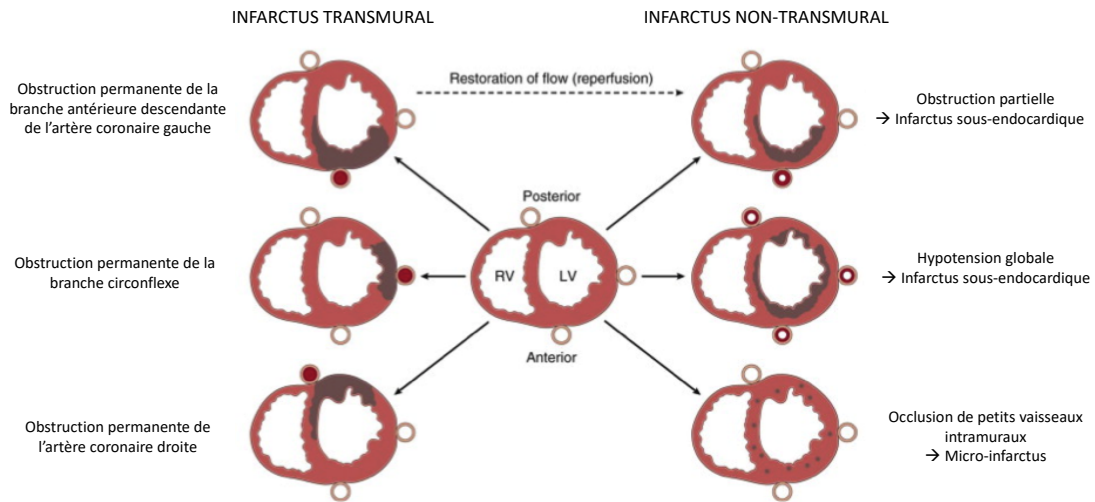


Figure 4 : Deux types d'IDM en fonction de l'occlusion coronarienne (d'après mémorang gap).

L'étendue anatomique de la nécrose ne pouvant être déterminée cliniquement avec précision, les infarctus sont habituellement classés comme STEMI ou NSTEMI selon la présence ou l'absence de sus-décalage du segment ST et d'ondes Q à l'ECG (Figure 5). Le volume myocardique détruit peut être estimé par l'importance et la durée de l'élévation des taux de créatine kinase ou par les pics des troponines les plus communément mesurées. Ces différents points seront développés ultérieurement.

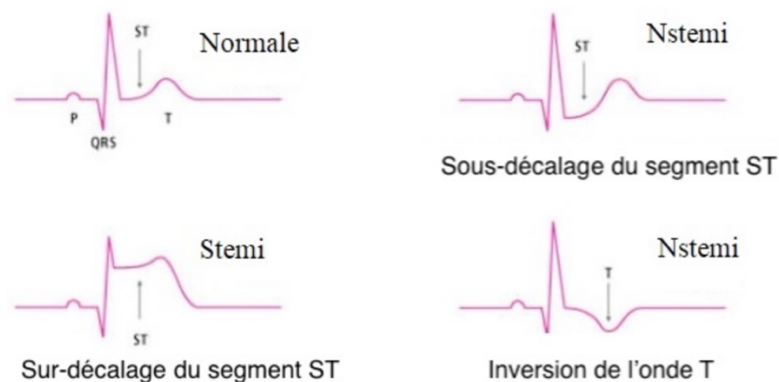


Figure 5 : Deux types d'IDM (Stemi et Nstemi) en fonction de la modification du tracé ECG (Massimo Defilippo).

b) Étiologie

Un IDM aigu survient lorsqu'il y a une réduction de la perfusion myocardique conduisant à une nécrose cellulaire. La cause principale de cette réduction va être la formation d'un thrombus dans une artère coronaire. Brièvement, ce type d'infarctus spontané par thrombose occlusive brutale d'une artère coronaire peut avoir différentes origines, la plus fréquente étant la rupture d'une plaque d'athérome (Ambrose and Singh 2015). L'athérosclérose se caractérise par la formation d'une plaque d'athérome, composée d'une accumulation de lipides, principalement de cholestérol, dans la paroi de l'artère. L'évolution de la maladie est lente et comporte plusieurs stades :

- 1) Les lipides commencent à s'accumuler dans le vaisseau formant des stries lipidiques
- 2) Les plaques apparaissent ensuite et se caractérisent par une chape fibreuse contenant de larges quantités de collagène, une faible proportion en lipides et peu de macrophages, suggérant un processus inflammatoire minimal. Nous sommes dans ce cas en présence d'une plaque dite « stable ».
- 3) A tout moment, cette plaque peut devenir « instable » et être caractérisée par une quantité importante de lipides, de fortes concentrations en macrophages traduisant un phénomène inflammatoire chronique, une faible quantité de collagène et une fine couche de tissu vasculaire recouvrant la plaque. Tous ces phénomènes vont favoriser le développement et la fragilisation de la plaque pouvant aboutir à sa rupture (Figure 6) (Boudoulas et al. 2016).

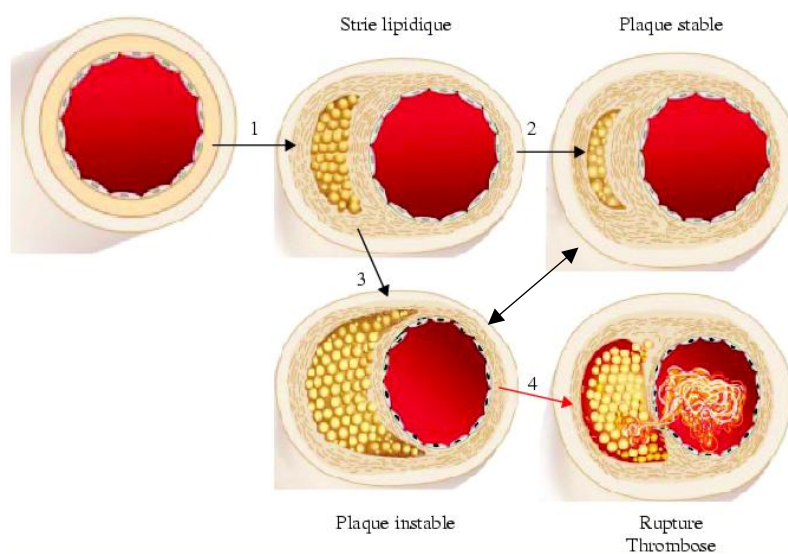


Figure 6 : Développement d'une plaque d'athérome conduisant à la formation d'un thrombus. (<http://infarctus-du-myocarde.e-monsite.com>)

Des causes plus rares d'IDM incluent des embolies de l'artère coronaire consécutives à une végétation valvulaire ou à une thrombose intracardiaque, la consommation de cocaïne, une dissection de l'artère coronaire, l'hypotension et l'anémie (Moore et al. 2019).

c) Facteurs de risque

Les facteurs de risque pour l'IDM sont classés en trois catégories : les facteurs de risque non-modifiables (âge, genre et histoire familiale), les facteurs de risque modifiables qui concernent principalement l'hygiène de vie du patient (consommation d'alcool et de tabac, sédentarité, mauvaise alimentation, hypertension, diabète, dyslipidémies et syndrome métabolique) et pour finir, les facteurs de risque émergents (protéine C-réactive, fibrinogène, calcification des artères coronaires (CAC), homocystéine, lipoprotéine (a) et petit LDL dense). Basé sur ces principaux facteurs de risques, la *Framingham Heart Study* a développé une estimation du risque coronarien pour déterminer la probabilité de développer une MCV sur 10 ans grâce à un algorithme prenant en compte les principaux facteurs de risque (Moore et al. 2019).

3. Prise en charge thérapeutique

a) Manifestations cliniques

Les patients avec un IDM aigu présentent habituellement une douleur à la poitrine due à l'activation par les nerfs thoraciques et cervicaux, d'une voie neuronale réflexe. Il va en résulter une douleur profonde et viscérale qui est décrite par les patients comme forte, pressante, serrante, écrasante, et plus rarement en coup de poignard ou en brûlure. Elle est typiquement localisée en substernal et peut irradier vers les dermatomes correspondants (C7-T4) ; c'est-à-dire, notamment, vers l'épigastre, les épaules, les bras, le dos (région inter scapulaire), la mâchoire inférieure et le cou. Ces projections vont principalement être retrouvées dans 20% des cas chez des personnes diabétiques, âgées, en post-opératoires ou chez des femmes. Ces patients peuvent simplement présenter ces symptômes dits « atypiques » non associés à une douleur à la poitrine. Une irradiation présente dans les deux bras est un fort indicateur d'IDM. Les résultats aux examens physiques (test d'effort) sont

souvent absents; toutefois, lorsqu'ils sont présents, ils ont une forte valeur pronostique (Bajaj, Jain, and Knight 2018).

b) Diagnostic

L'évaluation initiale d'un patient avec une suspicion d'IDM aigu inclue un focus sur les antécédents cliniques, un examen physique, un ECG, une évaluation des biomarqueurs cardiaques et une radiographie de la poitrine.

Electrocardiogramme (ECG)

Il est une part intégrale du diagnostic. En effet, les changements aigus ou progressifs de l'ECG vont aider le clinicien à dater l'évènement, à suggérer l'artère coronaire impliquée et à estimer la quantité de myocarde à risque. Il est particulièrement utile pour distinguer les infarctus « NSTEMI, sans sus-décalage du segment ST », des infarctus « STEMI, avec sus-décalage du segment ST ». L'ECG est toujours réalisé dans les premières minutes consécutives à l'arrivée d'un patient aux urgences. De plus, les dérives postérieures (V7 à V9) et les dérives V3R et V4R sont utilisées chez les patients soupçonnés d'infarctus du ventricule droit et postérieur, respectivement.

Les résultats de l'ECG chez les patients atteints d'un NSTEMI comprennent une dépression du segment ST, une déviation du segment ST ($> 0,05$ mV) et de nouvelles inversions profondes de l'onde T $> 0,3$ mV (d'autres modifications de l'onde T sont sensibles à l'ischémie, mais pas spécifiques à un IDM aigu) (Thygesen, Alpert, & White, 2007).

Le diagnostic d'un STEMI est, quant à lui, établi par les résultats de l'ECG révélant une élévation du point J (jonction du segment ST et du complexe QRS) supérieure à 1 mm en deux ou plusieurs dérives consécutives ; ou au niveau des dérives V4 à V6; ou supérieure à 2 mm en deux ou plusieurs dérives précordiales V1 à V3. Sans preuves du contraire, le développement d'un nouveau bloc de branche gauche (LBBB) est considéré comme un équivalent STEMI. Un nombre important de patients avec un IDM aigu va également développer des ondes Q (Figure 7). Le diagnostic d'un IDM peut être difficile en présence de LBBB ou d'un pacemaker. Dans ce cas, le critère de Sgarbossa peut être appliqué :

- Si élévation du segment ST > 1 mm concordant avec un complexe QRS à prédominance positive dans au moins une dérive : *5 points*
- Si dépression du segment ST > 1 mm dans les dérives V1, V2 ou V3 : *3 points*

- Si élévation du segment ST > 5mm dans une direction opposée à un complexe QRS à prédominance négative : 2 points

Si tous ces critères sont rencontrés, la spécificité pour un IDM est de 90% bien que la sensibilité ne soit que de 20%. Le troisième critère va peu ajouter en termes de valeur pronostique ou diagnostique mais en absence de complications (LBBB), il va mettre en évidence une hypertrophie du VG. En effet, des modifications du segment ST peuvent être observées dans d'autres syndromes comme une péricardite aigue, le syndrome de Brugada ou des cardiomyopathies (Tibaut, Mekis, and Petrovic 2017).

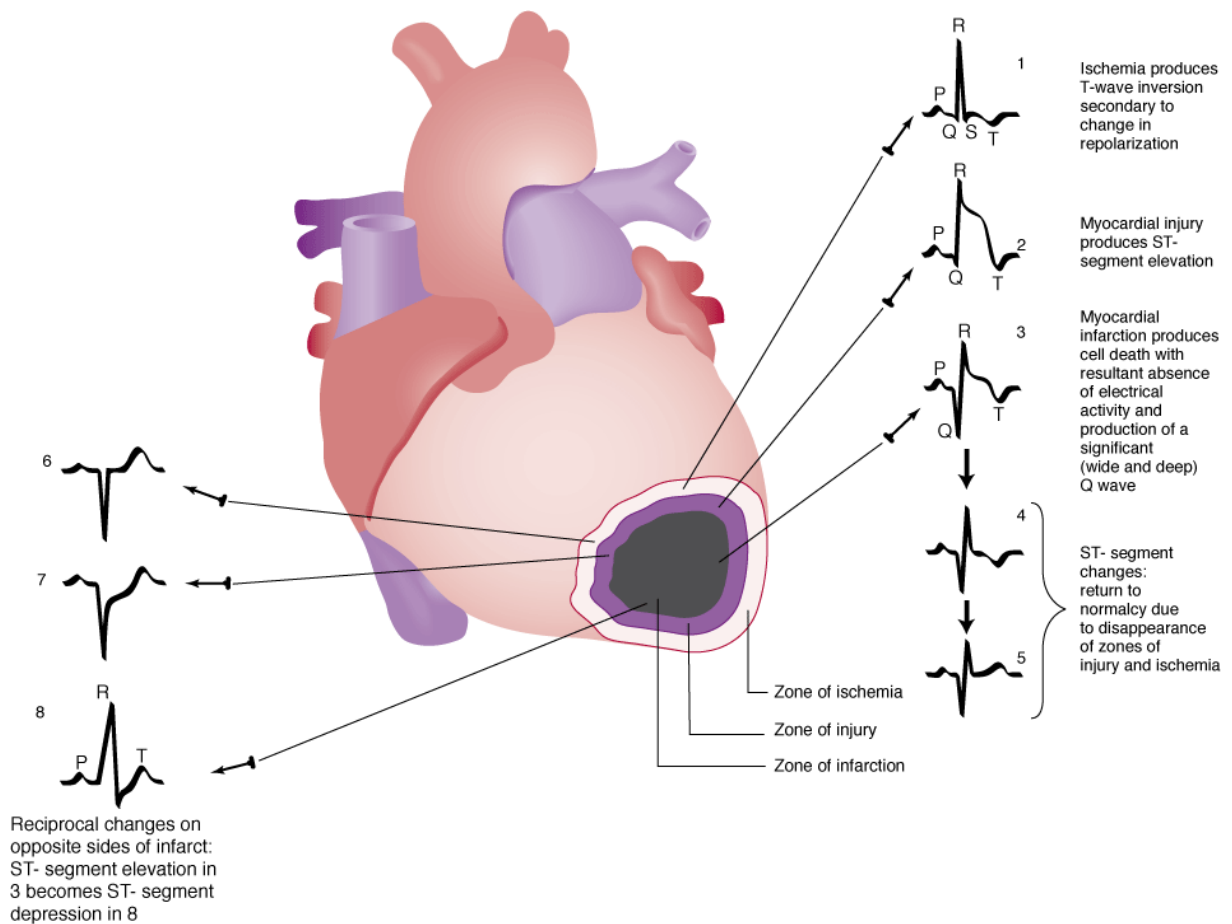


Figure 7 : Différentes modifications du tracé ECG (The McGraw-Hill Companies).

Les techniques d'imagerie non invasive

Elles jouent un rôle important dans le diagnostic et la caractérisation de l'infarctus. Les techniques d'imagerie principalement utilisées vont être l'échographie, l'imagerie radio-isotopique, la scintigraphie avec perfusion myocardique et l'IRM (Tableau I). De façon plus

exceptionnelle, on va pouvoir également utiliser la tomographie à émission de positons et la tomodensitométrie. Seules les techniques radionucléaires fournissent une évaluation directe de la viabilité du myocarde en raison des propriétés des traceurs utilisés. D'autres techniques permettent d'acquérir indirectement la viabilité myocardique comme l'échographie via la fonction myocardique ou l'IRM avec la fibrose myocardique. La tomodensitométrie permet de renseigner la présence d'une embolie ou d'une dissection aortique. Ces différentes techniques seront détaillées dans le tableau suivant, ainsi que leurs avantages et limites (Thygesen et al., 2007).

Tableau I : Différentes techniques d'imagerie non-invasive disponibles pour le diagnostic de l'IDM (d'après Thygesen et al., 2007).

Technique	Avantages	Limites
Échographie	<p>Excellente technique d'imagerie en temps réel</p> <p>Permet d'exclure de nombreuses causes non ischémiques de douleurs aiguës à la poitrine</p> <p>Paramètres accessibles :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Épaisseur myocarde - Épaississement - Contractilité au repos <p>Et si ajout d'agents de contraste :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Visualisation de l'endocarde améliorée 	<p>Résolution spatiale et temporelle modérées</p> <p>Absence de détection précise de la zone infarctée</p>
Imagerie isotopique	<p>Paramètres accessibles :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Viabilité des myocytes (traceurs : thallium-201, technetium-99m MIBI, <u>tétrofosmine</u> et FDG) - Perfusion myocardique 	<p>Faible résolution qui rend difficile la détection de petites surfaces infarctées</p> <p>Imagerie dépendante de l'examineur</p>
IRM	<p>Haute résolution spatiale</p> <p>Fonction myocardique (paramètres mesurés similaires à l'échographie)</p> <p>Avec le contraste paramagnétique :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Perfusion myocardique - Zone fibrotique 	<p>Résolution temporelle modérée</p> <p>Appareil encombrant</p>

Les marqueurs sériques

Ceux associés à une nécrose myocardique vont inclure les troponines T et I cardiaques, l'isoforme MB de la créatine (CK-MB), la créatine kinase (CK) et la myoglobine (Figure 8).

Les troponines cardiaques I et T sont des composants de l'appareil contractile des cellules myocardiques et sont principalement exprimées dans le cœur. Bien que l'élévation de ces biomarqueurs dans le sang reflète une lésion du myocarde conduisant à une nécrose, on ne connaît pas précisément les mécanismes conduisant à leur relargage. Plusieurs hypothèses ont été avancées concernant la libération de protéines structurelles provenant du myocarde telles que le turn-over naturel des cardiomyocytes (CM), l'apoptose, le relargage cellulaire des produits de dégradation de la troponine, une augmentation de la perméabilité membranaire et la nécrose de myocytes.

Dans un cas d'IDM, les troponines T et I vont commencer à augmenter 4 à 6h après l'apparition des symptômes avec un pic dans les 18 à 24 h suivantes. On va parler d'augmentation lorsque le taux dépasse le 99^{ème} percentile d'une population de référence. Ce sont les biomarqueurs principalement utilisés du fait de leur haute spécificité et sensibilité et de leur valeur pronostique (Damhoff and Huecker 2018; White 2011).

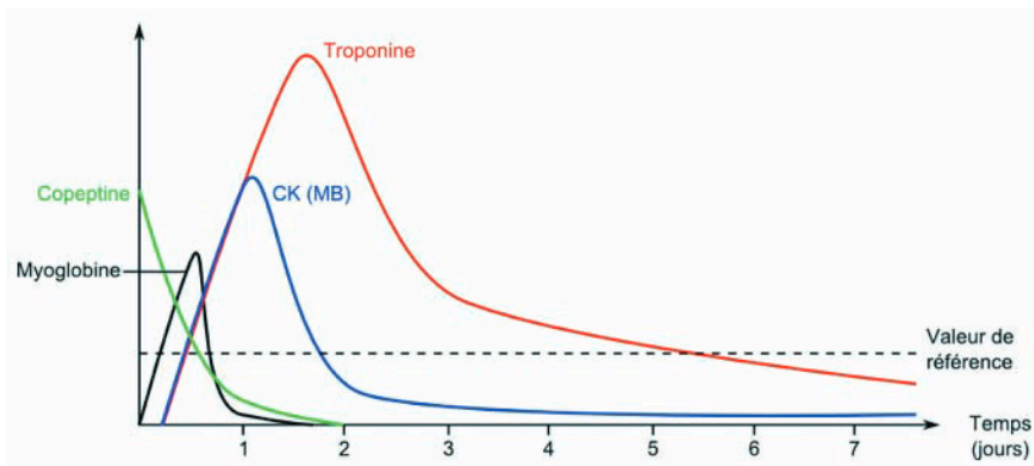


Figure 8 : Évolution dans le temps des différents biomarqueurs cardiaques (d'après <https://www.sfm.org>).

c) Traitement actuel

Les objectifs principaux du traitement initial d'un IDM consistent à soulager la douleur, l'identification immédiate des modifications du segment ST à l'ECG 12 dérivations, la mise en place de la reperfusion (si le patient y est candidat) et l'évaluation et le traitement des anomalies hémodynamiques. Le meilleur moyen de soulager la douleur est l'oxygène, la nitroglycérine et le sulfate de morphine. Les patients présentant une élévation du segment ST ou un nouveau LBBB associé à des symptômes pendant 12 h ou moins sont candidats pour la

thérapie de reperfusion. Le traitement ultérieur d'un IDM peut être séparé en deux voies selon que le patient a ou non un STEMI ou un NSTEMI (Figure 9).

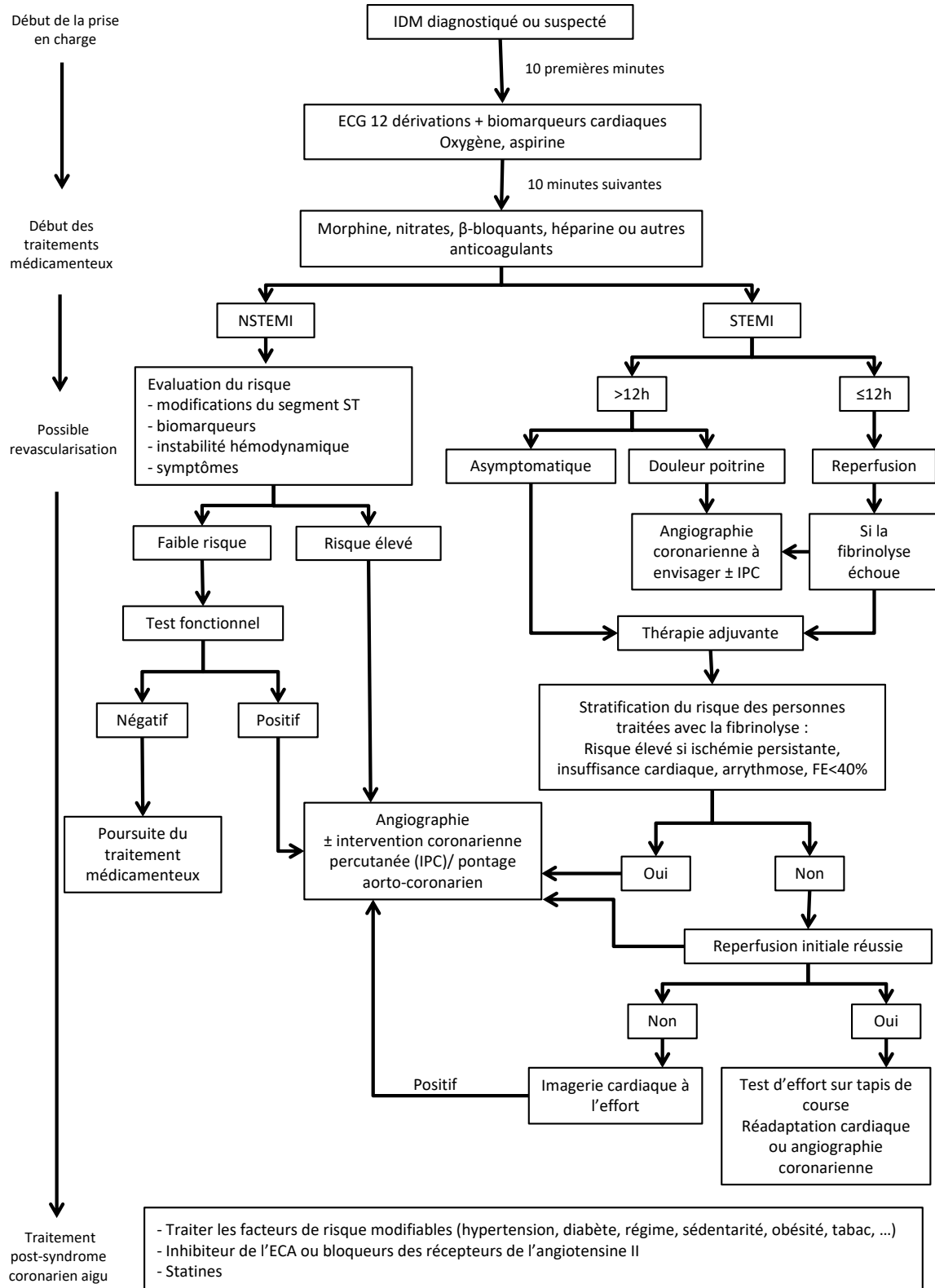


Figure 9 : Prise en charge thérapeutique suite à un IDM d'après (Moore et al., 2019).

En résumé, la prise en charge thérapeutique va se dérouler en 4 temps :

- i. *Les soins pré-hospitaliers* (l'oxygène, l'aspirine, les nitrates et/ou des opiacées pour la douleur) : Ces différentes interventions peuvent réduire les risques de mortalité et de complications. Les réponses à ces traitements vont également donner des informations importantes concernant la nécessité et le moment de la revascularisation.

- ii. *Un traitement médicamenteux* (des antiplaquettaires, anti-angineux, anticoagulants et autres médicaments en fonction de la stratégie de reperfusion envisagée) : Tous les patients vont recevoir des anti-agrégants plaquettaires, des anticoagulants et des anti-angineux en cas de douleur thoracique. D'autres médicaments, tels que les bêta-bloquants, les inhibiteurs de l'ECA (enzyme de conversion de l'angiotensine) et les statines doivent être commencés dès l'admission lorsqu'un patient se présente avec un angor instable. Les bêta-bloquants vont avoir pour objectifs de réduire la fréquence cardiaque, la pression artérielle et la contractilité afin de diminuer la charge de travail cardiaque et le besoin en oxygène. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine sont des cardioprotecteurs à long terme en améliorant la fonction endothéliale. Les statines représentent également le traitement standard et devront être poursuivies à vie.

- iii. *Un traitement de reperfusion* (fibrinolytiques ou angiographie avec intervention coronarienne percutanée ou pontage aorto-coronarien) : En cas de STEMI, la stratégie de reperfusion peut comprendre la thérapie fibrinolytique ou l'intervention coronarienne percutanée immédiate. Cette dernière doit être réalisée dans les 90 min, si elle ne peut-être que tardive, une thrombolyse est tentée. Une reperfusion par les fibrinolytiques est plus efficace si elle est administrée dans les premières minutes/heures.

En cas de NSTEMI, l'angiographie peut être effectuée dans les 24 à 48 h suivant l'admission si le patient est cliniquement stable. Si le patient est instable (symptômes en cours, hypotension ou arythmie soutenue), une angiographie est immédiatement pratiquée. Dans un cas de NSTEMI, les fibrinolytiques ne sont pas indiqués, les risques dépassant les bienfaits potentiels.

- iv. *Rééducation et prise en charge chronique de la pathologie coronarienne* : Avant le retour à domicile un test d'effort est réalisé. Il est également possible d'améliorer le pronostic du patient en prévenant les facteurs de risque (ex : tabagisme, régime alimentaire, travail, effort physique...). Lors de leur sortie, tous les patients doivent continuer à prendre des antiplaquettaires, des statines, des anti-angineux appropriés et d'autres médicaments en fonction des comorbidités présentes (Moore et al. 2019).

d) Complications précoces consécutives à un IDM

L'évolution de l'IDM est variable selon les antécédents du patient (récidive ou infarctus massif), de la présence de facteurs de risque ou de complications immédiates et du délai de prise en charge. Les complications immédiates potentielles sont nombreuses et variées :

Dysfonctionnements électriques

Des arythmies ou des défauts de conduction apparaissent chez plus de 90% des patients. Ces dysfonctionnements tels que la tachycardie, des blocs de Mobitz de type II ou des blocs AV complets, la tachycardie ventriculaire et la fibrillation ventriculaire, sont responsables de nombreux décès dans les 3 premiers jours suivant l'IDM.

Choc cardiogénique

Un choc cardiogénique survient chez environ 7% des patients atteints d'IDM et a un taux de mortalité d'environ 80 à 90% si il n'est pas pris en charge rapidement. Il va être caractérisé par une hypotension systémique, un index cardiaque réduit et une pression artérielle capillaire élevée.

Troubles structurels

Les complications structurelles qui peuvent subvenir suite à un IDM incluent des ruptures du muscle papillaire, des anévrismes ventriculaires, des ruptures du septum interventriculaire et de la paroi libre du ventricule.

4. Conséquences tissulaires et adaptations cardiaques

a) Remodelage tissulaire et adaptation fonctionnelle

L'IDM est une pathologie caractérisée par une mort cellulaire myocardique massive due à une ischémie prolongée. Après la mise en place de l'ischémie myocardique, la mort cellulaire n'est pas immédiate et va prendre une période de temps définie pour se mettre en place. Ce temps peut varier selon les espèces mais va être d'au moins 20 min. Une nécrose complète des cellules myocardiques dans la zone à risque va prendre en moyenne 2 à 4 h et va pouvoir varier selon la présence ou non de circulation collatérale au niveau de la zone à risque, de la sensibilité des myocytes à l'ischémie, de l'occlusion permanente ou temporaire de l'artère et du besoin individuel en nutriments et oxygène. L'ensemble du processus conduisant à un infarctus cicatrisé prend au minimum 5 à 6 semaines (Thygesen et al., 2007).

Le remodelage ventriculaire survenant à la suite d'un IDM est complexe et multiforme. Il est conséquent aux différentes agressions intervenant suite à l'ischémie et à la nécrose du territoire en aval de l'artère occluse. Le remodelage ventriculaire va être un processus dynamique débutant dès les toutes premières minutes consécutives à l'occlusion coronaire et va se poursuivre pendant plusieurs semaines. Il implique le réarrangement des structures cardiaques existantes, au niveau moléculaire, cellulaire et interstitiel et se traduit par un changement de taille, de forme et de fonction du cœur (Fedak et al. 2005; Gaertner et al. 2004). Ce remodelage est dans un premier temps bénéfique car il fait intervenir des voies de transduction permettant au cœur de s'adapter à la situation, puis il conduit finalement à une dégradation de la fonction cardiaque et devient alors délétère.

Parmi ces mécanismes adaptatifs mis en place, nous allons retrouver un switch métabolique. En effet, le myocarde, du fait de son activité contractile, requiert des quantités importantes d'énergie. Pour cela, il va consommer principalement l'ATP produit via le métabolisme oxydatif au niveau des mitochondries, avec comme principal substrat les acides gras dont l'oxydation représente 60% de la consommation en oxygène (contre 16 à 18% pour le lactate et le glucose) (Neubauer 2019). Au cours de l'ischémie, c'est dans un premier temps la filière de production énergétique qui va être impactée. En effet, le manque en oxygène au niveau cellulaire va s'accompagner d'un arrêt de la chaîne respiratoire mitochondriale et de la phosphorylation oxydative. Il va alors en résulter une chute du potentiel de membrane

mitochondriale qui va conduire à une inversion d'activité de l'ATPase synthase. Cette inversion va accentuer les conséquences de l'ischémie avec une consommation de l'ATP intramitochondrial puis intracellulaire (Lopaschuk 2017). Parallèlement au manque d'oxygène, l'arrêt d'apport en nutriments va conduire à un switch métabolique de la β -oxydation des acides gras vers la glycolyse anaérobie. L'oxydation du glucose consommera moins d'ATP, mais son rendement énergétique sera plus faible.

Concernant le remodelage ventriculaire consécutif à un IDM, on va distinguer trois grandes phases (Figure 10) :

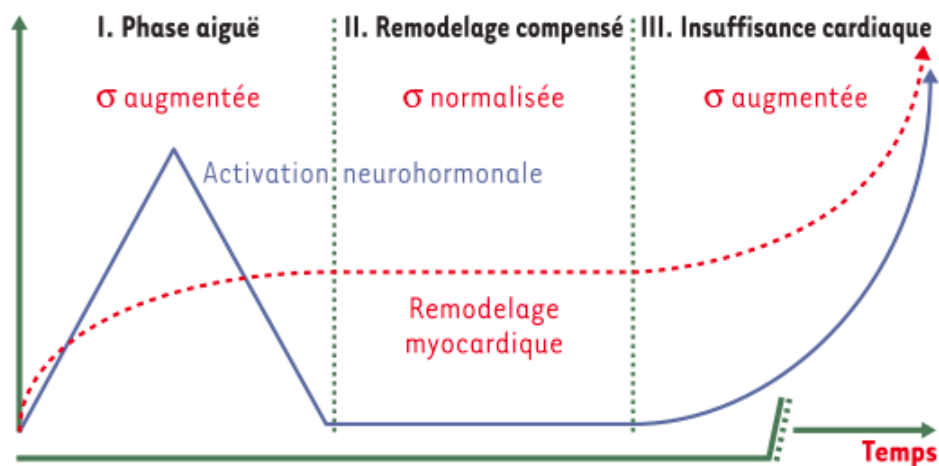


Figure 10 : Différentes phases du remodelage cardiaque après un IDM. (Gaertner et al., 2004)

Nécrose cellulaire, œdème et inflammation tissulaire vont être associés aux premiers jours consécutifs à l'occlusion. L'envahissement par les polynucléaires neutrophiles et les macrophages de la zone infarctée va permettre la phagocytose des CM nécrosés. Cette invasion va être majoritaire au niveau de la zone bordante, zone intermédiaire entre le tissu nécrosé et le tissu sain. Les cellules inflammatoires vont croître en nombre jusqu'à la fin de la première semaine avant de diminuer (Figure 11).

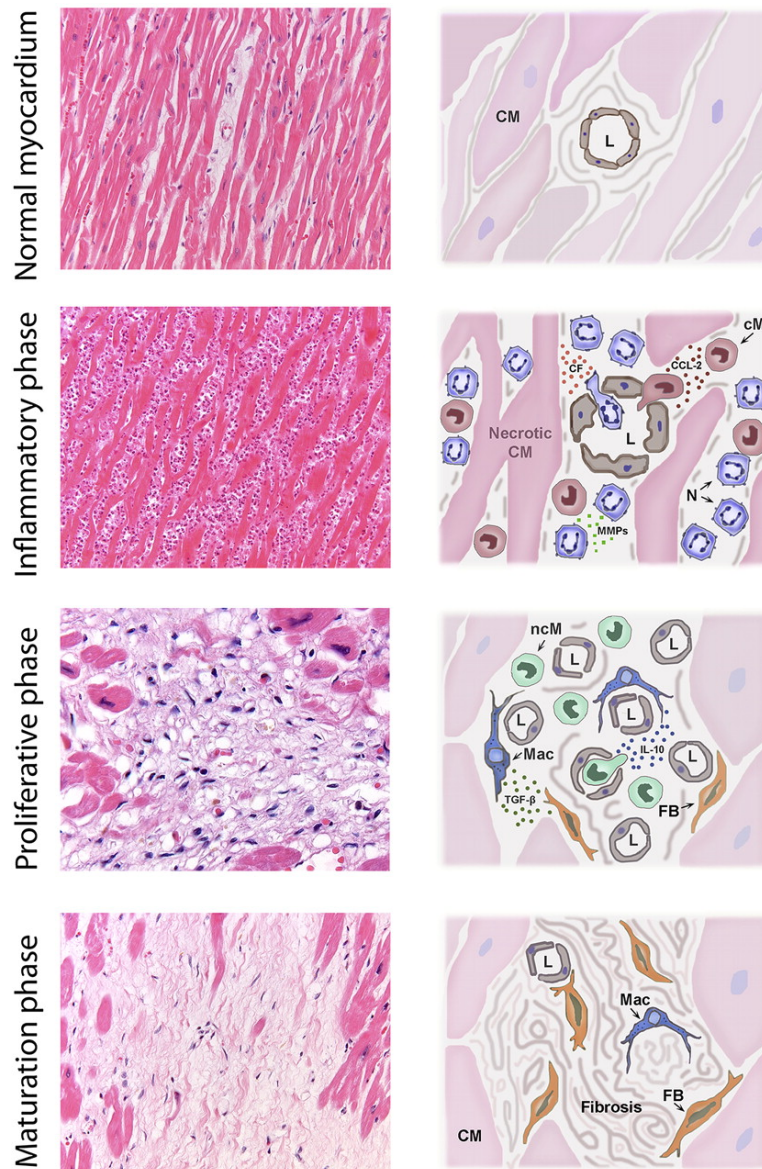


Figure 11 : Rôle des cellules immunitaires au cours de la cicatrisation suite à un IDM d'après (Van Der Laan, Nahrendorf, & Piek, 2019).

Des colorations Hémalum Eosine Safran (HES) illustrant les différentes phases apparaissant chez l'Homme à un grossissement x200 (panel de gauche) et représentations schématiques (panel de droite) .

Dans la phase inflammatoire, les neutrophiles (N) et les monocytes classiques (cM) migrent dans le myocarde infarcté, attirés par des facteurs du complément, le CCL-2 et d'autres médiateurs, pour éliminer les cellules mortes et les débris. Par la suite, des monocytes non classiques (ncM) sont recrutés dans la zone infarctée dans la phase proliférative. Dans cette phase, de nouveaux vaisseaux sanguins se forment et les fibroblastes (FB) produisent une matrice extracellulaire. Enfin, les fibroblastes et les cellules vasculaires subissent une apoptose dans la phase de maturation et une cicatrice mature se forme (pour plus de détails voir le texte). CM, cardiomyocyte; Mac, macrophage.

Cette phase 1 va être associée à une altération de la fonction ventriculaire gauche ayant pour conséquence une dilatation du ventricule. Dans le cas d'un infarctus massif transmural, la dilatation va être très précoce et intervenir dès les premières heures (Korup et al. 1997). Elle va conduire à une augmentation des contraintes pariétales systoliques et diastoliques, aboutissant à un étirement des tissus nécrosés et sains. La baisse concomitante de la pression artérielle moyenne va s'accompagner d'une activation des systèmes neuro-hormonaux, catécholamines et rénine-angiotensine-aldostérone, afin de normaliser la pression. Ces deux mécanismes vont conduire immédiatement au remodelage des zones nécrosées et saines. Si les phénomènes adaptatifs deviennent dominants, l'activation neuro-hormonale diminue et l'on passe en phase 2. Au cours de cette phase de remodelage compensé, durant laquelle les contraintes sont plus ou moins normalisées, le remodelage cardiaque persiste. Si, au contraire, la dilatation ventriculaire et la baisse de la pression artérielle se maintiennent, le passage s'effectue directement dans la phase 3 d'insuffisance cardiaque chronique.

La seconde phase va se caractériser par la réparation fibrotique de la zone nécrosée par les myofibroblastes qui vont jouer un rôle important dans celle-ci et être présents dès le troisième jour post-infarctus. Ce phénomène implique une dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) au préalable et va être régulé en grande partie par les métalloprotéinases de la matrice (MMP) (Nagase and Woessner 1999). C'est en effet la dégradation précoce de la matrice qui permet l'infiltration des cellules inflammatoires et des macrophages. Dans des modèles d'infarctus sur des souris invalidées pour le gène du plasminogène- α qui est impliqué dans l'activation des MMP, il n'est pas observé de migration des cellules inflammatoires dans la zone infarctée, ce qui conduit à la persistance d'une zone nécrotique plusieurs semaines après l'infarctus (Creemers et al. 2000).

Un mois après, on ne retrouve presque plus de cellules inflammatoires et les myofibroblastes vont constituer la totalité de la zone infarctée. Ces derniers vont être responsables d'une sécrétion importante de collagène de type I et III (Sun et al. 2000). Dès le troisième jour, une augmentation de ces cellules est observée avec un pic au 7^{ème} jour suivi d'une diminution. L'accumulation chronique de collagène dans les mois suivants constitue une menace importante sur la fonction ventriculaire (Beltrami et al. 1994).

Parallèlement, le tissu non infarcté subit un remodelage hypertrophique associant hypertrophie des CM, hyperplasie des cellules non musculaires et fibrose interstitielle. L'hypertrophie des

CM va s'associer, au niveau moléculaire, à l'expression d'isoformes de protéines normalement absentes dans un contexte non pathologique (actine-alpha-squelettique) ou avec une surexpression (chaîne lourde β de la myosine, peptides natriurétiques de type A et B...) ou encore une diminution (chaîne lourde α de la myosine, Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique...) de protéines (réexpression du programme fœtal). Au niveau histologique, l'hypertrophie va se traduire par un étirement des myofibrilles pour améliorer la contraction cardiaque. Ainsi, les sarcomères ont besoin d'un plus faible raccourcissement pour assurer un même débit cardiaque alors que les dimensions du VG sont augmentées (Figure 12).

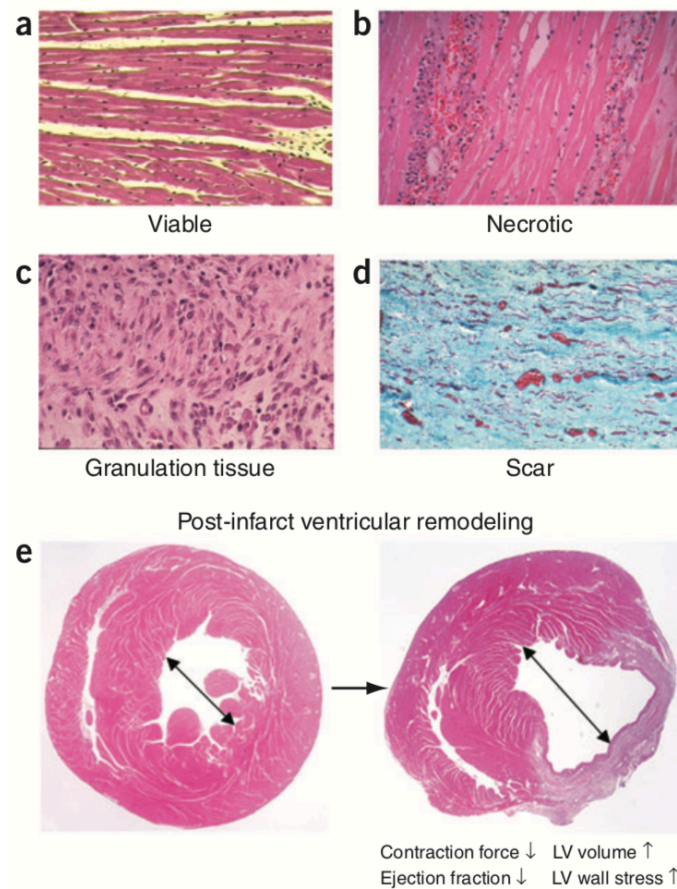


Figure 12 : Illustrations histologiques des différents stades tissulaires consécutif à un IDM chez l'Homme d'après (Laflamme & Murry, 2005).

Cette dernière phase d'insuffisance cardiaque chronique va se traduire fonctionnellement par la persistance de l'élévation des contraintes mécaniques, de l'activation des systèmes neuro-hormonaux et de l'exacerbation du remodelage, l'ensemble conduisant inéluctablement au décès du patient. De plus, l'élévation des contraintes diastoliques et systoliques exercées sur la zone infarctée va conduire à son amincissement et ainsi amener à la formation d'un anévrisme, voire à la rupture du ventricule (Weber et al. 1994).

La déformation de la chambre ventriculaire va être variable en fonction de la taille et de l'évolution de la zone infarctée. Avec la dilatation, cette déformation est responsable d'un découplage ventriculo-aortique, cause d'une augmentation de l'impédance systolique, véritable moteur de la surcharge mécanique chronique du ventricule. Ces différents éléments, mis en évidence dès les premiers jours suivant l'infarctus, vont être des facteurs prédictifs de mortalité et de morbidité au cours des mois et des années qui vont suivre (De Kam et al. 2002). Ainsi, les thérapeutiques actuelles mettent tout en œuvre pour éviter la dilatation du ventricule en agissant sur ses causes, tels que la diminution de la durée et de l'étendue de l'ischémie myocardique, avec une revascularisation aussi rapide que possible et une diminution des lésions de reperfusion. En cas d'infarctus présent, les mesures thérapeutiques vont tenter de limiter/ralentir la dilatation ventriculaire. Ces objectifs constituent autant de sujets de recherche expérimentale et clinique pour diminuer la mortalité, non plus à court terme, mais à moyen et long terme, des patients atteints d'un syndrome coronarien aigu (White et al. 1987).

b) Évolution et développement d'une insuffisance cardiaque

L'IDM fait partie des cardiomyopathies ischémiques qui représentent la principale cause d'insuffisance cardiaque (IC). Les autres étiologies possibles sont la cardiomyopathie dilatée primitive idiopathique, l'hypertension artérielle et les valvulopathies. L'IC est caractérisée comme une incapacité du myocarde à générer un débit sanguin apte à satisfaire les besoins métaboliques du cœur. Ces différentes étiologies conduisent à un remodelage myocardique impliquant l'activation de mécanismes neuro-hormonaux, favorisant le développement d'une fibrose myocardique, des perturbations de l'architecture cardiaque avec l'apparition d'une dilatation et d'une hypertrophie ventriculaire, et des modifications électrophysiologiques et métaboliques des CM.

Cette pathologie, dont l'incidence ne cesse d'augmenter, touche plus de 150 000 patients par an en France. Un fort taux de morbi-mortalité y est associé avec plus de 50 000 décès par an et représente plus de 2% des dépenses de santé publique dans les pays « développés ». En effet, le nombre de patients présentant une IC s'accroît constamment en association avec le vieillissement de la population, l'augmentation de la prévalence des facteurs de risque comme le diabète et l'amélioration du taux de survie après un IDM, menant à une augmentation du

nombre de patients présentant un risque de développer une dysfonction ventriculaire gauche tardive (Gilbert and Krum 2015).

5. Modèles animaux expérimentaux : avantages et limites

a) Le rat comme modèle de pathologies cardiaques

Les modèles animaux pour les pathologies cardiaques, et plus particulièrement ceux générés chez le Rat, ont permis de grandes avancées dans la recherche en thérapies pharmacologiques. Le rat a dominé ces recherches, car en plus de partager de nombreux avantages avec la souris (faible coût, manipulation simple,...), sa taille plus importante facilite les procédures chirurgicales et post-chirurgicales. Les dommages myocardiques chez le rat sont induits par trois procédures différentes : chirurgicale, pharmacologique et électrique.

Les procédures chirurgicales

La méthode chirurgicale initialement développée par Pfeffer et collaborateurs consiste en une ligature de l'artère coronaire gauche (Pfeffer et al., 1979). Brièvement, suite à une thoracotomie gauche sur animal anesthésié, l'artère coronaire gauche est soit ligaturée soit cautérisée entre l'artère pulmonaire et l'oreillette gauche. Depuis, plusieurs améliorations ont été apportées, permettant de standardiser la méthode et diminuer la mortalité. Une des modifications les plus importantes a été la mise en place d'une occlusion temporaire suivie d'une reperfusion. Ainsi la technique de ligature coronaire peut être utilisée soit pour étudier des ischémies permanentes ou des ischémies reperfusion.

Les inductions pharmacologiques

L'induction pharmacologique de lésions myocardiques a été implémentée en 1963 par Bagdon et ses collaborateurs via un traitement au récepteur adrénergique β_1 , un agoniste de l'isoprénaline (Lobo Filho et al. 2011). L'injection d'isoprénaline avant ischémie a un effet cardioprotecteur, mais à une dose précise, il induit la nécrose des CM accompagnée d'un phénomène d'hypertrophie et de dilation du ventricule gauche.

Les inductions électriques

Cette méthode consiste à générer des brûlures de chevauchement en appliquant un fer à souder de 2 mm sur l'épicarde du ventricule gauche (N. Adler, L. L. Camin 1976). Cependant,

bien qu'encore valide, cette technique est très peu reproductible entre les laboratoires et de peu utilisée de ce fait.

b) Autres modèles animaux utilisés

Malgré les avantages à travailler avec la souris, celle-ci présente deux limites majeures : à savoir, la petite taille du cœur et des différences structurelles importantes avec l'Homme. Les différentes techniques utilisées sur ce modèle, adaptées du rat, sont présentées dans le Tableau II.

Cependant, du fait de la disponibilité des modèles transgéniques et knock-out murins, la souris a été un modèle attrayant pour la compréhension moléculaire de la physiopathologie du cœur infarcté. Récemment, un nouveau modèle murin d'IDM a été créé, à la suite d'une série de cryolésions et donne des résultats prometteurs (Hee Ryu et al. 2005).

Des modèles gros animaux, contrairement aux rongeurs, vont présenter des aperçus significatifs de la physiopathologie cardiaque humaine. En effet, ils vont posséder une architecture, une fréquence cardiaque, une consommation en oxygène, une contractilité, une expression protéique et même des populations de cellules souches proches de l'Homme. Les différents modèles sont présentés dans le Tableau II. Brièvement, le modèle gros animal le plus utilisé est le cochon du fait de sa similarité avec l'Homme au niveau de la circulation coronarienne collatérale et de l'anatomie artérielle. Dans ce modèle, une occlusion par ballonnet est majoritairement utilisée au niveau de l'artère coronaire descendante antérieure gauche. Cependant, ce modèle nécessite un équipement spécialisé, des installations chirurgicales et un personnel qualifié, limitant le nombre de laboratoires en mesure de mener des études.

Le lapin va souvent offrir un bon compromis. Enfin, en supplément des modèles chirurgicaux, il existe un modèle spontané d'IDM : la souche WHHLMI (Shiomi et al. 2003).

Tableau II : Différents modèles animaux d'IDM. D'après (Falcao-Pires & Leite-Moreira, 2015)

Espèces	Modèles d'infarctus du myocarde et d'insuffisance cardiaque	Avantages	Inconvénients
Souris	Lésions myocardiques <i>Chimique</i> : administration d'isoproterenol. <i>Electrique</i> : brûlures de chevauchement. <i>Chirurgical</i> : ligature de l'artère coronaire	- Faible coût - Manipulation facile - Faible temps de gestation - Nombreux modèles transgéniques et knock-out	- Petite taille du cœur - Différences structurelles avec l'Homme
	Ischémie-reperfusion : Occlusion temporaire de l'artère coronaire gauche.		
Rat	Cryo-infarctus : cryo de l'endocarde. Surpression : rétrécissement et cerclage aortique. Sténose aortique. Modèles transgéniques de cardiomyopathie dilatée : mutation de la protéine cardiaque α -actine.	- Principal modèle utilisé - Faible coût - Manipulation facile - Taille du cœur	- Différences structurelle avec l'Homme
	Spontané : WHHLMI lapins. Occlusion de l'artère coronaire : similaire au modèle rongeur, également applicable à l'artère carotide. C'est un excellent modèle pour tester les thérapies endovasculaires. Surpression : cerclage aortique, sténose valvulaire.	- Taille du cœur - Coûts - Expressions protéiques - Modèle spontané	- Différence structurelles avec l'Homme - Différentes étiologies
Chien	Micro-embolisation. Tachycardie : stimulation ventriculaire. Sténose aortique.	- Physiopathologie plus proche de l'Homme : architecture, fréquence cardiaque, consommation en oxygène, contractilité, expression protéique et cellules souches	- Equipements spécialisés, personnels qualifiés
Porc	Modèle chirurgical : occlusion des artères coronaires par ballonnet. Tachycardie : stimulation induite tachycardie supraventriculaire.	- Cochon : modèle gros animal le plus utilisé de par son anatomie artérielle et sa circulation coronarienne collatérale proche de l'Homme	- Coûts

Pour conclure sur ce paragraphe, les modèles animaux des pathologies myocardiques ont permis une avancée majeure en compréhension des atteintes cardiaques humaines et en thérapeutique. Cependant, le modèle animal doit être choisi avec précaution car aucun ne permet de recréer parfaitement l'atteinte humaine et n'implique pas les mêmes besoins matériels et financiers. Un modèle doit donc être choisi en fonction de l'aspect de la pathologie auquel on veut s'intéresser.

6. Etat de la recherche actuelle sur l'infarctus du myocarde et l'insuffisance cardiaque

La recherche actuelle a 3 principaux objectifs qui sont i) de réduire la mortalité consécutive à un IDM, ii) de ralentir l'apparition de l'IC et améliorer la qualité de vie des patients et iii) de diminuer les symptômes de l'IC. En effet, bien qu'un ensemble de possibilités existent pour soulager et ralentir la progression de la pathologie, dans les formes les plus sévères d'IC, la seule solution thérapeutique reste, à ce jour, la transplantation cardiaque. Cependant, de nombreuses limites existent (faible disponibilité des greffons, traitement immunosuppresseur...) rendant nécessaire le développement de nouvelles thérapeutiques

telles que la création d'un cœur artificiel, la thérapie génique ou encore la thérapie cellulaire. Ces différents points seront plus amplement détaillés dans les paragraphes suivants.

L'implantation d'un cœur artificiel

L'implantation de cette prothèse intracorporelle va permettre de reproduire les fonctions cardiaques et ainsi assurer une circulation sanguine. Dans un premier temps, l'objectif fut de transplanter provisoirement les patients en attente d'une greffe. Dès les années 80, les toutes premières greffes ont été réalisées avec la bioprothèse Jarvik-7 (Devries et al. 1984). Actuellement, SynCardia est le cœur artificiel le plus implanté et permet d'augmenter considérablement la survie des patients (Moore et al. 2016). Une des principales limites reste la survenue d'évènements thrombo-emboliques. Pour cette raison, la société CARMAT, a développé un nouveau cœur artificiel utilisant du péricarde comme revêtement interne des ventricules. Un essai clinique est actuellement en cours et des communications préliminaires mettent en avant des résultats prometteurs (Carpentier et al. 2015).

La thérapie génique

Les stratégies proposées visent à réintroduire une version fonctionnelle du gène déficient à l'origine de la pathologie. Plusieurs essais cliniques ont été réalisés : CUPID (phase II) avec l'injection intracoronaire du gène SERCA2a (Jaski et al. 2009), avec dans sa continuité CUPID-2 (phase IIb) qui n'a pas confirmé les résultats encourageants obtenus précédemment (Greenberg et al. 2014), tout comme l'essai AGENT-HF réalisé en parallèle (Hulot et al. 2017). L'essai de phase II, STOP-HF, qui a consisté en l'injection directe d'un plasmide porteur du gène SDF-1 (Stromal cell-derived factor 1) dans le myocarde, a montré l'innocuité de la démarche et une augmentation de la fraction d'éjection associée à une diminution des ré-admissions pour complications dans les 30 jours (Chung et al. 2015). Des résultats similaires ont été obtenus lors de l'injection du gène AC6 (adénylyl cyclase) par voie intracoronaire (Penny and Hammond 2017). Cependant de nombreuses limites restent encore à surmonter comme l'apparition d'arythmies et de réaction immunitaire. Il est également important de déterminer le dosage optimal ainsi que le transgène permettant d'induire des effets à long terme.

La thérapie cellulaire

Cependant, aucune solution ne permet le remplacement des cellules détruites et la restauration d'une architecture cardiaque fonctionnelle. C'est dans ce contexte que

l'utilisation des cellules souches a émergé comme outil thérapeutique prometteur. Ainsi de nombreuses études ont été menées à la fois en préclinique et clinique, mettant en évidence le potentiel d'une thérapie cellulaire cardiaque que ce soit avec des progéniteurs cardiaques ou des cellules souches exogènes. Les données produites vont vous être présentées dans le chapitre 2.

Chapitre 2 : Médecine régénérative et cœur

1. Concept

Les MCV, incluant les défauts cardiaques congénitaux et les pathologies acquises, sont caractérisées initialement par des altérations moléculaires et cellulaires du myocarde, des valves ou des artères coronaires qui conduisent à une destruction massive des CM associée à une altération de la fonction cardiaque. Il en résulte une IC chronique. Malgré de nombreuses avancées thérapeutiques, la prise en charge actuelle reste incomplète et ne permet pas de compenser la perte en CM. Ainsi, le remplacement des cellules détruites et la restauration d'une architecture cardiaque fonctionnelle constituent la cible principale en recherche médicale régénérative et font état d'urgence en matière de santé publique. En effet, la transplantation cardiaque est le seul traitement définitif pour l'IC terminale consécutive à un IDM. Cependant, la procédure implique des risques importants et les donneurs sont limités (Ma et al. 2017). C'est dans ce contexte, que l'utilisation des cellules souches a émergé comme un outil thérapeutique prometteur pour les patients avec des options thérapeutiques limitées voire absentes (Dixit and Katare 2015).

Contrairement à d'autres espèces comme le poisson zèbre dont le cœur se régénère totalement après blessure (Porrello and Olson 2014; Poss, Wilson, and Keating 2002), le cœur de mammifère adulte a perdu cette capacité. Des études récentes ont néanmoins mis en évidence que le cœur de mammifère nouveau-né (souris) possède un potentiel de régénération endogène (Porrello et al. 2011). Par ailleurs, un cas de récupération complète de la fonction et de la structure chez l'Homme suite à un IDM sévère chez un nouveau-né a été décrit (Haubner et al. 2016). Ce cas suggère donc des compétences régénératives fœtales et néonatales du cœur humain. Ces dernières années, l'apport considérable de connaissances sur le développement cardiaque avec la découverte des cellules progénitrices cardiaques embryonnaires précoces, l'identification des programmes transcriptionnels précis permettant la spécification des différentes lignées cardiaques mais également la description des différents mécanismes moléculaires contrôlant la prolifération des CM fœtaux, a permis le développement de nombreuses stratégies thérapeutiques régénératives prometteuses.

La thérapie cellulaire a pour objectif la greffe de cellules visant à remplacer, réparer ou restaurer la fonction d'un tissu ou d'un organe lésé consécutivement à un accident, au

vieillesse ou à une pathologie. Elle constitue, pour un grand nombre de pathologies, une des stratégies thérapeutiques investiguées avec un développement majeur ces dernières années. Ces approches de thérapie cellulaire présentent deux intérêts majeurs. D'une part, elles agissent directement sur la régénération tissulaire par remplacement des cellules lésées ou mortes et/ou par intégration dans la niche dans un état indifférencié mais activable aux signaux de l'environnement afin de générer à nouveau des cellules filles. D'autre part, les cellules souches peuvent avoir un effet indirect sur l'environnement tissulaire par l'intermédiaire de leur activité paracrine et des interactions cellules-cellules qu'elles génèrent (Fischbach, Bluestone, and Lim 2013).

Pour améliorer la fonction cardiaque, une thérapie cellulaire idéale devrait générer un nouveau réseau vasculaire et un nouveau tissu contractile apte à s'aligner et à se synchroniser avec le tissu cardiaque existant. De plus, les cellules devraient être capables de se différencier dans la lignée cardiaque (myocytes et cellules endothéliales vasculaires...) ou agir via des mécanismes paracrines afin de promouvoir des mécanismes régénératifs endogènes (Dixit and Kataré 2015). La cellule idéale devra par ailleurs être facilement extraite, isolée, amplifiée et être délivrée de façon sûre et efficace chez l'Homme. La recherche du type cellulaire optimal a conduit à l'étude d'une variété de populations et de sources de cellules, ainsi que de méthodes d'injection, chacune ayant des avantages et des inconvénients. Ces différents points seront détaillés ultérieurement.

2. Étude des différents candidats cellulaires

Les cellules souches (CS) se distinguent des cellules différenciées par deux propriétés :

- i) Leur capacité d'auto-renouvellement, à savoir la capacité à se diviser pendant de très longues périodes afin d'assurer le maintien d'un stock constant de CS. Deux modalités de division ont été identifiées : la division symétrique qui permet de générer deux cellules filles identiques et la division asymétrique formant une cellule identique à la cellule mère alors que la seconde possède des facteurs initiant son engagement dans un programme de différenciation (Kolios and Moodley 2012).
- ii) Leur plasticité, autrement dit leur capacité à générer un ou plusieurs types cellulaires différenciés en fonction des signaux environnants.

Ces deux propriétés leur permettent d'assurer le maintien de l'intégrité tissulaire tout au long de la vie par le remplacement des cellules altérées au cours du renouvellement naturel du tissu, d'un accident, du vieillissement ou d'une pathologie.

A l'heure actuelle, on considère deux types de candidats cellulaires en thérapie clinique. On retrouve les candidats dits de première génération, c'est-à-dire les cellules relativement faciles à préparer pour des applications cliniques, mais qui présentent un potentiel de régénération limité, comme les myoblastes, les cellules mononuclées dérivées de la moelle osseuse ou les cellules souches mésenchymateuses (CSM). Avec leur utilisation (à l'exception des myoblastes), on vise surtout la stimulation de mécanismes de régénération endogènes (Eschenhagen et al. 2017). Les candidats dits de deuxième génération requièrent des procédures d'isolement et d'amplification *ex vivo* plus complexes, mais possèdent un potentiel de régénération plus élevé. Ils incluent les cellules progénitrices d'origine cardiaque avec les cardiosphères et les cellules souches pluripotentes cardiaques. Ils sont considérés davantage comme une approche exogène de régénération pour remplacer les cellules myocardiques perdues (Figure 13).

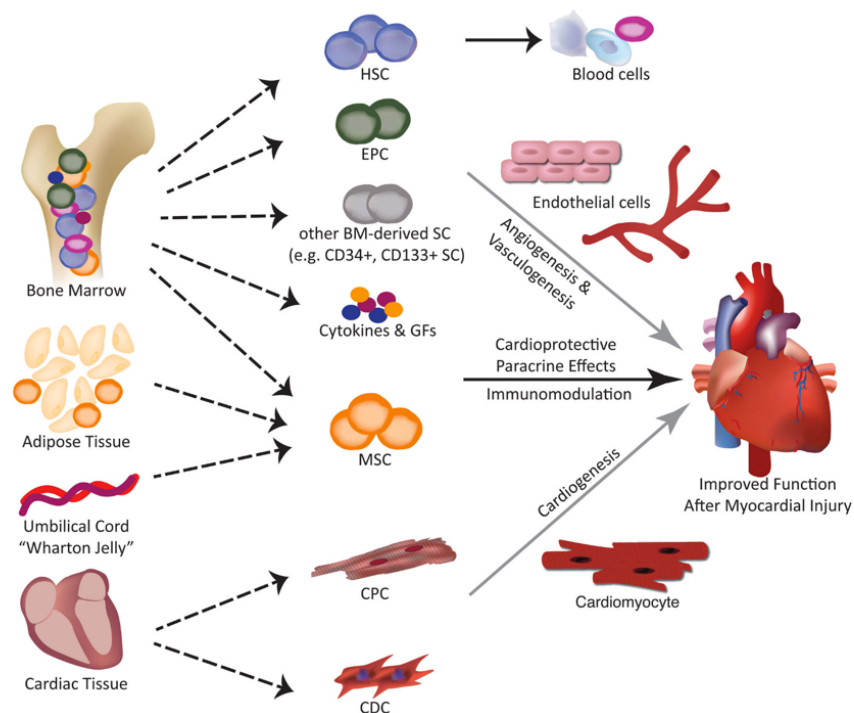


Figure 13 : Principaux candidats investigués en thérapie cellulaire cardiaque (Nguyen, Rhee, and Wu 2016). HSC: Hematopoietic Stem Cell ; EPC: Endothélial Progénitor Cell ; BM: Bone Marrow ; SC: Stem Cell ; MSC: Mesenchymal Stem Cell ; CPC: Cardiac Stem Cell ; CDC: Cardiosphere-derived Cell ; GF: Growth Factors.

a) Agents de 1^{ère} génération

Les cellules souches adultes (CSA) sont présentes au sein de nombreux tissus et organes adultes appartenant aux trois feuilletts germinaux, dont le sang, la moelle osseuse, la peau ou encore les muscles. A l'état de quiescence, ces cellules sont généralement localisées dans un microenvironnement appelé « niche », dont les changements, que ce soit par des interactions cellulaires ou la réception de signaux divers, vont influencer leur comportement (Mimeault et al. 2007). Ces cellules sont multipotentes ou unipotentes. Leur diversité offre des perspectives thérapeutiques dans de nombreux domaines et leur potentiel pour les pathologies cardiaques va être développé dans les paragraphes suivants.

i. *Myoblastes squelettiques*

Ils dérivent des cellules satellites, une population de progéniteurs myogéniques localisés entre la membrane basale et le sarcolemme des myofibres. Lors d'une lésion musculaire, ces cellules vont s'activer, proliférer pour donner lieu à des myoblastes et promouvoir la régénération en se différenciant en myotubes qui fusionnent entre eux ou avec les cellules existantes pour former de nouvelles fibres multinucléées (Buckingham et al. 2008; Mauro 1961). En raison de la relative facilité à se procurer des biopsies musculaires, de la rapidité d'expansion *in vitro* de ces cellules et de leur résistance aux conditions hypoxiques et ischémiques (Juan C Chachques et al. 2004), les myoblastes squelettiques ont été les premières cellules testées dans des études précliniques (Taylor et al. 1998) et cliniques d'IC (Menasché et al. 2001).

Cependant, il a rapidement été mis en évidence que les myoblastes transplantés dans des cœurs infarcis se différenciaient et formaient des fibres musculaires squelettiques (striées) et non du muscle cardiaque (Murry et al. 1996).

Leur capacité à favoriser la réparation cardiaque a été évaluée à la fois dans des modèles animaux, d'IDM et d'IC, de petite et de grand taille (Bellin et al. 2019; Juan C. Chachques et al. 2004; Farahmand et al. 2008; Fukushima et al. 2008; Gavira et al. 2010; Juan José Gavira et al. 2006; Ghostine et al. 2002; He et al. 2005; Madigan and Atoui 2018). Après l'administration intramyocardique et intra-coronaire, il a été démontré que ces cellules se différenciaient en myotubes et formaient des greffes musculaires viables dans le myocarde cicatriciel, qui sont associées à l'atténuation du remodelage ventriculaire, à la diminution de la fibrose interstitielle et à l'amélioration de la performance cardiaque (Bonaros et al. 2006; Farahmand et al. 2008; Kraus et al. 1999). Cette réduction de la fibrose a été montrée comme induite via

une correction du déséquilibre entre les MMP et leurs inhibiteurs tissulaires (TIMP) (Shintani et al. 2009). De plus, leur capacité à améliorer la fonction cardiaque a également été démontrée dans la cardiomyopathie non ischémique induite par la doxorubicine ou par la mutation du gène δ -sarcoglycan chez les rats (Suzuki, Murtuza, Suzuki, Smolenski, & Yacoub, 2001) et les hamsters syriens CHF147, respectivement. Dans les deux études, l'injection intramyocardique de myoblastes améliore la fonction ventriculaire gauche et diminue la fibrose interstitielle. Dans cette dernière étude, les bénéfices ont été attribués au remodelage de la MEC et à l'activation des cellules souches cardiaques secondaires à la sécrétion de facteurs de croissance (Pouly et al. 2004).

Les résultats encourageants de ces études précliniques ont rapidement conduit à la mise en place d'essais cliniques pour l'IC chez l'Homme. La première transplantation humaine de myoblastes a été effectuée par le Pr. Menasché et son équipe (Menasché et al. 2003). Dans cette étude de phase I, une injection de 871 millions de cellules a été réalisée dans une région précise du VG lors du pontage aortocoronarien (CABG). Cette injection a été associée à une amélioration significative de la fonction ventriculaire avec toutefois difficultés dans l'interprétation en raison des effets dus à la revascularisation chirurgicale concomitante et à l'absence d'un groupe témoin approprié. De plus, sur 10 patients, 4 ont déclenché de la tachycardie ventriculaire, nécessitant l'implantation d'un défibrillateur (DCI). Cette instabilité électrique a été attribuée à l'absence de couplage électromécanique, en raison de l'incapacité des myotubes différenciés à exprimer les protéines de jonction clés comme la N-cadhérine et la connexine-43 (Reinecke et al. 2000). Après cet essai, plusieurs études non randomisées ont mis en évidence une augmentation de la fonction ventriculaire gauche (Biagini et al. 2006; Dib et al. 2005, 2009; Juan J. Gavira et al. 2006; Hagège et al. 2006; Herrerosa et al. 2003; Ince et al. 2004; Menasché et al. 2003; Siminiak et al. 2004, 2005; Smits et al. 2003), une amélioration du remodelage du VG (Herrerosa et al. 2003; Siminiak et al. 2004; Zhang et al. 2003) et de la survie *in situ* des myoblastes dans le myocarde (Pagani et al. 2003) après injection intramyocardique chez des patients atteints de cardiomyopathie ischémique. Sur la base de ces résultats prometteurs, Menasché et al. ont mené l'étude MAGIC, un essai randomisé de phase II, réalisé en double aveugle, qui a étudié l'impact de l'injection intramyocardique de myoblastes squelettiques (à deux doses : 400 ou 800 millions) avec CABG vs. CABG seul (témoins) chez 97 patients atteints de dysfonctionnement sévère du VG (fraction d'éjection du VG [FEVG] entre 15 et 35%). Aucune différence significative en terme d'amélioration de la

fonction cardiaque et d'apparition d'arythmies malignes entre les patients recevant des myoblastes et les témoins n'a été observée au bout de 6 mois ; cependant, dans une sous-étude, il a été constaté que les patients traités avec 800 millions de cellules présentaient une atténuation du remodelage ventriculaire gauche et une diminution de l'hypertrophie ventriculaire (Menasché et al. 2008). D'autres chercheurs ont réalisé l'injection intramyocardique par cathéter de myoblastes squelettiques dans l'IC consécutive à l'ischémie (Biagini et al. 2006; Dib et al. 2009; Ince et al. 2004; Siminiak et al. 2005; Smits et al. 2003) : Ces différentes études de phase I, réalisées sur de faibles cohortes de patients, ont mis en évidence une amélioration de la FEVG après 6 mois (essai POZNAN) ou 1 an (essai Causmic). Afin de confirmer ces résultats, une étude multicentrique basée sur l'administration intramyocardique transcathéter de myoblastes chez des patients atteints d'IC (essai MARVEL) a été mise en place. Conçue pour inclure 330 patients, cet essai a pris fin prématurément en raison de contraintes financières ; les résultats préliminaires chez 23 patients ont montré une amélioration de la distance de marche de 6 minutes à 3 et 6 mois, mais aussi une augmentation de l'apparition de tachycardie ventriculaire soutenue chez 7 des 15 patients (Povsic et al. 2011).

Les effets à long terme de l'injection intramyocardique chez les patients atteints de cardiomyopathie ischémique ont été évalués dans quatre essais (Dib et al. 2005; Juan J. Gavira et al. 2006; Hagège et al. 2006; Veltman et al. 2008). Bien que dans trois de ces essais, une amélioration de la fonction cardiaque ait été observée, les myoblastes ont été transplantés pendant la revascularisation chirurgicale, ce qui, comme précédemment indiqué, complique l'interprétation des résultats. Dans la quatrième étude, où les myoblastes ont été administrés par voie percutanée par injection transendocardique, aucun effet bénéfique sur la fonction VG globale ou régionale n'a été observé sur les 4 ans de suivi réalisés. Ces résultats concordent avec ceux de l'essai SISMIC, un essai ouvert de transplantation percutanée intramyocardique de myoblastes chez des patients insuffisants cardiaques. Dans cette étude, un suivi de 6 mois ne montre pas d'amélioration de la FEVG, bien qu'il y ait eu une amélioration de la distance de marche de 6 minutes (Duckers et al. 2011).

En résumé, la plupart des essais cliniques non randomisés de petite envergure sur les myoblastes squelettiques ont donné des résultats encourageants qui n'ont pas été validés par la principale étude réalisée à ce jour (essai MAGIC) n'a pas corroboré ces résultats. Il convient

également de noter que bon nombre de ces essais ont été effectués conjointement avec des procédures de reperfusion, ce qui rend difficile la distinction entre les effets liés aux myoblastes et ceux liés à la revascularisation. En raison des résultats négatifs de l'essai MAGIC, du risque d'arythmie et de la disponibilité d'autres types de cellules, l'intérêt pour les myoblastes squelettiques a diminué, et il semble peu probable que ces cellules joueront un rôle dans la thérapie cellulaire de l'IC.

ii. Cellules souches de la moelle osseuse

Les cellules souches mononucléées de la moelle osseuse (BMMNC) constituent une population hétérogène composée des cellules à la fois hématopoïétiques et non hématopoïétiques incluant des monocytes, des lymphocytes, des CSM, des cellules souches hématopoïétiques (CSH) et des cellules progénitrices endothéliales (CPE) (Micheu and Dorobantu 2017). Leur capacité à se différencier dans de multiples lignées, leur concentration élevée dans la moelle osseuse et la facilité à se les procurer, ont suscité un grand intérêt pour cette population.

Les BMMNC en greffe autologue, ont été l'une des premières populations cellulaires à être testées en milieu clinique et sont encore, à ce jour, les plus fréquemment utilisées dans les essais cliniques pour le traitement des MCV (Micheu and Dorobantu 2017; Nigro et al. 2018). C'est en 2001, que la première démonstration du potentiel thérapeutique de ces cellules, dans un contexte d'IDM, a été décrite (Orlic et al. 2001). Une perfusion myocardique accrue, une augmentation de la FEVG régionale ou globale et une réduction des volumes systoliques finaux du VG ont également été rapportés (Nigro et al. 2018). Après ces études préliminaires, des essais cliniques ont vu le jour, mais le nombre de patients inclus est demeuré faible (Ge et al. 2006; Schächinger et al. 2006).

En 2012, le Cochrane Heart Group a analysé les données de 33 essais cliniques portant sur le traitement BMMNC en post-IDM. Les résultats ont montré une amélioration durable de la FEVG pendant les périodes de suivi allant de 12 à 61 mois, bien que cela ne se traduise pas par une diminution de la morbi-mortalité (Assmus et al. 2010).

Afin de compléter ces données, une revue systématique de 2017 décrit l'évolution de la thérapie « BMMNC » au cours des 15 dernières années (Micheu and Dorobantu 2017). Cette revue fait état d'un certain nombre d'études donnant des résultats prometteurs (essai BONAMI NCT00200707, essai REGENERATIVE-AMI NCT00765453...) dont l'essai BOOST qui a

montré une amélioration transitoire de 6,7% de la fonction VG (+0,7% dans le groupe témoin) après traitement. Malheureusement après 18 mois, plus aucune différence n'était présente entre les deux groupes, une constatation qui est aussi faite à 5 ans (Wollert et al. 2004).

L'essai REPAIR-AMI a, quant à lui, été le premier essai visant à évaluer l'impact du moment d'injection des cellules. Il a été conclu que la transplantation intracoronaire réalisée 5 jours ou plus après angioplastie était associée à des effets bénéfiques plus importants que les interventions effectuées à 4 jours ou moins où une amélioration minimale de la FEVG est notée (Schächinger et al. 2006). Contrairement aux résultats de l'essai BOOST, une amélioration de la contractilité régionale du VG sur les segments atteints d'infarctus a été observée lors d'un suivi de 2 ans (Clifford et al. 2012). De plus, les paramètres combinés de décès, d'hospitalisation récurrente pour IC et IDM répétés ont été réduits dans le groupe traité par rapport au placebo à un suivi de 5 ans.

Suite aux résultats prometteurs de l'essai REPAIR-AMI, les essais TIME, Latetime et SWISS-AMI ont été développés (Sürder et al. 2016; Traverse et al. 2011, 2017). Cependant, tous ces essais ont conclu à une absence d'effet du traitement à court et moyen terme et ce quelque soit le moment d'injection (administration intracoronaires de BMMNC 5 à 7 jours ou 3 à 4 semaines après l'IPC).

Dans l'ensemble, les résultats des essais utilisant les BMMNC sont mitigés avec un manque d'uniformité qui peut être attribué à plusieurs facteurs. Premièrement, étant en présence d'une population hétérogène, il est difficile de déterminer quelle(s) sous-population(s) est/sont responsable(s) des effets cliniques observés. Par exemple, certaines études ont démontré une régénération myocardique importante après infarctus suite à l'injection de cellules souches hématopoïétiques et non avec les BMMNC (Orlic et al. 2001; Rota et al. 2007). De plus, un nombre conséquent de publications ont cherché à comparer les méthodologies entre les essais, concluant que des différences apparemment mineures dans la procédure d'isolement (conduisant à des rapports variables de CSH et CSM dans les échantillons), les protocoles de préservation, la quantité, la qualité et le moment d'injection des cellules, le design de l'étude, les caractéristiques du patient (âge, comorbidités, facteurs de risque), et l'évolution imprévisible des IDM aigus, peuvent avoir des répercussions majeures sur la fonction des cellules souches et le résultat clinique subséquent (Henry, Moyé, and Traverse 2016; Strauer and Steinhoff 2011). Certaines études ont également démontré que les échantillons de patients plus jeunes et l'augmentation du nombre de CSH CD34⁺ étaient des

prédicteurs indépendants de la réponse thérapeutique, soulignant l'importance du produit cellulaire (Delewi et al., 2014).

Actuellement, l'essai BAMl de phase 3 en cours (NCT01569178) vise à fournir des données conclusives sur l'efficacité de la thérapie « BMMNC » dans l'IDM. Il s'agit de l'essai le plus important à ce jour, visant à normaliser la collecte, la manipulation et les méthodes d'injection des cellules. Une réduction d'au moins 25% de la mortalité suite au traitement est espérée. Des premiers résultats sont attendus à l'automne 2019.

En plus de la recherche en cours sur l'efficacité de la thérapie « BMMNC », des études basées sur l'exploration de sous-populations de BMMNC ont émergé. Il s'agit notamment d'essais utilisant des cellules progénitrices CD34⁺/CD133⁺ provenant de lignées hématopoïétiques ou des CSM (Mansour et al. 2011).

iii. Cellules souches hématopoïétiques

Les CSH forment une population cellulaire présente en faible proportion dans la moelle osseuse, avec environ 1 cellule sur 10 000. Toutefois, grâce à l'identification de marqueurs de surface spécifiques CD34, CD45, CD133 et CD117 (c-kit), ces cellules sont isolées avec succès.

Plusieurs essais cliniques utilisant des CSH CD34⁺ ou CD133⁺ dérivées de la moelle osseuse ont été réalisés (Bongiovanni et al. 2014; Mansour et al. 2011; Quyyumi et al. 2011; Tendera et al. 2009). L'essai COMPARE-AMI a évalué l'impact de l'administration intracoronale de CSH CD133⁺ chez les patients ayant subi un infarctus et atteints de dysfonction VG (Mansour et al. 2011). La procédure s'est avérée sûre et réalisable, et l'échocardiographie à 4 mois a mis en évidence une augmentation supérieure de la FEVG dans le groupe traité par rapport au groupe placebo. L'étude la plus importante à ce jour est l'essai REGENT qui visait à comparer l'efficacité des BMMNC par rapport aux CSH CD34⁺ chez des patients atteints d'IDM aigu (Tendera et al. 2009). Les patients ont été randomisés dans l'un des deux groupes de traitement (BMMNC, CD34⁺) ou le groupe témoin. Les résultats ne montrent aucune différence significative quel que soit le traitement à 6 mois. Cependant, l'étude présentait de nombreuses limites, comprenant l'absence d'un groupe placebo et un taux élevé de décrochage conduisant à une absence d'imagerie avant et après l'étude pour de nombreux

patients. Afin de tirer des conclusions plus significatives sur la possibilité d'un traitement avec ces cellules, d'autres essais cliniques avec des designs plus rigoureux sont nécessaires.

iv. Cellules souches mésenchymateuses

Les CSM forment une population cellulaire non-hématopoïétique présente dans la moelle osseuse. Elles sont multipotentes avec la capacité à se différencier en ostéocytes, chondrocytes, adipocytes, myocytes et en cellules stromales de la moelle osseuse (Pittenger 1999). Elles se distinguent des autres types cellulaires par la présence des marqueurs de surface CD73, CD105, CD29, CD44 et CD90, ainsi que par l'absence du CD34 et CD45 qui caractérisent les CSH (Dominici et al. 2006). Leur facilité d'isolement, d'expansion et la possibilité de modification génétique *in vitro* en font des candidats thérapeutiques prometteurs en thérapie (Roura et al. 2017).

Des études ont rapidement mis en évidence une capacité des CSM à se greffer dans le tissu hôte, à se différencier en cellules endothéliales vasculaires et CM-like, à stimuler les cellules souches endogènes et à améliorer la fonction VG après IDM (Gao et al. 2015; Pittenger 1999; Psaltis et al. 2008; Roura et al. 2017). Par exemple, l'essai de phase I Prochymal en 2009 a montré une amélioration des scores globaux des symptômes et de la FEVG dans le groupe traité par CSM en injection intraveineuse comparativement au groupe témoin (Hare et al. 2009). À l'heure actuelle, un certain nombre d'essais cliniques prévus ou en cours (y compris PROCHYMAL II (NCT00877903), MI-NSTEMI (NCT02277613), RELIEF (NCT01652209), ESTIMATION (NCT01394432)), ainsi que des études terminées dont les résultats n'ont pas encore été publiés, contribueront à mieux comprendre le potentiel futur de l'application clinique du traitement « CSM » (Psaltis et al. 2008).

En effet, bien que les résultats des études initiales aient été encourageants, il reste de nombreux défis à relever. Premièrement, le taux de greffe et de survie des cellules après la transplantation reste très faible conduisant à un effet à court terme ; l'environnement hostile du tissu cardiaque ischémique/infarcté dans lequel l'injection est réalisée est une des hypothèses émises pour expliquer ce faible taux (Sanganalmath and Bolli 2013). Ainsi, la recherche future doit se concentrer sur des techniques visant à améliorer l'efficacité à long terme. De plus, le(s) mécanisme(s) par lequel/lesquels les CSM médient la réparation tissulaire ne sont pas encore totalement connus. En effet, malgré une différenciation limitée et une faible rétention, une amélioration de la fonction cardiaque est observée, mettant en évidence

une action principalement paracrine de ces cellules favorable au soutien et à la stimulation des processus de réparation endogènes (Roura et al. 2017; Zhang et al. 2015). Les actions paracrines des CSM transplantées favorisent de nombreux processus permettant la restauration fonctionnelle, tels que l'activation des cellules souches endogènes résidentes ou éloignées, la néoangiogenèse, la sécrétion de facteurs immunomodulateurs et trophiques, la stabilisation de la MEC et une augmentation de la vascularisation (Caplan 2017). D'autres études ont suggéré que l'environnement hypoxique des tissus infarctés induisait l'expression et la libération de facteurs de croissance (Hepatocyte Growth Factor (HGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) et Insulin-like Growth Factor (IGF)) qui soutiennent l'angiogenèse, déclenchent la prolifération et la migration des progéniteurs cardiaques, et favorisent la différenciation des CSM en CM (Crisostomo et al. 2008; Yang et al. 2006; Zhao et al. 2016). De plus, une de leurs principales caractéristiques réside dans leurs capacités immunomodulatrices et/ou leur statut immun privilégié (Nauta and Fibbe 2007). Les mécanismes de cette immunotolérance incluent l'immunosuppression de l'environnement local, la modulation du phénotype des cellules T et l'absence ou l'expression d'antigènes majeurs d'histocompatibilité (CMH) à faible surface cellulaire. Il en résulte une diminution de la réponse allo-immune (Atoui, Shum-Tim, and Chiu 2008; Le Blanc and Ringdén 2007). Ces propriétés permettent d'envisager une thérapie allogénique, et via leur forte expansion *in vitro* à partir de quantités modérées extraites de la moelle osseuse, il existe un potentiel d'utilisation en thérapie « immédiate » (Atoui et al. 2008). En effet, posséder une banque de cellules permettrait d'envisager un traitement dans la période optimale d'efficacité des cellules post-IDM (Schächinger et al. 2006).

Un autre avantage des CSM est leur disponibilité et leur facilité d'isolement dans de nombreux tissus. En effet, les CSM qui sont traditionnellement extraites de la moelle osseuse peuvent aussi l'être à partir du tissu adipeux (sous-cutané ou cardiaque), du sang du cordon ombilical, de la gelée de Wharton, du sang périphérique, du placenta et des muscles (Gao et al. 2015; Qayyum et al. 2012; Roura et al. 2017; Wang et al. 2014).

CSM du tissu adipeux

Le tissu adipeux comprend à la fois des adipocytes et une population de cellules mononucléées contenant des CSM semblables à celles de la moelle osseuse (BM-CSM). Les CSM adipeuses (ATMSC) offrent certains avantages par rapport aux BM-MSC, dont l'obtention

est invasive et douloureuse. Leur procédure d'extraction est simplifiée avec une diminution de la douleur, ainsi que des rendements plus élevés étant donné que la densité en CS dans les tissus adipeux est significativement plus élevée que dans la moelle osseuse (5% contre 0,01%) (Fraser et al. 2006).

Des études ont également montré un potentiel plus important de ces cellules en termes de différenciation cardiomyocytaire et d'effets immunomodulateurs avec des effets inhibiteurs supérieurs sur l'activation des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ et des cellules natural killers (NK) mais aussi sur la suppression des cellules B (Ribeiro et al. 2013).

Récemment, plusieurs essais cliniques utilisant les ATMSC pour les MCV ont été réalisés. L'essai Precise comportait l'injection transendocardique d'ATMSC pour la cardiomyopathie ischémique. Les premiers résultats montraient une amélioration de la masse et du mouvement du VG à 18 mois de suivi (Perin et al. 2014). Suite aux premières utilisations d'ATMSC extraites par liposuction du tissu adipeux sous-cutané, on a supposé que les CSM du tissu adipeux cardiaque (cATMSCs) pourraient posséder un potentiel thérapeutique supérieur pour soutenir l'homéostasie cardiaque et le renouvellement des tissus. Des études ont démontré un phénotype cardiaque inné chez ces cellules extraites de la base du cœur et de la racine aortique. Une étude de 2014, comparant les ATMSC d'origine cardiaque et sous-cutanée, a mis en évidence des capacités de réparation supérieures des cATMSC *in vivo*, incluant une myogenèse et une vasculogenèse accrues et l'expression de facteurs de transcription cardiaques, malgré un phénotype identique (Wang et al. 2014). La principale limite liée à l'utilisation de ces cellules concerne la procédure d'extraction invasive. À ce jour, des biopsies de tissus adipeux cardiaques ont été obtenues auprès de patients subissant une chirurgie cardiothoracique. En outre, les donneurs types ont tendance à être âgés et présentent diverses comorbidités contribuant à une mauvaise qualité de l'agent cellulaire (Bayes-Genis et al. 2010).

CSM de la gelée de Wharton

La gelée de Wharton est un continuum de tissus muqueux gélatineux dans le cordon ombilical dont le rôle est de fournir un soutien/une protection aux vaisseaux ombilicaux. Les CSM dérivées de la gelée de Wharton (WJMSC) forment une population primitive de cellules stromales multipotentes provenant des tissus mésodermiques embryonnaires et/ou extraembryonnaires au 13^{ème} jour du développement embryonnaire (Kim et al. 2013; Troyer

and Weiss 2008). La gelée de Wharton est facilement extraite après la naissance. Les WJMSC conservent bon nombre de leurs marqueurs embryonnaires et mésenchymateux *in vitro* et vont présenter un plus fort potentiel de différenciation cardiaque que les CSM issues d'autres sources (Kim et al. 2013; Troyer and Weiss 2008) avec l'expression de marqueurs cardiaques tels que l' α -actine, la troponine T et la connexine-43 (Bongso and Fong 2013; Gao et al. 2013). Elles vont également, *in vivo*, favoriser la régénération par des mécanismes paracrines grâce à la sécrétion de quantités importantes de facteurs pro-angiogéniques, anti-apoptotiques et de croissance. Elles ont la capacité à se différencier en CM et cellules endothéliales dans le tissu ischémique améliorant ainsi la fonction cardiaque (Bongso and Fong 2013; Gao et al. 2013). En 2015, l'essai WJ-MSC-AMI a présenté les résultats de la première étude évaluant l'innocuité et l'efficacité de la transplantation intracoronaire de WJMSC allogéniques chez des patients atteints d'IDM (STEMI) 5 et 7 jours après le traitement de reperfusion (Gao et al., 2015). Les résultats ont révélé une amélioration de la viabilité du myocarde (mesurée par TEP) et de la fonction cardiaque avec une amélioration de la perfusion de la zone infarctée, une amélioration significative de la FEVG (7,9 +/- 0,9% par rapport au groupe contrôle), une légère réduction de la taille de l'infarctus et la prévention du remodelage du VG à 18 mois de suivi. Ces résultats contrastent avec certaines études portant sur les BMMNC qui ont montré un effet limité sur le remodelage ventriculaire post-IDM, sans impact significatif sur les volumes diastoliques finaux (Schächinger et al. 2006; Wollert et al. 2004).

En outre, aucun signe de réponse immunitaire, de tissu ectopique ou d'antigènes associés aux tumeurs n'a été observé après la transplantation des cellules et leur utilisation n'est pas controversée, soulignant l'avantage des WJMSC sur les cellules souches pluripotentes induites et embryonnaires (qui seront abordées ultérieurement) (Gao et al., 2015).

CSM issu du sang de cordon ombilical

Le sang du cordon ombilical (UCB) a été considéré comme la source la plus abondante de CS pour de nombreuses thérapies. Bien qu'elles soient principalement utilisées en traitement des affections hématologiques, leur potentiel thérapeutique s'est largement étendu (Roura et al. 2017). Les CSM du sang de cordon ombilical (UCBMSC) ne semblent pas posséder la capacité à se différencier dans la lignée cardiaque, mais présentent un rôle pro-angiogénique et immunomodulateur (Roura 2013).

Les UCBMSC sont facilement isolées selon un protocole sûr et indolore et cultivées *in vitro* sur un temps de culture court (2 jours). Elles peuvent être cryoconservées sans perte des propriétés immunomodulatrices et régénératives. Sur cette base, elles représentent une population supplémentaire de cellules progénitrices multipotentes (Lee et al. 2014). Il y a actuellement un essai clinique en cours qui vise à évaluer l'impact de l'administration intracoronaire d'UCBMSC chez des patients atteints d'IC (essai SEESUPIHD, NCT02666391) ; cependant, afin de parvenir à une utilisation clinique, divers problèmes doivent encore être surmontés. En premier lieu, il est nécessaire d'élaborer des critères libérateurs de qualité et d'efficacité permettant la production d'un agent thérapeutique pouvant obtenir l'accréditation et de créer des accords de collaboration pour accroître la disponibilité en UCB (Roura et al. 2016).

CSM cardiopoïétique

Un des développements les plus récents dans le domaine de la thérapie « CSM » est l'utilisation de CSM cardiopoïétiques. La cardiopoïèse est un processus de conditionnement qui permet d'améliorer la capacité de régénération des CS grâce à un pré-engagement dans une lignée (Bartunek et al. 2013). L'induction d'un état cardiopoïétique des CSM est conçue pour augmenter leur bénéfice régénératif.

L'essai C-CURE a été la première étude à utiliser des cellules cardiopoïétiques pour traiter l'IC ischémique post-IDM (Bartunek et al. 2013). Les participants ont été répartis par randomisation dans un groupe témoin (n = 15) ou un groupe traité (n = 21) qui a reçu une administration intramyocardique de cellules cardiopoïétiques C3BS-CQR-1 dérivées de la moelle osseuse. Bien que les paramètres primaires aient été des mesures de sécurité et de faisabilité plutôt que l'étude d'effets thérapeutiques, le groupe traité a présenté des améliorations de la FEVG, de la LVSV et du test de marche de 6 minutes à un suivi de 6 mois. Les résultats ont montré que le processus était aussi sûr et réalisable à partir de BMMSC non-induites, avec la présentation d'effets favorables sur la FEVG, le remodelage et le bien-être général des patients.

À la suite de ces résultats, l'essai CHART a été conçu pour évaluer le potentiel thérapeutique des cellules C3BS-CQR-1 chez des patients atteints d'IC chronique secondaire à une atteinte ischémique (Bartunek et al. 2016). Deux cent quarante patients ont été randomisés afin de recevoir soit des cellules cardiopoïétiques autologues en intramyocardique soit un placebo.

Le paramètre d'efficacité primaire est une combinaison entre le taux de mortalité, l'aggravation de l'IC, le score au questionnaire de qualité de vie, le test de marche de 6 min, la LVESV et la FEVG à un suivi de 9 mois. Les critères d'innocuité comprennent la mortalité, les ré-admissions et les événements indésirables graves à 12 et 24 mois de suivi. L'essai s'est terminé en 2017 et les résultats définitifs n'ont pas encore été publiés.

Ces essais fournissent de nombreux résultats qui mettent en évidence le potentiel d'une thérapie cellulaire sans cellules originaires du tissu cardiaque. Cela présente un avantage clinique important compte tenu des difficultés liées à l'obtention de CSC, dont il sera question plus loin.

v. Cellules souches dérivées du muscle

Le terme de MDSCs (pour muscle derived-stem cells) regroupe aujourd'hui différentes populations dont les propriétés et les profils phénotypiques varient selon les espèces et les équipes en raison de variations dans les protocoles d'isolement et d'amplification *in vitro*. L'isolement de ces cellules selon un protocole dit de preplating (succession de transfert de surnageant) est basé sur leurs propriétés d'adhérence et plus particulièrement un déficit d'adhérence initial. Elles représentent de l'ordre d'1% des cellules totales dérivées du muscle (Qu-Petersen et al. 2002).

Suite à une injection intramyocardique, des cellules murines ont montré un effet bénéfique dans un contexte d'IDM avec une capacité à s'insérer dans le tissu cardiaque et à se différencier en CM ou cellules hybrides (présentant des marqueurs cardiaques et musculaires squelettiques). Des effets sur l'angiogenèse et la fonction cardiaque globale ont également été mis en évidence (Oshima et al. 2005; Payne et al. 2005; Sekiya et al. 2013). Malheureusement, aucun article décrivant le potentiel thérapeutique de l'équivalent humain de ces cellules en préclinique n'a depuis été publié.

b) Types cellulaires de 2nde génération

i. Cellules progénitrices/souches cardiaques

Les années 2000 ont été marquées par la découverte dans le myocarde adulte de souris, de rat et d'Homme de cellules souches cardiaques (CSC). Ces cellules représentent de 0,005 à 2% des cellules cardiaques totales selon l'espèce et le développement, et possèdent les propriétés types des CS, telles qu'une capacité d'auto-renouvellement, de clonogénicité et de

multipotence. Elles sont caractérisées par la présence de marqueurs membranaires typiques (ex : c-kit, Sca-1 et PDGFR- α) et par l'expression du facteur de transcription cardiaque Islet1, marqueur précoce des cellules progénitrices cardiaques embryonnaires (Li et al. 2010).

Cellules souches cardiaques c-kit⁺

En 2003, Beltrami et ses collaborateurs ont décrit une population cellulaire isolée du cœur de rat adulte sur la base de l'expression du récepteur tyrosine kinase c-kit (spécifique des CS) et de l'absence des marqueurs de la lignée hématopoïétique (Beltrami et al. 2003). Ces CSC c-kit⁺ se sont révélées auto-renouvelables, clonogènes et multipotentes, démontrant la capacité à se différencier en CM, cellules musculaires lisses et cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo* (Beltrami et al. 2003; Claudia Bearzi 2007; Linke et al. 2005). Quatre ans plus tard, une population similaire de CSC c-kit⁺ a été identifiée dans le cœur humain adulte. Leur injection dans le myocarde d'un rongeur infarci a permis d'améliorer la fonction et la structure du VG ainsi que la formation d'un cœur chimérique contenant du myocarde humain composé de myocytes et de vaisseaux coronariens (Claudia Bearzi 2007).

Au cours de la dernière décennie, la capacité des CSC, d'origine humaine et murine, d'une part à atténuer le dysfonctionnement et le remodelage du VG et d'autre part à favoriser la régénération a été démontrée à maintes reprises par plusieurs laboratoires dans divers modèles animaux précliniques d'IDM (Angert et al. 2011; Dawn et al. 2005; Fischer et al. 2009; Li et al. 2011; Linke et al. 2005). Ainsi, l'injection intramyocardique de CSC c-kit⁺ dans la zone bordante 20 jours après occlusion coronarienne permanente chez le rat, a entraîné le remplacement d'environ 42% de la cicatrice par du tissu myocardique, l'atténuation de la dilatation du VG et la préservation de la fonction ventriculaire gauche (Rota et al., 2008). D'un point de vue pratique, la technique la plus propice à l'utilisation clinique des CSC chez les patients atteints d'IC serait par injection intracoronarienne. Dans ce but, Tang et coll. ont administré des CSC marquées par perfusion intracoronaire dans un modèle d'ischémie-reperfusion chez le rat un mois après la reperfusion. Trente-cinq jours plus tard, les rats traités présentaient une meilleure viabilité myocardique dans la zone bordante, une diminution de la fibrose dans la région non infarctée et une fonction du VG améliorée. Cependant, le nombre limité de cellules GFP⁺ exprimant des marqueurs d'engagement cardiogénique ($2,6 \pm 1,1\%$ de

la région à risque et $1,1 \pm 0,4\%$ dans la région non infarctée) était trop faible pour expliquer l'augmentation de la fonction ventriculaire gauche. Il a été suggéré un impact principalement paracrine des cellules avec la sécrétion de cytokines/facteurs de croissance agissant sur les cellules endogènes, en particulier les CSC endogènes, qui se sont à leur tour multipliées et différenciées en cellules cardiaques adultes. À l'appui de cette hypothèse, il a été constaté que le pool de CSC endogènes était plus important chez les rats traités comparés aux rats témoins (Tang et al. 2010).

Afin de confirmer ces résultats, une étude préclinique a été menée chez un modèle gros animal, cliniquement pertinent, en l'occurrence le cochon (Bolli et al. 2013a). Des cochons ayant subi une occlusion coronarienne de 90 minutes suivie d'une reperfusion, ont eu l'appendice auriculaire droit prélevé pour l'isolement et l'expansion des CSC c-kit⁺. Trois mois après l'IDM, 1 million de CSC autologues ont été infusés dans l'artère responsable de l'infarctus à l'aide d'un cathéter à ballonnet. Comme observé chez le rat, un mois plus tard, les cochons traités présentaient une augmentation de la FEVG, ainsi qu'une diminution de la pression ventriculaire gauche en fin de diastole (LVEDP) et une augmentation de la dp/dt_{max} du VG (Bolli et al., 2013b). Les résultats encourageants de ces études ont conduit à l'essai SCIPIO, le premier essai clinique utilisant des CSC. Il s'agit d'un essai de phase I, randomisé, ouvert, de CSCs autologues pour le traitement d'IC ischémique. Les patients atteints avec une FEVG à 40% et subissant un pontage aorto-coronarien étaient prélevés et environ 4 mois après 1 million de CSC autologues (isolées et amplifiées à partir de tissus myocardiques prélevés pendant la chirurgie) leur était administré par perfusion intracoronarienne (Chugh et al., 2012). A 4 et 12 mois de suivi, une amélioration de la FEVG et une diminution de la zone infarctée ont été mises en évidence. Cependant, depuis des doutes ont été émis quant à l'intégrité de certaines données de cet essai (The Lancet Editors 2014).

Malgré cela, CAREMI, un essai de phase I/II évaluant la faisabilité (innocuité, efficacité) d'un traitement intracoronarien avec des CSC allogéniques, a été mis en place dans un contexte post-IDM (Sanz-Ruiz et al. 2017). L'étude comprenait 55 patients présentant un dysfonctionnement ventriculaire gauche et un risque élevé d'IC. Bien que l'essai soit terminé, les résultats n'ont pas encore été publiés.

Cardiosphères et cellules dérivées des cardiosphères

Les cardiosphères ont été décrites pour la première fois par Messina et al. en 2004. À l'aide de sous-cultures de biopsies auriculaires ou ventriculaires humaines et de cœurs murins, ces auteurs ont isolé une population de cellules qui se sont développées en amas auto-adhérents capables de se différencier en CM, cellules endothéliales et cellules musculaires lisses. Ces amas ont été appelés "cardiosphères" (Messina et al. 2004). Trois ans plus tard, Smith et al. (Smith et al. 2007) ont présenté une méthode par laquelle des cardiosphères obtenues à partir de biopsies endomyocardiques percutanées étaientensemencées pour produire des cellules dérivées de cardiosphères. Ces dernières se différencient en CM électriquement stables *in vitro* et, lorsqu'elles sont injectées dans un modèle murin d'infarctus, elles favorisent la régénération cardiaque et améliorent la fonction cardiaque (Smith et al. 2007). En 2009, il a été montré que l'administration intracoronarienne de CDC humaines chez des porcs atteints d'IC ischémique avait entraîné une régénération cardiaque, une réduction de la taille "relative" de l'infarctus, une atténuation du remodelage néfaste du VG et une amélioration de la fonction cardiaque (Johnston et al. 2009).

Sur le plan phénotypique, les cardiosphères et les CDC correspondent à un mélange de nombreux types de cellules, y compris des cellules qui expriment des marqueurs antigéniques endothéliaux (KDR[humain]/ flk-1[souris], CD31), des CS (CD34, c-kit, Sca-1) et mésenchymateux (CD90, CD105) (Messina et al. 2004). Le sous-type de cellules responsable des effets observés sur la fonction cardiaque et le remodelage est encore inconnu. Dans l'essai clinique CADUCEUS, 98% des CDC infusées étaient positives pour le CD105, ce qui suggère une nature mésenchymateuse (Makkar et al. 2012). Dans une étude récente du même groupe (Lee et al. 2011), l'innocuité et l'efficacité de l'injection intramyocardique directe de CDC et de cardiosphères ont été comparées dans un modèle porcin d'IC post-IDM ; bien que les deux types cellulaires aient des effets équivalents sur la FEVG, les cardiosphères ont été supérieures pour améliorer la fonction hémodynamique et régionale et pour atténuer le remodelage ventriculaire. Le bénéfice accru des cardiosphères pour la réparation du myocarde a été attribué à leur "souchitude" et aux interactions qu'elles génèrent avec la matrice (Li et al. 2010).

Ce travail préclinique a été traduit par Makkar et al. en une étude de phase I, randomisée (CADUCEUS) chez des patients présentant un IDM récent et une FEVG allant de 45% à 25%. De 1,5 à 3 mois après l'IDM, 17 patients ont reçu une perfusion intracoronarienne de doses

croissantes de CDC autologues (12,5, 17,3 ou 25 millions de cellules) provenant d'une biopsie endomyocardique. Après 12 mois de suivi, les patients traités présentaient une réduction de 42% de la zone cicatricielle (de 24% à 12% du VG) concomitante à une augmentation du tissu viable et à un épaissement régional de la paroi systolique dans la région infarctée. Cependant, le traitement par les CDC n'a pas réussi à augmenter la FEVG, à réduire les volumes VG et à améliorer la qualité de vie selon le questionnaire de la NYHA (Makkar et al. 2012). Bien que la diminution de tissu cicatriciel chez les patients traités soit considérée comme une preuve de régénération cardiaque, elle pourrait également s'expliquer par d'autres changements non liés à la régénération, comme l'hypertrophie, la diminution de l'espace interstitiel, la réduction de la perméabilité vasculaire et/ou une amélioration de la perfusion (Debl et al. 2006; Lima et al. 1995; McVeigh et al. 2012; Saeed et al. 2001). ALLSTAR est un essai en cours de phase I/II ayant pour objectif de tester l'innocuité et l'efficacité de l'injection intracoronaire de CDC allogéniques chez des patients atteints de dysfonction ventriculaire gauche consécutif à un IDM. L'essai prévoit de recruter jusqu'à 134 patients provenant de 35 centres nord-américains. La principale mesure des résultats est la morbidité/mortalité à 30 jours et la réduction de la taille de l'infarctus à un an de suivi.

En résumé, malgré des résultats précliniques prometteurs, les preuves que les CDC ont des effets bénéfiques sur la fonction VG globale et l'état clinique font toujours défaut (Tableau III). Étant donné la nature hétérogène de cette préparation cellulaire, il est difficile de déterminer quel(s) composant(s) explique(nt) les effets observés. Comme pour les CSC c-kit⁺, des études de phase II de plus grande envergure sont nécessaires pour évaluer le potentiel thérapeutique des CDC.

Cellules souches cardiaques Sca-1⁺

L'existence de progéniteurs Sca-1⁺ dans le cœur de souris adultes a été rapportée par l'équipe de Oh et al, en 2003. Ces cellules expriment le CD31 et des facteurs de transcription cardiogéniques (GATA-4, MEF2C et MEF-1) sont en revanche négatifs pour des marqueurs de la lignée sanguine, c-kit, Flt-1, Flk-1, la cadhérine endothéliale vasculaire, le facteur von Willebrand et les marqueurs hématopoïétiques CD45 et CD34 (Oh et al. 2003). *In vitro*, elles ont la capacité à exprimer des gènes codant des protéines de structures cardiaques et à se différencier en CM battants après traitement par la 5-azacytidine (Oh et al., 2003) et l'ocytocine (Matsuura et al. 2004). Leur transplantation dans les zones bordantes et infarctées

dans un modèle murin d'IDM s'est accompagné d'une différenciation endothéliale et cardiaque associée à une atténuation du remodelage ventriculaire (Wang et al. 2006). Cependant, les effets de ces cellules dans le cadre de l'IC chronique restent à déterminer. De plus, l'absence d'un homologue humain rend la transition clinique difficile.

Cellules de la « Side population » (SP)

Les cellules dites de la « side population » (SP) se caractérisent par leur capacité à exclure le colorant Hoechst 33342 via les transporteurs de liaison à l'ATP Bcrp1/Abcg2 et MDR1 (Zhou et al. 2001). D'abord identifiées dans la moelle osseuse murine comme les HSCs (Goodell, Brose, Paradis, Conner, & Mulligan, 1996), les cellules SP ont ensuite été isolées à partir de cœurs de souris adultes et embryonnaires et caractérisées comme CD31⁻, Sca-1^{high}, c-kit^{low}, CD34^{low}, et CD45^{low} (Martin et al. 2004). Bien qu'il ait été montré que les cellules SP cardiaques se différencient en CM matures, cellules endothéliales et cellules musculaires lisses (Oyama et al. 2007), leur capacité à induire une réparation cardiaque n'a pas été testée.

Cellules Islet-1⁺

Pendant la cardiogenèse, les cellules Islet-1⁺ donnent naissance au muscle cardiaque, au système de conduction, aux cellules endothéliales et musculaires lisses dans les compartiments cardiaques (Laugwitz et al. 2007). Il a été proposé qu'elles correspondent à des progéniteurs cardiaques endogènes qui présentent une capacité de différenciation en un phénotype cardiaque mature, avec une dynamique calcique intacte et un potentiel d'action (Laugwitz et al. 2005) ; cependant, la capacité de ces cellules à réparer *in vivo* le myocarde blessé n'a jamais été démontrée. Il est important de noter que ces cellules n'existent pas dans le myocarde ventriculaire post-natal, que ce soit dans des conditions normales ou après un IDM, ce qui rend peu probable leur utilisation en clinique (Weinberger et al. 2012).

Avant leur utilisation en clinique, de nombreux défis restent à surmonter comme la procédure d'isolement invasive, la nécessité d'avoir recours à des méthodes coûteuses d'expansion *ex vivo* avant la transplantation pour obtenir un nombre adéquat de cellules à injecter et une faible disponibilité (Nigro et al. 2018). Pour surmonter ces points, des recherches sont menées afin d'activer les CSC endogènes en utilisant des médicaments, des facteurs de croissance (IGF, HGF) ou des microARN (Moccetti et al. 2015). Une autre technique pour surmonter l'extraction difficile est l'utilisation de CDC obtenus à partir de biopsie endomyocardique percutanée (Smith et al. 2007).

Étant donné la récente découverte des CSC, une analyse plus poussée est nécessaire afin de caractériser les sous-types cellulaires en fonction de leurs marqueurs de surface, de l'expression des gènes, des capacités de différenciation et de leur rôle dans la réparation/homéostasie cardiaque/ avant de pouvoir envisager une application clinique ultérieure (Ellison et al. 2010). Premièrement, on ne sait pas si les cellules isolées du tissu auriculaire par rapport au tissu ventriculaire ont le même potentiel thérapeutique en raison de leurs profils génétiques différents (Ng, Wong, and Tsang 2010). De plus, étant donné le nombre important de sous-catégories de CSC qui ont été découvertes chez les rongeurs et l'Homme, il reste à déterminer si ces cellules ont des rôles et des capacités distincts pour la réparation cardiaque. Par exemple, bien que la source principale de réparation cardiaque dans un certain nombre d'études ait été des cellules c-kit⁺, des preuves montrant leur insignifiance fonctionnelle sont également présentes, ce qui suggère que les résultats bénéfiques sont dus à la stimulation de la croissance capillaire plutôt qu'à la génération de CM (Van Berlo et al. 2014).

Tableau III : Récapitulatif des principaux essais cliniques réalisés avec des cellules souches adultes cardiaques

Study	Design	Patient cohort	Cell preparation, dose, and delivery route	Primary end point	Results
KIT⁺ cardiac stem cells					
SCPIO (2011)	<ul style="list-style-type: none"> • Randomized, open label • Phase I 	<ul style="list-style-type: none"> • Ischaemic cardiomyopathy (LVEF <40%) • n = 23 	<ul style="list-style-type: none"> • Intraoperative biopsy of the right atrial appendage, sorting, and expansion of KIT⁺ cells • 1 × 10⁶ cells; single dose • Intracoronary injection at a mean of 113 days after surgery 	Safety	<ul style="list-style-type: none"> • Improvement of LV systolic function and reduction in infarct size in the treated cohort compared with baseline (no comparison with placebo group) • In 2014, the editors of <i>The Lancet</i> issued an “expression of concern” about this article because of questions “about the integrity of certain data”⁹⁸
Cardiosphere-derived cells					
CADUCEUS (2014)	<ul style="list-style-type: none"> • Randomized, open label • Phase I 	<ul style="list-style-type: none"> • Post-MI LV dysfunction (LVEF 25–45%) • n = 25 	<ul style="list-style-type: none"> • Autologous cardiosphere-derived cells generated from patient right ventricular tissue harvested by endomyocardial biopsy; tissue was then cultured under defined conditions to generate cardiospheres, followed by collection of the cells outgrowing from the cardiospheres³⁷ • 12.5 × 10⁶–25.0 × 10⁶ cells; single dose • Intracoronary injection 1.5–3.0 months after MI 	<ul style="list-style-type: none"> • Safety • Secondary efficacy end points included NYHA class, MLHFQ, and 6-min walking test 	<ul style="list-style-type: none"> • Reduction in infarct size and improvements in regional function • No differences in LVEF between treated and control patients
ALLSTAR (2017)	<ul style="list-style-type: none"> • Randomized, double blind, placebo controlled • Phase II 	<ul style="list-style-type: none"> • MI and LV dysfunction (LVEF ≤45%) • n = 134 	<ul style="list-style-type: none"> • Allogeneic cardiosphere-derived cells generated from donor heart tissue • 25 × 10⁶ cells; single dose • Intracoronary injection 1.5–3.0 months after MI 	<ul style="list-style-type: none"> • Safety • Change in infarct size 	Premature interruption of the trial owing to futility after an interim analysis of the 6 month follow-up data

LV, left ventricular; LVEF, left ventricular ejection fraction; MI, myocardial infarction; MLHFQ, Minnesota Living with Heart Failure Questionnaire.

ii. Cellules souches embryonnaires

Une lacune majeure des premiers essais cliniques réalisés est la capacité limitée des cellules transplantées à s'intégrer et à se différencier en CM. Par conséquent, des scientifiques ont produit des CM fonctionnels *in vitro* pour permettre la transplantation de CM *de novo* au niveau de la lésion. Les premières cellules étudiées dans ce but ont été les cellules souches embryonnaires (CSE) qui sont des cellules pluripotentes issues de la masse cellulaire interne du blastocyste. Elles sont capables de générer tous les types cellulaires issus des trois feuilletts embryonnaires (ectoderme, endoderme et mésoderme) et de proliférer indéfiniment *in vitro* dans un état indifférencié, leur conférant ainsi un fort potentiel pour des applications en médecine régénératrice (Evans and Kaufman 1981). Ces cellules vont présenter la capacité à se différencier en CM capables de s'intégrer au niveau électrique avec le tissu cardiaque environnant (Xue et al. 2005).

Le premier essai clinique (ESCORT) utilisant des CSE humaines a été réalisé en 2015. Il consistait en l'injection de progéniteurs cardiaques dérivés de CSE chez des patients atteints d'IC avancée allant subir un CABG ou un remplacement de la valve mitrale. Les cellules obtenues en culture étaient additionnées à un patch de fibrine placé sur le cœur au niveau de la zone infarctée (Menasché et al. 2015, 2018). Les auteurs ont démontré une faisabilité incluant tous les aspects de la procédure et les résultats mettent en évidence une amélioration symptomatique corrélée à une amélioration de la contractilité à l'échographie de 10% de la LVEF à 3 mois de suivi. L'utilisation d'un patch a permis d'augmenter la rétention et la survie des cellules, de diminuer les dommages cellulaires et le risque d'arythmies ventriculaires, d'augmenter la survie des patients et de préserver la fonction cardiaque (Sekine et al. 2011). Bien que cet essai ait donné des résultats très prometteurs, une des limites majeures reste le risque d'arythmies, bien qu'aucun des patients sur les 6 n'en aient déclaré. Des arythmies ventriculaires non fatales avaient été observées en 2014 dans une étude préclinique chez des primates non humains (Chong et al. 2014a). Cependant, cette avait également mis en évidence une prise de greffe élevée des cellules résultant en une remuscularisation de la zone infarctée associée à un couplage électromécanique des cellules greffées avec le tissu hôte. Ces résultats laissent entrevoir la possibilité de résultats bénéfiques similaires chez l'Homme si le risque d'arythmies peut être surmonté.

L'utilisation de ces cellules est cependant aujourd'hui très limitée compte tenu de leur fort pouvoir mitogène/tumorigène ainsi que pour des considérations d'ordre éthique, politique et réglementaire (Cunningham et al. 2012).

iii. Cellules souches pluripotentes

Une avancée majeure dans le domaine des CS a été la découverte en 2006 par l'équipe de Takahashi et Yamanaka d'un ensemble de gènes (récapitulant le programme génétique des ESCs) capables de réinitialiser le programme de différenciation de cellules somatiques différenciées murines (fibroblastes) et ainsi de générer des cellules pluripotentes appelées cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) (Takahashi and Yamanaka 2006). Peu de temps après, des iPSCs humaines ont été générées à partir de fibroblastes de sujets adultes, grâce à deux cocktails de quatre gènes : Octamer-binding transcription factor $\frac{3}{4}$ (*OCT3/4*), SRY-related high mobility group box protein-2 (*SOX2*), l'oncoprotéine *c-MYC* et le Kruppel-like factor 4 (*KLF4*) (Takahashi et al. 2007) ou *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* et *LIN28* (Yu et al. 2007). Ces cellules sont comparables aux ESCs en ce qui concerne le taux de prolifération, le phénotype ou encore le niveau de pluripotence mais présentent l'avantage de pallier aux problèmes éthiques inhérents à l'utilisation d'embryons humains.

In vitro, les progéniteurs cardiaques générés à partir d'iPSC humaines expriment de nombreuses protéines cardiaques incluant la connexine-43 et les différentes chaînes de myosine nécessaires au développement de phénotypes myocytaires ventriculaires adultes (Blin et al. 2010). Les CM obtenus battent spontanément et présentent une sensibilité aux stimulés bêta-adrénergiques *in vitro* (Ahmed et al. 2011). De plus, en examinant les caractéristiques du potentiel d'action, il a été démontré que les iPSC (comme les ESC) possèdent le potentiel d'action caractéristique des lignées ventriculaires, auriculaires et nodales (Zhang et al., 2009). Ces propriétés donnent aux iPSC une capacité d'intégration supérieure dans le tissu cardiaque de l'hôte comparativement aux CS provenant de tissus adultes.

Dans une étude réalisée en 2016, des CM allogéniques dérivés d'iPSC transplantés ont survécu jusqu'à 12 semaines après traitement dans le cœur infarci de macaque, avec des signes d'amélioration de la fonction (Shiba et al. 2016). Un résultat important de cette étude est la survie à long terme des cellules dans le cœur de macaque immunodéprimé sans formation de tumeur. Toutefois, comme prévu, les animaux ayant subi une transplantation de cellules

présentaient une incidence importante de tachycardie ventriculaire qui pourrait être dû à l'état immature des propriétés électriques des CM dérivés d'iPSC transplantés.

Le nombre important de manipulations nécessaires à la reprogrammation, leur maintien en culture et leur différenciation vers une lignée spécifique, sont autant de facteurs de risques : de formation de tératomes et d'aberrations chromosomiques. De fait, de nombreuses équipes travaillent sur ces paramètres et notamment sur l'étape de reprogrammation, afin d'améliorer le rendement mais également la sécurité (Stuart and Pattavilakom 2015). En conclusion, bien que les résultats des études précliniques initiales aient donné des résultats positifs sur le plan cardiaque, la confirmation de l'innocuité et de la fonctionnalité *in vivo* est requise avant la mise en pratique clinique.

Les divergences et la variété des résultats obtenus à ce jour reflètent les défis qui existent dans ce domaine émergent et les obstacles qui doivent être encore surmontés pour que l'utilisation des CS en médecine cardiovasculaire puisse réaliser son potentiel (Tableau IV).

Tableau IV : Récapitulatif des principaux candidats cellulaires testés en essais cliniques (Madigan and Atoui 2018).

Cell Type	Advantages	Disadvantages	Clinical Trials
Skeletal Myoblasts	Abundant, contractile abilities, withstand ischemic insult	Committed to skeletal muscle lineage	MAGIC
ESCs	Pluripotent	Ethical, political, and availability issues	ESCORT (NCT02057900)
iPSCs	Pluripotent, embryonic-like state, can be derived from various adult tissue sources, strong functional integration within myocardium	Tumorigenic if cells are not pre-differentiated, viral delivery can lead to mutations	none
BMMNCs	Most extensively studied, results show improved LV function, contractility, decreased morbidity and mortality	Heterogeneous cell population, lack standardized study methodologies, most recent trials show no improvement in cardiac function	BAMI (NCT01569178) BOOST BALANCE BONAMI (NCT00200707) REGENERATE-AMI (NCT00765453) REPAIR-AMI SCAMI (NCT00669227) MI3-Trial SWISS-AMI (NCT00355186) TIME (NCT00684021) LateTIME (NCT00684021)
MSCs	Immune-privileged, potential for allogenic use, rich source of cells (adipose in particular), readily extracted, easily expanded, variety of sources (UCB, WJ, etc.)	Lack standardized procedures, lack of long-term follow-up to determine if benefits will last	PROCHYMAL (NCT00114452) PROCHYMAL II (NCT00877903) MyStromalCell (NCT01449032) Precise Trial (NCT00426868) RELIEF (NCT01652209) ESTIMATION (NCT01394432) SEESUPIHD (NCT02666391) WJ-MS-C-AMI (NCT01291329) C-CURE (NCT00810238) CHART (NCT01768702)
HSCs	Some studies show improved cardiac regeneration compared to BMSCs	Need for studies with more rigorous trial designs	REGENT (NCT00316381) COMPARE-AMI
CSCs	Superior differentiation into cardiac lineages	Invasive, low availability, costly expansion, older/autologous donors means lower quality cells	SCIPIO (NCT00474461) CADUCEUS (NCT00893360) CAREMI (NCT02439398) ALLSTAR (NCT01458405)

iCs (embryonic stem cells); iPSCs (induced pluripotent stem cells); BMMNCs (bone marrow mononuclear cells); LV (left ventricular); MSCs (mesenchymal stem cells); UCB (umbilical cord blood); WJ (Wharton's jelly); HSCs (hematopoietic stem cells); BMSCs (bone marrow stem cells); CSCs (cardiac stem cells).

Des articles de synthèse ont déjà décrit en détails les facteurs qui ont contribué à l'éventail des résultats obtenus jusqu'à présent (Dixit and Katare 2015; Nigro et al. 2018). En 2016, le groupe de travail sur la biologie cellulaire du cœur de la Société Européenne de Cardiologie a publié des recommandations afin d'améliorer la recherche en thérapie cellulaire pour la régénération cardiaque (Madonna et al. 2016). Les auteurs font remarquer que les études futures devraient viser à mettre l'accent, non seulement, sur les mesures d'innocuité et d'efficacité, mais aussi sur des normes plus précises concernant des facteurs tels que les types de cellules (y compris la source, allogénique ou autologue), les techniques de préconditionnement et de culture, l'expansion, les méthodes et le moment d'administration, les périodes de suivi et les caractéristiques des patients (âge, état de santé et historique médical). Les méthodologies de recherche futures devraient viser à mettre au point des techniques plus normalisées afin que les études soient comparables, et d'autres essais cliniques sont nécessaires pour valider et mettre à profit les résultats antérieurs. À la suite de ces améliorations, des études comparatives directes entre les divers types de CS contribueraient à déterminer la source idéale de CS à utiliser.

3. Mécanismes cellulaires associés à la réparation cardiaque

De nombreuses études visent à élucider les mécanismes d'action impliqués dans les bénéfices consécutifs à la thérapie cellulaire cardiaque (Figure 14). Dans ce cadre, la FDA exige que les modes d'action soient clairement définis pour l'approbation de nouveaux médicaments. Toutefois, ce n'est pas le cas pour les thérapies à base de CS en général. Les mécanismes de réparation cardiaque à médiation cellulaire sont complexes. Les hypothèses initiales suggéraient que les CS injectées réparaient le tissu hôte par remplacement direct des tissus lésés (Sanganalmath and Bolli 2013). Cependant, la greffe limitée de CS et la différenciation directe des cellules transplantées en cellules vasculaires et CM, que ce soit par transdifférenciation ou fusion cellulaire, ne peuvent expliquer de façon exhaustive les avantages cardiaques mis en évidence (Sanganalmath and Bolli 2013; Yoon et al. 2005). Plus tard, la sécrétion de facteurs solubles, d'exosomes et d'ARN non codants a été considérée comme le principal facteur contribuant aux bienfaits fonctionnels des thérapies à base de CS. Ces différents mécanismes seront décrits ultérieurement.

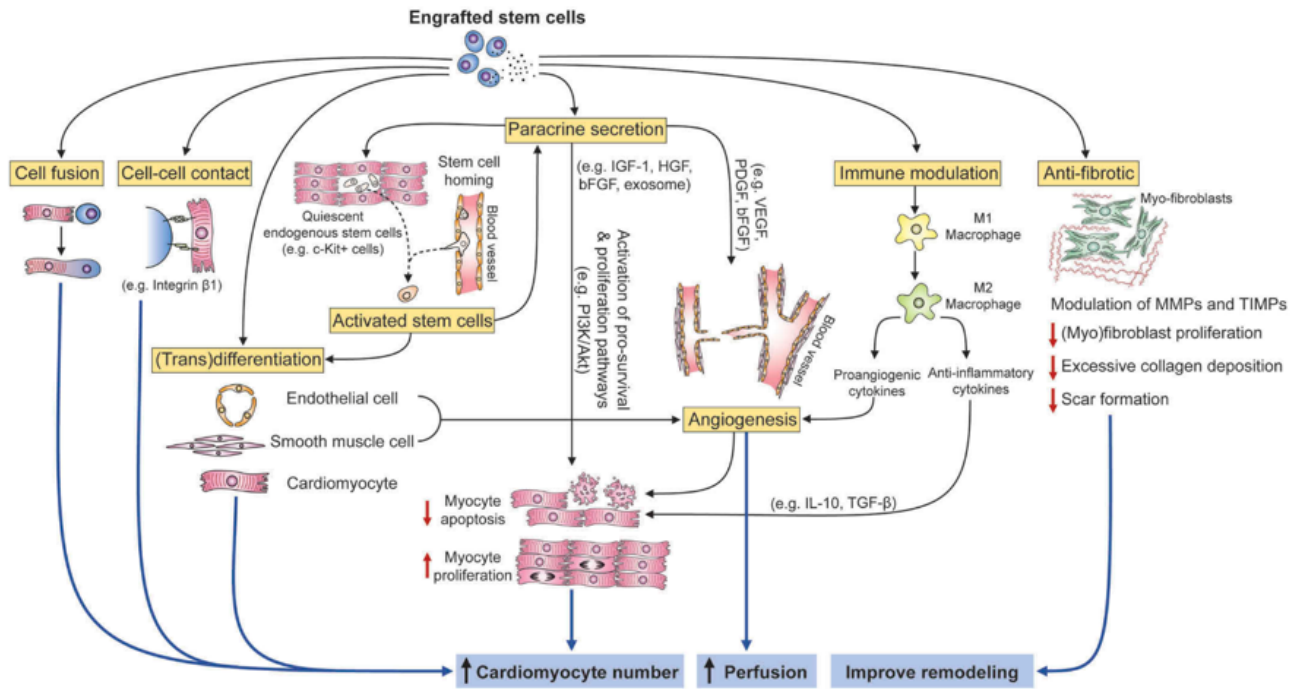


Figure 14 : Schéma récapitulatif des principaux mécanismes impliqués dans l'impact de la thérapie cellulaire cardiaque (Kanda and Davis 2017).

a) Différentiation cardiomyogénique/angiogénique directe

Comme évoqué précédemment, les CS ont deux propriétés distinctes qui sous-tendent à la base leur utilisation en médecine régénérative : leur capacité d'auto-renouvellement et leur capacité à se différencier dans différentes lignées. C'est cette seconde propriété qui va ici nous intéresser.

Bien que cela puisse sembler l'explication la plus évidente des effets bénéfiques des CS, les preuves obtenues jusqu'à présent n'appuient pas la (trans)différenciation des cellules transplantées comme le seul, voire le principal, mécanisme d'action (Figure 15). Ainsi il a notamment été découvert que les myoblastes squelettiques transplantés se différencient en fibres musculaires squelettiques et n'expriment pas de gènes spécifiques cardiaques (Reinecke, Poppa, and Murry 2002). De même, la transdifférenciation des cellules de la moelle osseuse en myocytes cardiaques demeure très controversée avec des études soutenant (Orlic et al. 2001; Tomita et al. 1999; Yoon et al. 2005) et réfutant (Balsam et al. 2004; Murry et al. 2004) ce concept. D'autres ont suggéré que la fusion des cellules de la moelle osseuse avec les CM résidents est le mécanisme responsable de leur effet bénéfique (Alvarez-Dolado et al.

2003; Nygren et al. 2004), ce qui a également été réfuté (Kajstura et al. 2005; Rota et al. 2007). La transdifférenciation des cellules CD34⁺ du sang périphérique humain en CM et en cellules musculaires lisses vasculaires demeure aussi controversée (Yeh et al. 2003; Zhang et al. 2004). Bien que les avantages thérapeutiques des CSM aient été attribués à la différenciation vers les lignées cardiaques et vasculaires (Dai et al. 2005; Nagaya et al. 2005; Pittenger 1999; Toma et al. 2002), la plupart des études n'ont pas soutenu ce concept, suggérant plutôt que les principales actions soient d'ordre paracrine (Gnecchi et al. 2008; Hatzistergos et al. 2010; Mazhari and Hare 2007).

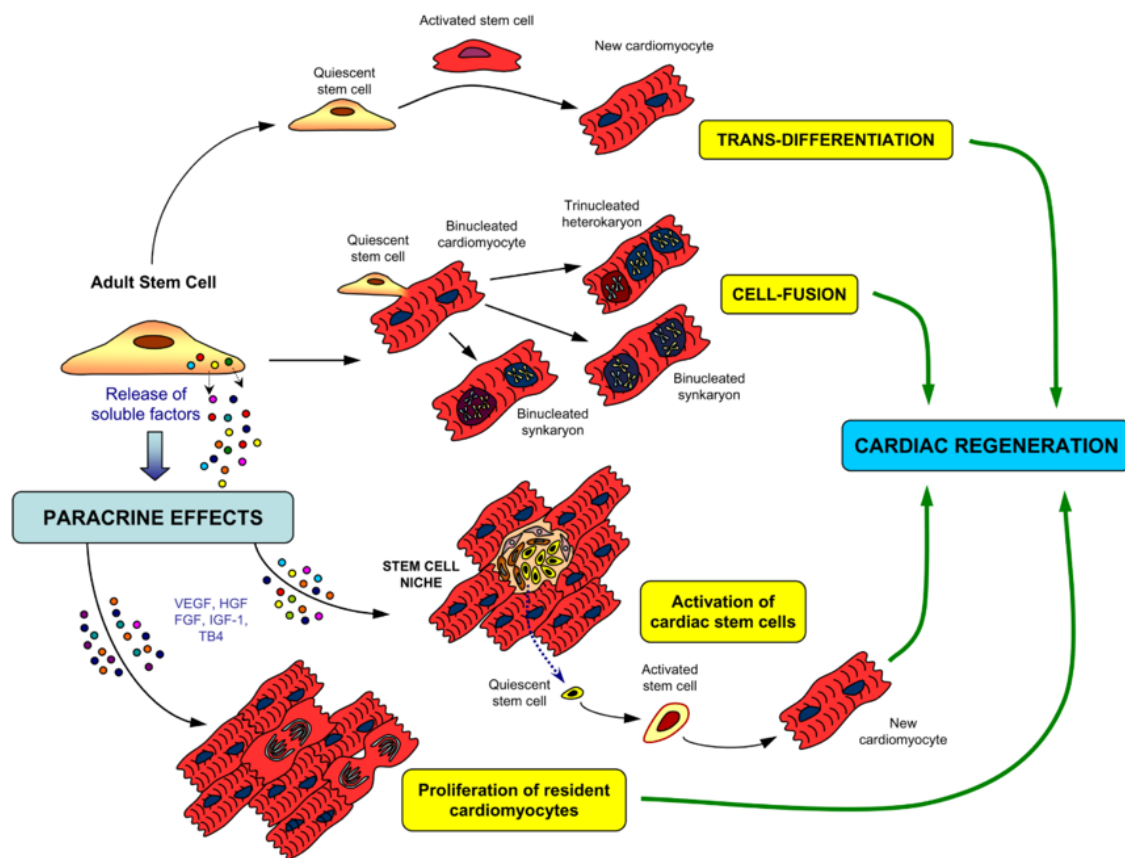


Figure 15 : Mécanismes impliqués dans la régénération cardiaque (Gnecchi et al. 2008).

Une incertitude similaire s'applique aux cellules d'origine cardiaque. Comme nous l'avons vu plus haut, les CSC sont multipotentes, capables de se différencier *in vitro* en myocytes, cellules endothéliales et cellules musculaires lisses vasculaires. Lorsqu'elles sont transplantées dans des cœurs lésés, elles donnent naissance à des cellules vasculaires et à des cellules qui expriment des protéines spécifiques des myocytes (bien que ces cellules soient généralement de petite taille et ne ressemblent pas aux myocytes adultes) (Bolli et al. 2013b; Dawn et al. 2005; Li et al. 2011; Rota et al. 2008; Tang et al. 2010). Dans certaines études, en particulier

dans les modèles d'IDM aigu, l'ampleur du processus de régénération s'est avérée considérable (Beltrami et al. 2003; Leri, Kajstura, and Anversa 2005; Linke et al. 2005; Urbanek et al. 2005). Cependant, dans un modèle d'IC chronique post-MI chez le rat et le porc (Bolli et al. 2013b; Tang et al. 2010), la différenciation des CSC transplantées en myocytes ou en cellules de type myocyte était quantitativement insuffisante pour expliquer l'amélioration de la fonction du VG. Dans le cas des CDC, la différenciation en cellules cardiaques a été signalée comme étant soit un mécanisme d'action mineur (Chimenti et al. 2010), soit inexistante (Malliaras et al. 2012, 2013).

En résumé, une différenciation des cellules transplantées dans la lignée cardiaque peut se produire. Cependant, la question clé est l'ampleur de ce phénomène par rapport au bénéfice fonctionnel. Dans la plupart des études rapportées à ce jour, les améliorations de la fonction semblent disproportionnées par rapport au nombre relativement faible de nouvelles cellules cardiaques formées par la différenciation des cellules transplantées et ne peuvent donc pas être expliquées uniquement par ces dernières.

On a signalé des cas de différenciation de cellules transplantées dans de nouveaux vaisseaux sanguins avec diverses cellules comme par exemple les CSM (Silva et al. 2005), les cellules adipeuses (Cai et al., 2009; Valina et al., 2007), les cellules CD34⁺ (Botta et al., 2004; Wang et al., 2010) et les CSC (Beltrami et al. 2003; Tillmanns et al. 2008). Des études ont conclu que les cellules c-kit⁺ de la moelle osseuse se différenciaient en myocytes et en vaisseaux coronariens indépendamment de la fusion cellulaire (Kajstura et al. 2005; Rota et al. 2007). Expérimentalement, ce phénomène peut être important dans les modèles d'occlusion coronarienne chronique, qui peuvent être associés à la présence d'un myocarde ischémique mais viable (Beltrami et al. 2003; Leri et al. 2005; Linke et al. 2005; Urbanek et al. 2005), mais pas dans les modèles où l'artère qui irrigue le myocarde infarci est reperfusée (Bolli et al. 2013b; Tang et al. 2010). Sur le plan clinique, si la formation de nouveaux vaisseaux peut contribuer à améliorer le rendement cardiaque chez certains patients atteints d'une cardiopathie ischémique, en revanche il est difficile d'imaginer comment cela pourrait se faire dans le cadre d'une cardiomyopathie non ischémique ou chez les patients atteints d'une cardiopathie ischémique qui ne présentent pas de lésions coronariennes limitant le débit (par ex., patients revascularisés).

b) Fusion cellulaire

En 2004, la fusion cellulaire spontanée a été proposée comme mécanisme alternatif par lequel les cellules transplantées de la moelle osseuse produisent une régénération effective dans divers tissus adultes (Balsam et al. 2004; Murry et al. 2004; Nygren et al. 2004) (Figure 15). Ce concept repose sur les travaux d'Alvarez-Dolado et al. (2003), qui ont utilisé une méthode basée sur la recombinaison Cre-Lox pour détecter les événements de fusion des cellules médullaire avec les CM (Alvarez-Dolado et al. 2003). L'utilisation de la recombinaison Cre-Lox comme modèle approprié pour l'étude de la fusion cellulaire a été contestée dans la mesure où la Cre-recombinase non modifiée dans les cellules progénitrices peut traverser la membrane de la cellule réceptrice, imitant ainsi la fusion cellulaire (Will 2002). L'idée que la fusion cellulaire soit un mécanisme important qui sous-tend les effets bénéfiques des CS a perdu de l'appui au cours des dernières années.

c) Stimulation indirecte du remodelage cardiaque par des effets paracrines

i. Généralités

L'incapacité d'expliquer les effets bénéfiques des CS transplantées sur la base de leur différenciation a conduit à l'"hypothèse paracrine", selon laquelle les cellules transplantées induisent une réparation myocardique en libérant des signaux (cytokines, chimiokines, facteurs de croissance, exosomes ou microparticules) dans les tissus environnants qui à leur tour favorisent un certain nombre de processus de restauration, y compris l'activation des CSC endogènes, la néovascularisation, l'inhibition de l'apoptose, l'inhibition de l'hypertrophie et des modifications favorables de la MEC (Gnecchi et al. 2008). Collectivement, ces actions se traduisent par une amélioration de la fonction ventriculaire gauche, de la perfusion et de la réparation myocardique.

ii. La néovascularisation

De nombreuses CS peuvent induire la néovascularisation en sécrétant des chimiokines (facteur-1 dérivé des cellules stromales [SDF-1]) (Askari et al. 2003; Mathieu et al. 2009; Urbich et al. 2005) et des facteurs pro-angiogéniques (facteur de croissance VEGF, facteur de croissance fibroblastique de base [FGF], HGF, IGF-1, facteur de croissance tissulaire- β [TGF- β] et angiopoïétine-1 (Gnecchi et al. 2006; Kinnaird et al. 2004; Nagaya et al. 2005; Shintani et al. 2009) (Figure 16). Les EPC recrutées dans la zone ischémique peuvent également sécréter les

isoformes endothéliaux et inductibles de l'oxyde nitrique synthase (eNOS et iNOS) et favoriser la prolifération des cellules endothéliales (Jujo, Li, and Losordo 2008). La néovascularisation résultante pourrait améliorer l'approvisionnement sanguin des cellules viables qui demeurent dans la région infarctée et donc améliorer la fonction cardiaque dans les cas d'occlusion coronarienne chronique; toutefois, comme mentionné précédemment, ce mécanisme ne permettrait pas d'améliorer la fonction dans les modèles expérimentaux d'infarctus reperfusé, qui ne présentent aucune ischémie résiduelle, ou dans les patients sans ischémie persistante.

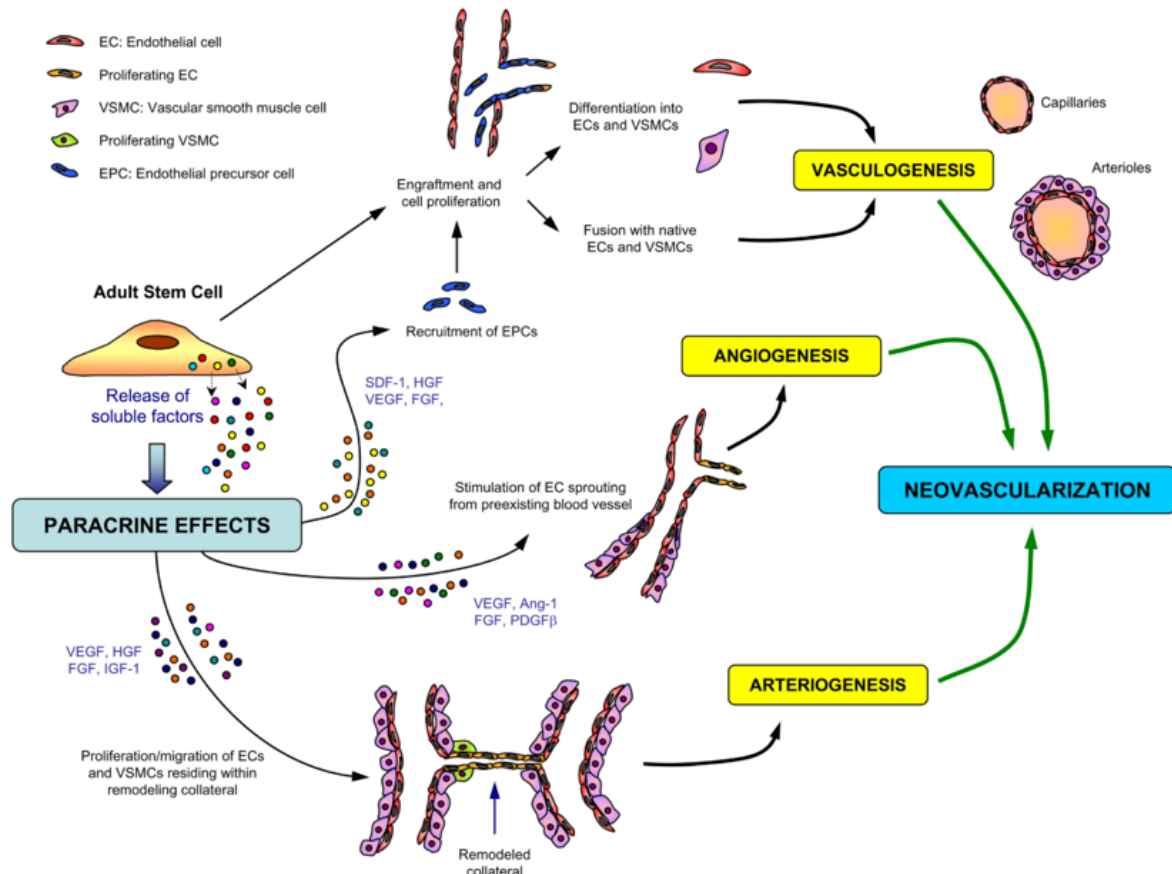


Figure 16 : Mécanismes impliqués dans la néovascularisation (Gnecchi et al. 2008).

iii. « régénération cardiaque »

Pendant longtemps, le cœur a été considéré comme un organe post-mitotique. Cependant, des recherches récentes réalisées chez des rongeurs et l'Homme, ont démontré la capacité de cet organe à générer de nouveaux CM tout au long de la vie (entre 0,5 et 1% par an chez un homme adulte). Toutefois ceux-ci sont issus de CM préexistants et non de progéniteurs résiduels. Ainsi, bien que limitée, l'existence d'un renouvellement continu des CM supporte le développement de stratégies thérapeutiques qui viseraient à stimuler ce processus (Noseda, Abreu-Paiva, and Schneider 2015).

Dans l'étude de Tang et coll. (Tang et al. 2010) dans un modèle d'ondes décamétriques chroniques chez le rat, on a constaté que la perfusion de CSC exogènes favorisait la prolifération de CSC endogènes dans les régions infarctées et non infarctées, suggérant l'activation du pool endogène de CSC par un mécanisme paracrine (Figure 15). On sait que les CSC sécrètent des facteurs de croissance (comme le facteur de croissance des hépatocytes [HGF] et le facteur de croissance de l'insuline 1 [IGF-1]) qui stimulent les autres CSC à migrer à travers l'interstitium du myocarde, à proliférer et à se différencier en myocytes et structures vasculaires (Hatzistergos et al. 2010; Rota et al. 2008). L'activation des CSC endogènes a également été suggérée comme étant un mécanisme important sous-jacent aux effets bénéfiques d'autres types de cellules tels que les CSM (Hatzistergos et al. 2010).

De plus, les facteurs de croissance sont des molécules de signalisation qui contribuent à de multiples processus cellulaires. Le facteur de croissance neureguline 1 (NRG1) et ses récepteurs, les récepteurs tyrosine-protéine kinase ERBB2 et ERBB4, jouent un rôle essentiel dans la trabéculatation et la formation du coussin endocardique pendant le développement cardiaque (Gassmann et al. 1995). L'activation de la voie de signalisation NRG1-ERBB2/ERBB4 dans le cœur infarcté de la souris adulte induit une prolifération de CM et améliore la fonction cardiaque (Bersell et al. 2009; D'Uva et al. 2015).

Dans un essai clinique mené chez des patients atteints d'IC, l'administration systémique de NRG1 recombinant humain a permis d'éviter le remodelage cardiaque comme le montre la diminution du volume télé-diastolique et du volume télé-systolique par rapport au placebo (Gao et al. 2010). Cependant, l'effet prolifératif de NRG1 dans les CM *in vivo* a été contesté sur la base des résultats sur un modèle murin d'IDM dans lequel le traitement NRG1 n'a pas augmenté la synthèse d'ADN cardiomyocytaire. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour expliquer et confirmer ce résultat bénéfique.

Comme les facteurs de croissance, les miARN sont impliqués dans la réparation cardiaque. Ils sont de petits ARN monocaténaux hautement conservés et non codants qui régulent l'expression génique post-transcriptionnelle en se fixant à des séquences complémentaires d'ARNm (Bartel 2009). Les miARN individuels interfèrent avec de multiples ARNm cibles, contrôlant ainsi une variété de processus biologiques, y compris le développement et les pathologies cardiaques (Liu and Olson 2010; Van Rooij and Olson 2012) (Figure 17).

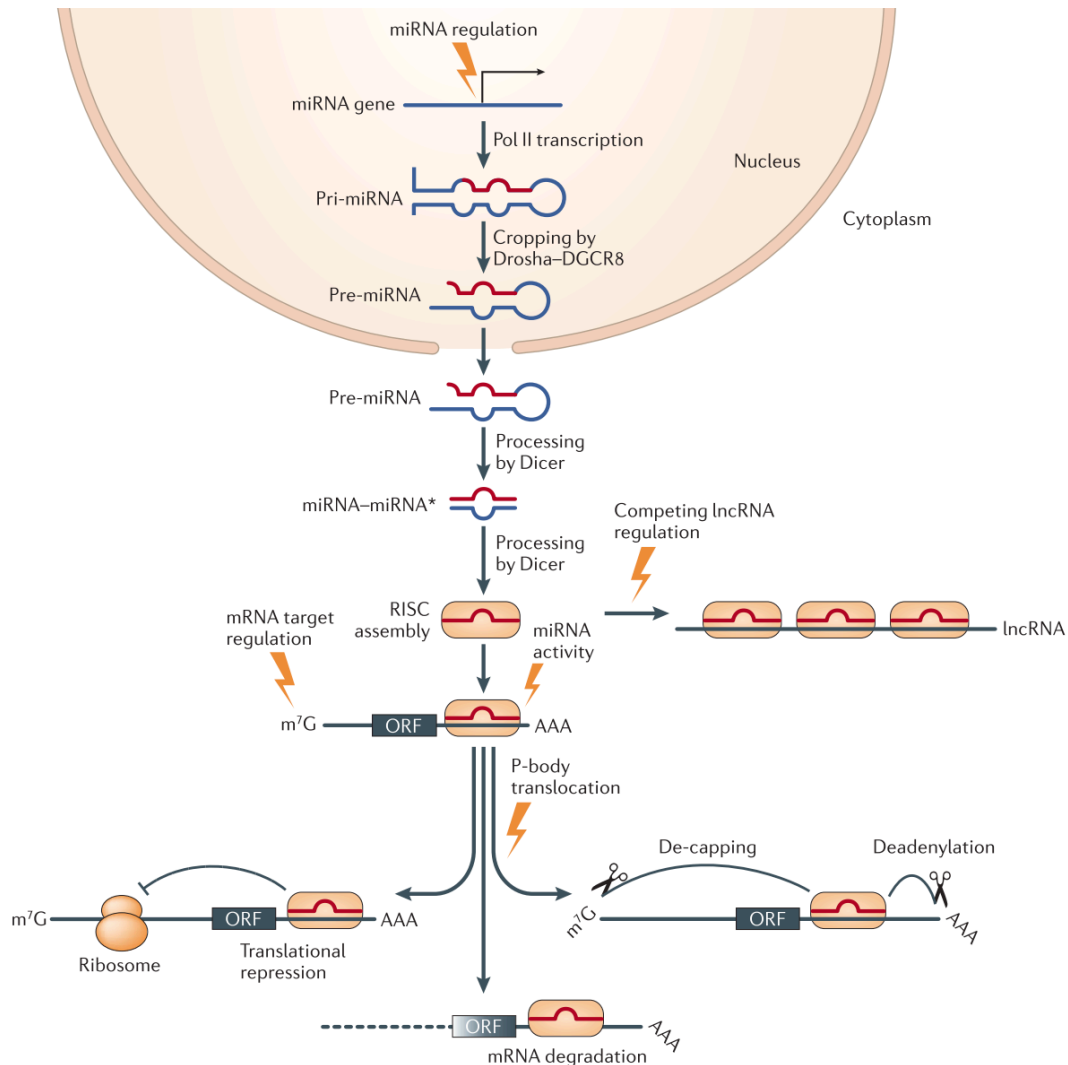


Figure 17 : Biogenèse et mécanisme d'action des miARN (Van Rooij and Olson 2012).

Ainsi, il a été mis en évidence que les membres de la famille de miR-15 contrôlaient l'arrêt mitotique post-natal chez la souris (Porrello et al. 2013) (Tableau V). La surexpression cardiaque du miR-195, un membre de la famille miR-15, provoque un arrêt prématuré du cycle cellulaire des CM. De plus, l'inhibition des membres de cette famille par des ARN synthétiques modifiés induit une prolifération des CM *in vivo* et une amélioration de la fonction cardiaque dans le cœur ischémié de souris adultes (Porrello et al. 2011). D'autres études ont identifié des miARN qui activent la réplication de l'ADN dans les CM. Un dépistage non biaisé utilisant une bibliothèque de 875 miARN humains a permis de détecter plusieurs miARN qui favorisent la prolifération de CM de rat nouveau-né (Eulalio et al. 2012). Parmi ces miARN, la surexpression cardiaque du miR-199a ou du miR-590 *in vivo* a induit une prolifération des CM post-natals et adultes, une amélioration de la fonction cardiaque et une diminution de la

fibrose dans le cœur infarci de souris adultes. D'autres miARN tels que le miR-17-92, miR-214, miR-302-367, et miR-222 ont contribué à la réparation cardiaque *in vivo* dans des modèles animaux (Aurora et al. 2012; Chen et al. 2013; Liu et al. 2015; Tian et al. 2015). L'ensemble de ces résultats obtenus dans des études précliniques démontrent un potentiel thérapeutique des miARN. Cependant, les leçons tirées des essais cliniques de thérapies régénératives basées sur des facteurs de croissance nous amènent à considérer un défi majeur pour l'application clinique des approches développées à partir de miARN à savoir comment les miARN peuvent-ils être délivrés efficacement sur le site cible ? Comme pour les études sur les facteurs de croissance, l'utilisation d'un patch semble être bénéfique pour l'administration locale continue de miARN. Par exemple, il est rapporté que le miR-302 favorise la prolifération des myocytes cardiaques en inhibant les composants de signalisation Hippo99. L'utilisation d'un hydrogel pour délivrer ce miARN a permis sa libération progressive et soutenue dans le cœur infarci de souris et a entraîné une prolifération continue des CM et amélioré la fonction cardiaque (Wang et al. 2017).

Tableau V : miRNA cardiaques impliqués dans la réparation cardiovasculaire

miRNA	Indication	Chemistry	Therapeutic effect
miR-15 family	Post-MI remodelling	Tiny LNA	Reduces infarct size by increasing the number of viable myocytes after ischaemic injury, resulting in improved cardiac function
miR-15 family	Cardiac regeneration	LNA–DNA mixmer	Increases the number of mitotic cardiomyocytes
miR-21	Cardiac fibrosis	Antagomir	Inhibits and reverses cardiac fibrosis, leading to enhanced cardiac function in response to pressure overload
miR-23 and miR-27	Retinal angiogenesis	LNA–DNA mixmer	Represses neovascularization in the choroid in response to laser injury
miR-24	Post-MI remodelling	Antagomir	Reduces infarct size by increasing capillary density, resulting in improved cardiac function after MI
miR-33	Atherosclerosis	LNA–DNA mixmer	Increases plasma HDL in mice
miR-33	Atherosclerosis	2'-F–2'-MOE mixmer	Increases plasma HDL and decreases VLDL in non-human primates on a high-fat diet
miR-29	Aneurysms	LNA–DNA mixmer	Increases collagen expression, resulting in a significant reduction in vascular dilation and aneurysm progression
miR-92a	Neoangiogenesis	Antagomir	Enhances blood vessel growth and functional improvement of damaged tissue in models of hindlimb ischaemia and MI
miR-145	Pulmonary hypertension	LNA–DNA mixmer	Reduces systolic right ventricular pressure during pulmonary hypertension
miR-155	Viral myocarditis	LNA–DNA mixmer	Lowers myocardial damage and increases survival in response to viral myocarditis
miR-199b	Cardiac hypertrophy	Antagomir	Inhibits cardiomyocyte hypertrophy and fibrosis, resulting in improved cardiac function in different models of heart disease
miR-208a	Pathological cardiac remodelling	LNA–DNA mixmer	Blocks cardiac remodelling and improves cardiac function and survival in hypertension-induced heart failure
miR-208a	Metabolic disease	LNA–DNA mixmer	Reduces weight gain and improves glucose handling and plasma lipid levels in response to a high-fat diet
miR-320	Post-MI remodelling	Antagomir	Reduces infarct size in response to ischaemic injury

iv. Effet cardioprotecteur

Un certain nombre d'études suggèrent que les facteurs paracrines (comme l'IGF-1) libérés par les CS après transplantation inhibent la mort des CM par apoptose (Nagaya et al. 2005). Par ailleurs, les données *in vitro* et *in vivo* acquises dans les modèles d'IDM aigu suggèrent que la surexpression d'Akt par les CSM diminue l'apoptose cardiomyocytaire (Gnecchi et al. 2006, 2008). Enfin, la transplantation combinée de myoblastes squelettiques et de cellules AC133⁺ améliore également la fonction cardiaque en réduisant l'apoptose myocardique (Bonaros et al. 2006).

v. *Remodelage de la matrice extracellulaire*

Les CS peuvent moduler divers constituants de la MEC, limitant ainsi l'expansion de l'infarctus, le remodelage du VG et la fibrose myocardique. Il a, par exemple, été mis en évidence que les myoblastes squelettiques préservent l'architecture matricielle du collagène (Farahmand et al. 2008), réduisent la fibrose dans les régions proches et éloignées de l'infarctus (Fukushima et al. 2008) et modulent les niveaux de MMP-2 et de TIMP-4, ce qui suggère un effet favorable sur le remodelage de la MEC. L'importance de ces modifications de la MEC dans les mécanismes de réparation dépendant des CSC est mise en évidence dans plusieurs études montrant notamment que les CSC augmentaient les niveaux de MMP-2, MMP-9 et MMP-14 et diminuaient ceux de TIMP-4 dans un modèle rat IC post-IDM (Rota et al., 2008).

Inhibition de l'hypertrophie.

L'administration de CS dans des modèles d'IC est associée à une réduction de la réponse hypertrophique des myocytes survivants (Farahmand et al. 2008; Liu et al. 2008; Rota et al. 2008; Tang et al. 2010; Tomita et al. 1999). On ne sait toutefois pas s'il s'agit d'une action primaire des cellules transplantées ou d'une action secondaire à l'amélioration de la performance cardiaque.

L'une des explications possibles des effets variables obtenus selon les études est la quantité insuffisante/limitée de facteur thérapeutique disponible au niveau de la lésion. Cette faible disponibilité pourrait être due à une administration inefficace des facteurs de croissance thérapeutiques et/ou à une courte demi-vie des facteurs de croissance. Une voie d'amélioration de l'exposition du cœur lésé aux facteurs de croissance thérapeutiques, comme évoqué précédemment, serait l'utilisation de biomatériaux permettant une libération soutenue des facteurs vers les sites cibles. Par exemple, dans un modèle d'IDM chez le porc, le chargement de microparticules de NRG1 et de facteur de croissance des fibroblastes 1 (FGF1) dans des microparticules a permis une libération locale soutenue des facteurs thérapeutiques, ce qui a amélioré la fonction ventriculaire gauche associée à une angiogenèse accrue et à un remodelage ventriculaire réduit (Garbayo et al. 2016). Les différentes techniques développées afin d'optimiser les effets thérapeutiques seront abordés ultérieurement.

4. Défis actuels, questions non résolues et orientations futures

De nombreux défis depuis le choix de la cellule candidate jusqu'à l'optimisation des techniques de transplantation restent encore à surmonter en thérapie cellulaire pour les pathologies cardiaques (Figure 18). Ces différents points seront développés dans le paragraphe suivant.

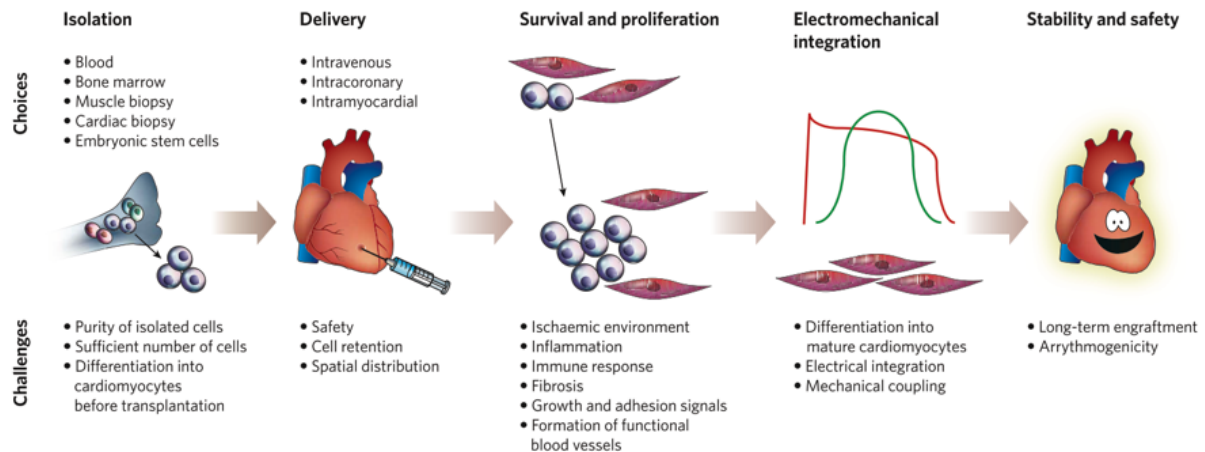


Figure 18 : Défis actuels de la thérapie cellulaire pour les pathologies cardiaques (Perin and Silva 2004)

a) Candidat cellulaire

On ne sait pas, parmi les nombreux types cellulaires (CS ou progénitrices) étudiés à ce jour, lequel est le plus efficace dans un contexte physiopathologique donné. Malgré l'importance évidente de cette question, très peu d'études ont comparé directement différents candidats en terme de potentiel thérapeutique (T. S. Li et al. 2012; Mathieu et al. 2009; Mazo et al. 2010; Shintani et al. 2009). De telles études, non réalisées à ce jour, sont difficiles puisqu'elles exigent qu'au préalable les relations dose-réponse pour chaque type cellulaire soient définies et comparées (la simple comparaison d'une dose de cellules serait insuffisante). Par exemple, l'allégation selon laquelle les CDC seraient " supérieures " aux CSC est controversée dans la mesure où elle repose sur l'utilisation d'une dose unique de cellules (T. S. Li et al. 2012).

Une question connexe et non résolue est de savoir si des combinaisons de différents candidats cellulaires pourraient être plus efficaces qu'un seul type de cellules. Des considérations théoriques, ainsi que des études précliniques sur les BMMNC, les myoblastes (Bonaros et al. 2006; Memon et al. 2005; Ott et al. 2004), les CSM et les CSC (Williams et al. 2013), suggèrent

que la première approche peut offrir des avantages, car les actions des différentes cellules pourraient être complémentaires voire même synergiques (Williams et al. 2013).

b) Dose cellulaire

Il est une évidence que les doses de cellules injectées ont énormément varié selon les différents essais concernant l'IC. Bien qu'il semble évident que les effets de la thérapie cellulaire dépendent du nombre de cellules injectées, la relation effet-dose en fonction des différents candidats cellulaires est encore peu connue pour la plupart. Au niveau clinique, seulement deux études se sont intéressées au lien dose-effet(s) des CS. Dans l'essai MAGIC, une dose élevée (8×10^6) de myoblastes squelettiques était plus efficace pour diminuer le volume VG et atténuer le remodelage du VG qu'une faible dose (4×10^6), bien qu'aucune de ces deux doses ne conduisent à une amélioration de la fonction ventriculaire gauche (Menasché et al. 2008). Dans le second essai, l'essai POSEIDON, une comparaison de 3 doses de CSM autologues ou allogéniques (20, 100 et 200×10^6 cellules) a été réalisée chez des patients atteints de cardiomyopathie ischémique. Il a été démontré un effet favorable des différentes doses sur la capacité fonctionnelle du patient, sa qualité de vie et le remodelage ventriculaire bien que la dose la plus élevée de 200×10^6 cellules ait eu un effet moins important que la plus faible. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus dans un modèle de cardiomyopathie ischémique chez le cochon qui avaient mis en évidence un impact bénéfique des deux doses de CSM injectées (20 et 200×10^6 cellules) sur la fonction régionale mais avec un bénéfice supérieur de la dose élevée sur le remodelage néfaste du VG. Afin de compléter ces données, un essai de phase II a été mis en place avec l'injection de doses croissantes de précurseurs mésenchymateux allogéniques (25, 75 et 150×10^6 cellules) (REVASCOR NCT00721045) chez des patients atteints d'IC. Suite à l'injection endomyocardique des cellules, la dose la plus élevée a conduit à l'impact le plus important sur le remodelage et la capacité fonctionnelle du VG. Des études similaires seraient nécessaires pour les autres candidats cellulaires.

c) Voie d'administration

Comme c'est le cas pour le type et la dose cellulaire optimale, la technique la plus efficace afin de délivrer les cellules à la zone infarctée est encore inconnue. Les principales voies utilisées à ce jour sont l'injection directe dans la paroi ventriculaire gauche (transendocardique ou

transépicaudique) et la perfusion intracoronaire (Figure 19). L'injection transépicaudique, qui est pratiquée pendant la chirurgie cardiaque (Dib et al. 2005; Menasché et al. 2008), offre une visualisation directe des régions cicatrisées, mais est limitée par les exigences de la chirurgie. Avec l'injection transendocardique, les cellules peuvent être délivrées directement dans la paroi ventriculaire gauche en utilisant un cathéter d'injection avancé à travers la valve aortique et placé contre la surface endocardique. Les avantages de cette technique par rapport à la perfusion intracoronaire sont les suivants : i) la cartographie électromécanique de la surface endocardique avec un système NOGA peut être utilisée pour tracer le myocarde viable, ischémié et marqué, permettant ainsi une injection ciblée des cellules dans la cicatrice ou dans la zone limite, et ii) les cellules peuvent être délivrées dans une région marquée même si l'artère coronaire qui les fournit est totalement occlue. En raison de ces avantages, l'injection transendocardique a été largement utilisée dans le domaine clinique (Beeres et al. 2007; Dib et al. 2009; Duckers et al. 2011; Ince et al. 2004; Perin et al. 2003, 2004, 2011; Povsic et al. 2011; Smits et al. 2003; Veltman et al. 2008). Cependant, les injections intramyocardiques peuvent perturber l'architecture des tissus et créer des amas de cellules qui manquent d'apport sanguin adéquat, entraînant la mort cellulaire. De plus, la distribution des cellules dans la région infarctée est habituellement non homogène (Li et al. 2011; Tongers, Losordo, and Landmesser 2011).

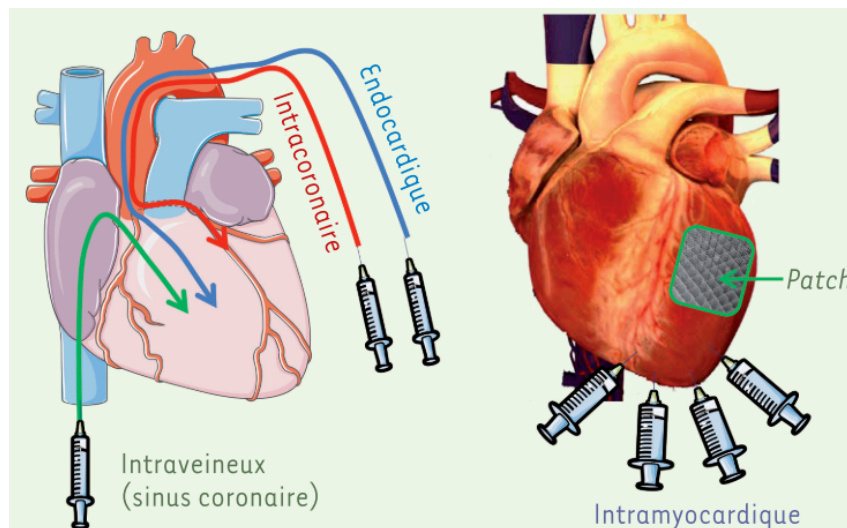


Figure 19 : Différentes voies d'injection des cellules (Vilquin and Etienne 2016).

L'injection intracoronarienne implique la perfusion de cellules dans une artère coronaire, habituellement au cours d'une brève occlusion coronaire produite par le gonflement d'un ballon à l'extrémité du cathéter. Ce bref arrêt du flux va empêcher le " lessivage/washout "

rapide des cellules et faciliter leur extravasation dans l'interstitium. Comparativement à l'injection transendocardique, l'injection intracoronarienne présente plusieurs avantages : i) elle permet une distribution beaucoup plus uniforme des cellules dans la région infarctée, ii) elle ne nécessite pas de formation ou l'achat d'équipements spécialisés et iii) elle est techniquement plus facile et donc plus aisée à utiliser dans la pratique clinique. La distribution généralisée des cellules dans le lit vasculaire infusé a aussi l'avantage théorique de permettre leur migration en réponse aux signaux locaux. Cependant, l'administration intracoronarienne présente aussi certains inconvénients par rapport à l'injection transendocardique : i) la rétention immédiate des cellules est plus faible (George et al. 2008; Mitchell et al. 2010) ($2.6 \pm 0.3\%$ après une perfusion intracoronarienne comparativement à $11 \pm 3\%$ après une injection intramyocardique (Hou et al. 2005)), probablement en raison d'un maintien des cellules dans le flux, ii) une occlusion microvasculaire peut se produire lorsque des cellules de taille importante, comme les CSM ($10\text{-}20 \mu\text{m}$) (Freyman et al. 2006; Vulliet et al. 2004), les myoblastes squelettiques ($\sim 20 \mu\text{m}$) (Suzuki et al. 2000) et les CDC ($\sim 21 \mu\text{m}$) (Johnston et al. 2009; Li et al. 2010; Messina et al. 2004) sont perfusées (ce problème ne se rencontre pas avec des cellules de plus petit diamètre, comme les CSC et les BMMNCs), et iii) l'administration de cellules à une région du myocarde alimentée par une artère occlusale n'est pas possible. Jusqu'à présent, relativement peu d'études ont comparé différentes voies d'administration cellulaire avec des résultats contradictoires (Ang et al. 2008; Freyman et al. 2006; Fukushima et al. 2008; Juan José Gavira et al. 2006; George et al. 2008; Hong et al. 2014; Li et al. 2011; Van der Spoel et al. 2012; Vela et al. 2009). Des études comparant les voies d'administration intracoronaire et transendocardique chez des modèles animaux de grande taille utilisant une gamme de doses de cellules sont nécessaires pour répondre à cette question.

d) Fréquence d'administration

Il n'y a aucune raison a priori d'affirmer que les effets consécutifs à une administration unique ne peuvent être potentialisés par des administrations répétées. La plupart des CS peuvent être congelées, stockées et réutilisées ultérieurement. Par conséquent, il est étonnant que presque toutes les études réalisées jusqu'à présent aient utilisé une mono-injection de cellules pour déterminer un potentiel thérapeutique dans un contexte d'IC. Cela reviendrait à déterminer l'effet d'un antibiotique sur une maladie infectieuse en ne donnant qu'une seule dose. L'absence d'études évaluant les injections cellulaires répétées est d'autant plus

troublante si l'on considère qu'il existe des preuves suggérant une relation dose-réponse entre le nombre de cellules injectées et le bénéfice fonctionnel (Menasché et al. 2008; Schuleri et al. 2009).

Les quelques données disponibles supportent le concept selon lequel des injections répétées de cellules seraient plus efficaces qu'une injection unique. Dans des modèles animaux d'IDM/IC, les injections répétées de myoblastes squelettiques étaient plus efficaces que les injections uniques pour augmenter la FEVG (Juan José Gavira et al. 2006; Premaratne et al. 2006) et la vasculogénèse et pour diminuer la fibrose (Gavira et al. 2010). De toute évidence, d'autres études sont nécessaires pour déterminer la relation entre le nombre et la fréquence des cellules administrées et leurs effets sur la fonction cardiaque.

Les différents points abordés jusque-là doivent être étudiés de façon plus approfondie. En effet, il est peu probable que l'application clinique optimale en thérapie cellulaire cardiaque soit atteinte tant que nous n'aurons pas une réponse à ces questions.

e) Limites liées à l'amplification *ex vivo*

Considérée comme une manipulation substantielle, l'étape d'amplification *ex vivo* est nécessaire pour la majorité des applications cliniques pour lesquelles la transplantation de cellules fraîchement extraites n'est pas envisageable eu égard aux trop faibles quantités initiales de cellules par rapport aux doses thérapeutiques nécessaires. Cette limite sera d'autant plus présente que le candidat cellulaire aura un faible potentiel de prolifération comme par exemple les CSC.

f) Greffe (rétention et survie)

Les études sur les CS ont toujours montré de très faibles taux de greffes à long terme : quel que soit le candidat, la dose et le mode d'administration, plus de 90% des cellules injectées disparaissent dans les premiers jours et moins de 2% peuvent encore être retrouvées 4 semaines après la transplantation (Hong et al. 2013; Zeng et al. 2007). Cette perte massive de cellules est le résultat de deux principaux événements (Figure 20). Pendant ou immédiatement après l'injection, une perte significative est due à l'absence d'extravasation des cellules (perfusion intracoronarienne) ou à du reflux consécutif aux injections transépicaire / transendocardique couplé à un retrait par le système veineux (injection intramyocardique). Par exemple, dans la phase aiguë de l'IDM, seulement environ 10% des

CSC (Hong et al. 2013) et moins de 10% des CSM (Tang et al. 2005) ont été retrouvés dans le myocarde 24 heures après l'injection intramyocardique chez la souris et seulement 2 à 5% des BMMNC quelques heures après une perfusion intracoronarienne chez l'Homme (Hofmann et al. 2005).

Au cours des premières semaines suivant la transplantation, la plupart des cellules initialement conservées meurent consécutivement à l'ischémie causée par une mauvaise vascularisation de la région injectée, de l'inflammation accompagnée de stress oxydatif et du relargage de cytokines cytotoxiques, de la destruction immunitaire des cellules allogéniques et de l'apoptose due à un défaut d'interaction entre la cellule et la MEC (anoïkose).

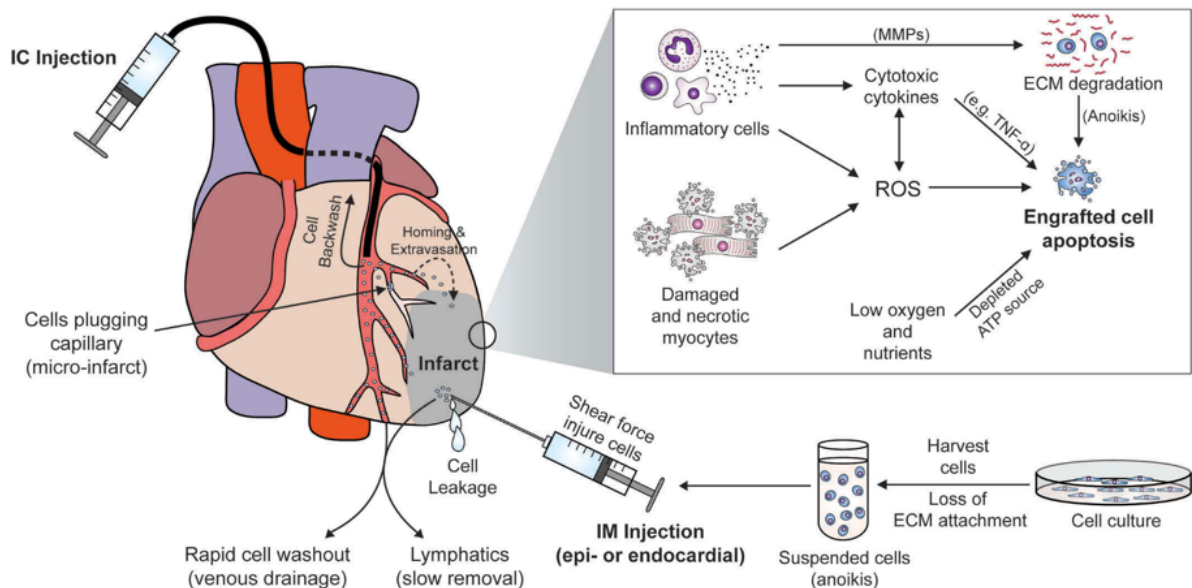


Figure 20 : Mécanismes cellulaires limitant la rétention et la survie des cellules in situ (Kanda and Davis 2017).

Il est clair que la perte massive de cellules transplantées est un problème majeur qui limite l'efficacité de tout type de thérapie cellulaire. Il est donc important d'améliorer le repérage, la survie et la greffe des cellules dans l'environnement ischémique hôte pour optimiser les bienfaits thérapeutiques. Plusieurs stratégies sont actuellement à l'étude, notamment le prétraitement du tissu cible, le prétraitement *ex vivo* des cellules par modifications génétiques, le préconditionnement physique ou pharmacologique et l'implantation de cellules incluses dans des échafaudages en matrice biocompatible (Penn and Mangi 2008). Ces différents points seront abordés ultérieurement.

g) Notion de greffe autologue *versus* allogénique

La thérapie allogénique est clairement un concept perturbant en biologie. Le dogme immunologique standard veut que tout tissu étranger provoque une réaction immunitaire. Ce concept est clairement mis en évidence dans les transplantations d'organes solides et hématopoïétiques, où l'immunosuppression agressive est la norme pour protéger les allogreffes du rejet. Au fur et à mesure que le domaine de la thérapie cellulaire évolue, il est devenu évident que divers types cellulaires comme les CSM ont une capacité pour échapper au système immunitaire dans la mesure où elles peuvent être utilisées comme allogreffes sans nécessiter une immunosuppression simultanée (Karantalis et al. 2015).

Une revue systématique et une méta-analyse de la thérapie cellulaire dans des modèles grands animaux ont conclu que les effets de la thérapie cellulaire autologue et allogénique pour l'IDM et l'IC étaient similaires, indépendamment du traitement immunosuppresseur, avec une perte cellulaire similaire et des mécanismes d'action principalement paracrine dans les diverses études rapportées.

De plus, l'utilisation de cellules allogéniques est préférable aux cellules autologues car elles ne sont pas exposées aux facteurs de risque des patients (âge, diabète, tabagisme), connus pour diminuer le potentiel des CS autologues. En sus, une thérapie allogénique permet d'envisager une utilisation à grande échelle : logistique rationalisée, cohérence et disponibilité immédiate du produit et en quantité suffisante (Figure 21). Cependant, les cellules allogéniques induisent toujours une réponse immunitaire mais qui peut être modulée par des suppresseurs des lymphocytes T, notamment les inhibiteurs de la calcineurine (la cyclosporine et le tacrolimus sont couramment utilisés) et les corticoïdes. Le traitement immunosuppresseur est associé à un certain nombre d'effets indésirables, incluant l'hypertension due à des lésions rénales, des lésions hépatiques, un risque accru d'infections et, si utilisé à long terme, des tumeurs malignes (Madonna et al. 2019). Il s'agit des mêmes risques auxquels sont exposés les patients subissant une transplantation cardiaque. Une autre stratégie pour éviter la nécessité d'une immunosuppression à long terme est la modulation du système immunitaire inné. Un article récent a démontré la faisabilité de promouvoir l'acceptation à long terme des transplants en inhibant l'activation des macrophages par des nanothérapies (Braza et al. 2018).

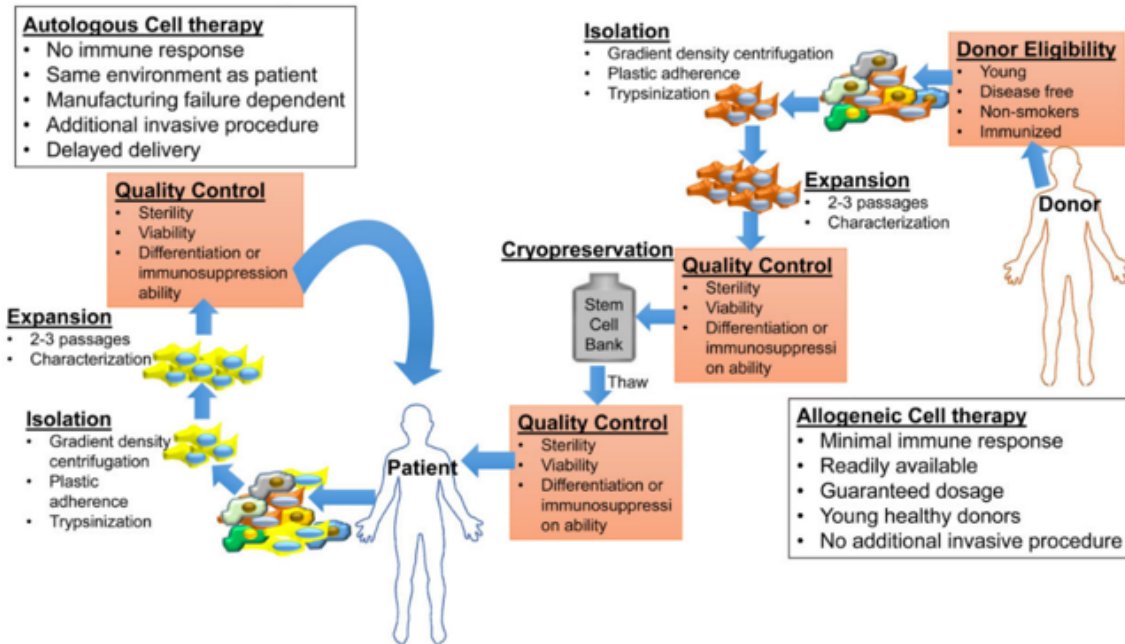


Figure 21: Comparaison de la thérapie cellulaire autologue et allogénique (Karantalis et al. 2015)

h) Tumorigénicité

Le risque de tumorigénicité est une préoccupation majeure pour les CS pluripotentes (comme les CSE et les iPSC) (Andrews et al. 2005; Heslop et al. 2015). Cependant, ce risque est moins préoccupant lorsque l'on utilise des CSA. Seuls quelques cas de formation de tumeurs à partir de CSA ont été signalés (Heslop et al. 2015). Néanmoins, ce risque ne doit jamais être négligé.

5. Optimisation

Aujourd'hui, de nombreuses stratégies sont développées dans le but d'améliorer la rétention des cellules et leur survie comme le prétraitement du tissu hôte avant l'administration des cellules ou des cellules elles-mêmes *ex vivo* par des modifications génétiques ou par pré-conditionnement physique ou pharmacologique ou encore l'implantation de biomatériaux biocompatibles (Figure 22).

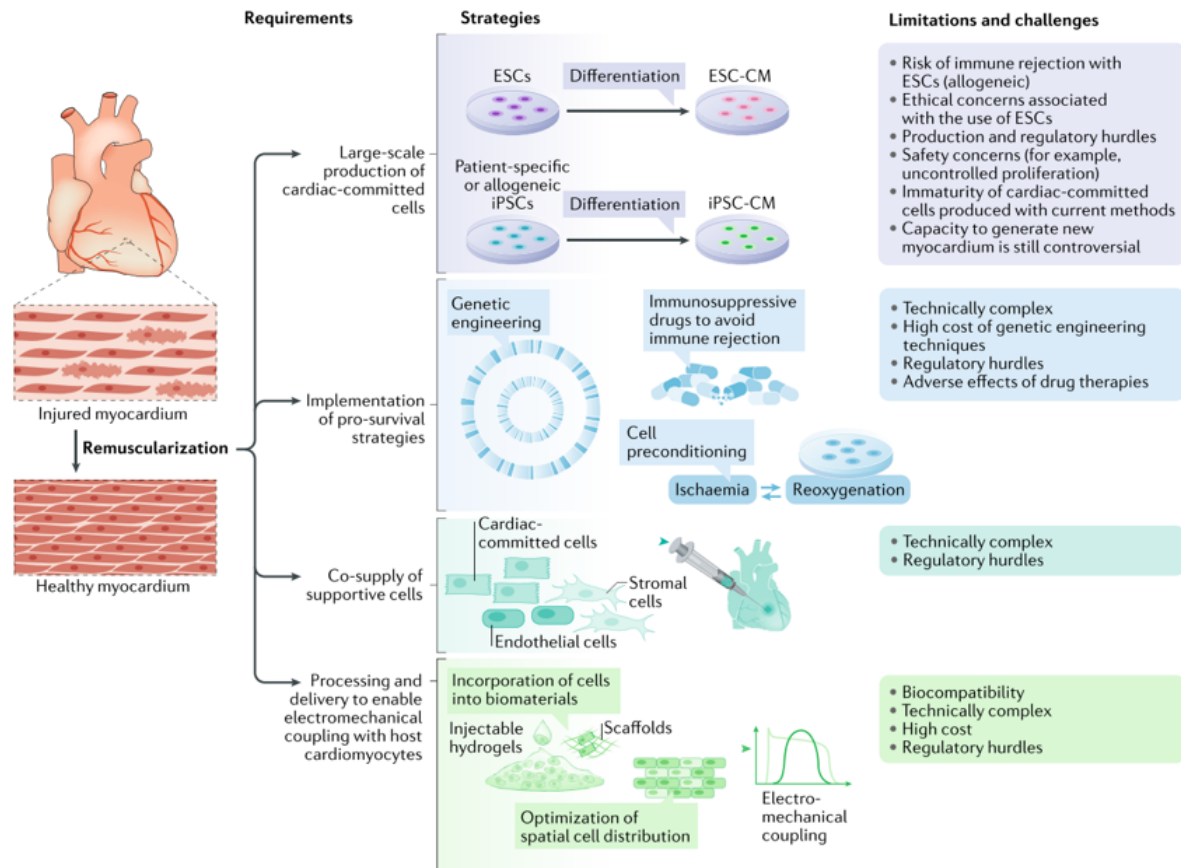


Figure 22 : Stratégies d'optimisation de la thérapie cellulaire cardiaque (Menasché 2018).

a) Engagement dans la lignée cardiaque

Le concept de prétraiter ou de modifier les CS ou progénitrices avant leur application ("amorçage") et ainsi améliorer leur puissance thérapeutique a évolué suite aux résultats précliniques et cliniques obtenus. Les outils potentiels de modification comprennent les médicaments, les petites molécules, les plasmides nus et vectoriels et la reprogrammation épigénétique.

L'importance de promouvoir l'engagement de lignée des cellules transplantées est illustrée par l'essai C-CURE, dans lequel la spécification de lignée des CSM a été obtenue en les exposant à un cocktail cardiogénique qui a déclenché l'expression et la translocation nucléaire des facteurs de transcription cardiaque ; dans cette étude, il a été démontré que l'administration de cellules cardiopoïétiques mésenchymateuses issues de moelle osseuse autologues provoque un remodelage du VG favorable et améliore la fonction cardiaque chez des patients avec IC ischémique (Bartunek et al. 2013).

Avant cet essai, plusieurs cytokines, facteurs de croissance et petites molécules ont démontré leur capacité à favoriser la différenciation cardiaque (Tableau VI et Tableau VII). Les membres de la famille du TGF- β (TGF- β 1, BMP-2 et BMP-4) ont été parmi les premiers utilisés pour augmenter la différenciation des cellules souches embryonnaires et fœtales en CM (Tableau VI). Le FGF et l'IGF-1 contribuent également à la différenciation cardiaque des CSE et le traitement des cellules ou des tissus cibles avec le FGF-2, IGF-1, ou une combinaison de facteurs de croissance (FGF-2, IGF-1, et BMP-2) a amélioré la fonction cardiaque dans les modèles animaux. Il est cependant important de noter que ces facteurs de croissance présentent un large éventail de fonctions dont une activité antiapoptotique et des effets pro-angiogéniques ; ainsi, il est difficile d'évaluer dans quelle mesure l'induction de la différenciation cardiaque contribue aux bienfaits thérapeutiques. Les Wnts constituent une autre famille de facteurs de croissance qui régulent la cardiopoïèse (Tableau VI).

Tableau VI : Cytokines et facteurs de croissance impliqués dans la différenciation cardiaque (Chavakis, Koyanagi, and Dimmeler 2010)

Pathway	Specific Factor	Cell Type	Method	Contraction (or Electrophysiology)	Reference
TGF- β and BMP family	TGF- β 1	BM c-kit ⁺ cells	Single culture	Not performed	90
	TGF- β 1	Adipose MSC	Single culture	Not performed	91
	BMP-2	mES	Coculture (END-2)	Yes	92
	BMP-4	Monkey ES	EB	Yes	94
	BMP cocktail (including BMP-2 and BMP-4)	P19CL6	DMSO-induced differentiation	Yes	93
	BMP-4+activin A	hES	Single culture	Not mentioned	95
	BMP-4+activin A	mIPS	Single culture	Yes	96
BMP inhibition	Noggin	mES	EB	Yes	97
FGF	FGF2	Sca-1 ⁺ cardiac progenitor	Single culture	Yes	98
Wnts	Wnt-1	mES	Coculture (OP9)	Yes	99
	Wnt-3a (biphasic effect)	mES	EB	Yes	100
	Wnt-11	EPC	Coculture (CM)	Not performed	101
	Wnt-11	BMC	Single culture*	Not performed	102
	Wnt-5a	Adipose Sca1 ⁺ /ckit ⁺ MSVC	Single culture	Yes	103
Wnt-5a	EPC	Coculture (CM)	Not performed	104	
Wnt inhibitors	Chibby	mES	EB	Yes	105
	IGFBP4 (canonical Wnt inhibition)	P19CL6	Single culture	Not performed	106
	MesP1	mES	Single culture	Yes	107
Cocktails	TGF, VEGF, FGF2	BM VSEL	Single culture	Not performed	108
Notch	Notch	EPC	Coculture (CM)	Not performed	109
	Jagged1	MSC	Coculture (CM)		110
Sonic Hedgehog	Sonic Hedgehog	P19	Single culture	Not performed	111

TGF- β indicates transforming growth factor- β ; BM, bone marrow; BMP, bone morphogenetic protein; mES, mouse embryonic stem cells; END-2, a visceral endoderm-like cell line; EB, embryoid body formation; OP9, a mouse stromal cell line; DMSO, dimethyl sulfoxide (Me₂SO); hES, human embryonic stem cells; CM, cardiomyocytes; MSVC, murine stromal vascular cells; and VSEL, very small embryonic stem cell-like cells.

*Coculture with Wnt-11-producing cells using separating membranes.

En plus des facteurs de croissance, des petites molécules ou peptides ont également montré une capacité à induire une différenciation cardiaque (Tableau VII). Parmi ces inducteurs, on retrouve la substance de déméthylation de l'ADN 5-azacytidine, ou diméthylsulfoxyde, ainsi que l'hormone peptidique oxytocine qui ont tous montré l'induction de l'expression des gènes cardiaques dans les cellules cibles (Tableau VII). De plus, de nouveaux candidats pour améliorer la différenciation cardiaque comme la vitamine C ou la famille des sulfonylhydrazones, petites molécules qui peuvent stimuler l'expression dans une variété de cellules souches/progéniteurs embryonnaires et adultes ont récemment été mis en évidence.

En résumé, plusieurs facteurs et stratégies ont été pris en compte pour augmenter la différenciation cardiaque. Certains ont montré une amélioration de la récupération après une atteinte myocardique. Cependant, comme mentionné précédemment, il est difficile de faire la distinction entre les effets de « homing », de survie et de l'activité paracrine des cellules injectées par rapport aux effets directement liés à la différenciation cardiaque. La plupart des signaux contrôlant le développement embryonnaire cardiaque agissent en fonction du contexte et du temps, ce qui laisse supposer que, même s'il est possible de sensibiliser ou de faciliter la différenciation des cellules progénitrices avant l'implantation dans le myocarde (exposition à des signaux cardiomyogéniques), l'induction d'une différenciation et maturation cardiaque complète des cellules progénitrices dans l'organisme *in vitro* nécessite un traitement bien contrôlé, multiphasique et complexe (Chavakis et al. 2010).

Tableau VII : Petites molécules impliquées dans la différenciation cardiaque (Chavakis et al. 2010)

Small Molecules	Cell Type	Method	Contraction (or Electrophysiology)	Reference
Ascorbic acid	mES	EB	Yes	112
Sulfonyl hydrazone	P19CL6 and MNC	Single culture	Not performed	113
DMSO	P19	Single culture	Yes	114
DMSO	P19CL6	Single culture	Yes	115
Retinoic acid	mES	EB	Yes	116
5Aza	BM MSC	Single culture	Yes	117
5Aza	hES	EB	Yes	118
5Aza	P19	Single culture	Yes	119
5Aza	Sca-1 ⁺ cardiac progenitor	Single culture	Not performed	120
Oxytocin	P19	Single culture	Yes	121
Oxytocin or trichostatin A	Cardiac SP cells	Single culture	Yes	122
Dynorphin B	P19	Single culture	Not performed	123

mES indicates mouse embryonic stem cells; EB, embryoid body formation; MNC, mononuclear cells; DMSO, dimethyl sulfoxide; 5Aza, 5-azacytidine; BM, bone marrow; hES, human embryonic stem cells; and SP, side population.

b) Prétraitement tissulaire

Le prétraitement du tissu hôte a été réalisé par la destruction avec des ultrasons des microbulles présentes dans la circulation coronaire, ceci améliore le recrutement des BMMNC et des CSM, probablement en créant des pores capillaires (Ghanem et al. 2009; Zen et al. 2006). Ce type de traitement par ondes de choc extracorporelles s'est révélé bénéfique chez les patients atteints d'IC ischémique recevant des BMMNC intracoronaires dans l'essai CELLWAVE (Assmus et al. 2013).

c) Préconditionnement hypoxique

De nombreuses études ont montré que le preconditionnement hypoxique des CSM et des CPE avec ischémie simulée augmente l'expression de protéines pro-survie, pro-angiogéniques et migratoires, telles que HIF-1 α , Akt-1, Bcl-2, Ang-1, VEGF, ainsi que les récepteurs CXCR4 et c-Met. Il produit aussi des effets positifs sur la fonction cardiaque (Akita et al. 2003; Rosová et al. 2008; Tang et al. 2009).

d) Prétraitements pharmacologiques

En ce qui concerne le prétraitement *ex vivo* des CS, de nombreuses stratégies prometteuses ont vu le jour. L'une d'elles consiste en la surexpression de gènes anti-apoptotiques, comme l'hème oxygénase 1, Bcl-2, Akt ou Pim-1, qui augmente la survie et la fonction des CSM (Gnecchi et al. 2005; Li et al. 2007; Tang et al. 2005) et des CSC (Fischer et al. 2009), y compris leur capacité à sécréter des médiateurs paracrines (Gnecchi et al. 2005). Le preconditionnement des CSC humains avec l'inducteur HO-1 CoPP améliore considérablement leur résistance à l'apoptose (Cai et al. 2012). Augmenter l'expression du SDF-1 dans le myocarde ou celle de son récepteur, CXCR4, sur les CS augmente le recrutement cellulaire (Penn and Mangi 2008; Tang et al. 2009; Yamaguchi et al. 2003). Le preconditionnement des EPC avec des anticorps, du HMGB-1 ou de petites molécules augmente leur capacité de néovascularisation en activant les intégrines- β 2 (Carmona et al. 2008; Chavakis et al. 2007). De même, le preconditionnement des EPC et BMMNC humaines avec l'activateur endothélial de transcription de l'oxyde nitrique synthase AVE9488 améliore leur potentiel migratoire et pro-angiogénique (Sasaki et al. 2006).

e) Ingénierie tissulaire

L'incorporation de cellules dans des biomatériaux naturels (matrigel, collagène, fibrine, alginate) ou synthétiques comme les nanofibres peptidiques est un autre moyen d'améliorer la fonction des CS. Les biomatériaux favorisent la greffe, la rétention et la différenciation des cellules en raison de leur faible viscosité et de leur similarité avec la MEC du myocarde, préservant ainsi les signaux cellule-matrice (Segers and Lee 2011). Les deux principales approches en ingénierie des tissus cardiaques sont i) l'ingénierie *in vitro*, qui consiste à ensemercer des cellules sur des scaffolds/matrices poreuses préformées qui sont cultivées *in vitro* puis appliquées sur la surface épocardique ; ii) l'ingénierie *in vivo*, qui consiste en l'injection d'un mélange de biomatériaux et de cellules afin d'obtenir *in situ* la formation d'un complexe biologique (Davis et al. 2005, 2006). D'un point de vue conceptuel, les biomatériaux pourraient être conçus afin de libérer les facteurs de croissance d'une manière contrôlée pour favoriser la survie et la greffe des cellules, et guider également les décisions relatives au phénotype cellulaire (Davis et al. 2005, 2006).

Pour conclure, les essais cliniques de thérapie cellulaire pour la régénération cardiaque dans l'IDM et l'IC ont donné des résultats généralement neutres ou positifs à court terme. Ces résultats ne sont pas surprenants compte tenu de la nouveauté du concept, de la complexité des événements de signalisation impliqués dans la réparation et la régénération cardiaques et de la connaissance limitée, au moment où ces études cliniques ont débuté, des mécanismes sous-jacents à ces processus. Malheureusement, ce manque de résultats positifs a suscité du scepticisme chez les divers intervenants, proportionnel aux attentes qui avaient été soulevées au départ. Ce désenchantement n'est pas justifié, car même si ces essais cliniques n'ont pas montré d'améliorations frappantes suite à la thérapie, ces études ont alimenté la recherche fondamentale, générant ainsi de nouvelles connaissances mécanistiques. L'une des conséquences majeures, est également, un changement de paradigme par lequel l'apport de cellules exogènes pourrait être remplacé en tirant parti de la propriété intrinsèque du cœur à se réparer, ouvrant la voie aux thérapies « acellulaires ».

Chapitre 3 : Vésicules extracellulaires : de la biogenèse au potentiel impact clinique dans les pathologies cardiaques

1. Développements récents en terme de nomenclature, techniques d'isolement, détection et biogenèse

a) Généralités

Il est aujourd'hui connu que tous les types cellulaires, qu'ils soient d'organismes eucaryotes ou procaryotes, relarguent des vésicules extracellulaires (VE) dans l'environnement. Chez l'Homme, il a été retrouvé des VE dans tous les fluides biologiques (urine, sang, salive, liquide amniotique, bile...) (Colombo, Raposo, and Théry 2014). Les VE sont composées d'une membrane similaire à la membrane cellulaire bi-lipidique qui va englober un compartiment aqueux sans noyau. Sous le terme de VE sont regroupées différentes sous-populations incluant les corps apoptotiques, les microparticules et les exosomes qui vont se différencier les unes des autres par leur taille et leur origine. Cependant, ces dernières années, la nomenclature est en évolution constante.

L'origine, la nature et les caractéristiques de ces VE sont diverses et de nombreux noms différents ont été utilisés dans la littérature, en référence à leur taille [préfixe micro ou nano : microparticules, microvésicules (MV), nanovésicules, nanoparticules], leur cellule ou tissu d'origine (prostasomes, oncosomes), leurs fonctions proposées (vésicules, argosomes, tolérosomes de la matrice calcifiante), ou simplement leur présence hors cellule (préfixe exo ou ecto : ectosomes, exosomes, exovésicules ou vésicules).

L'un des défis majeurs et permanents est de définir des méthodes qui permettront de faire la distinction entre les exosomes et les MV. Il peut s'avérer impossible de les distinguer sur la base de propriétés intrinsèques, telles que la taille, la structure, la densité flottante ou la composition protéique. De plus, pour mieux comprendre l'origine des différentes populations de vésicules et pour élucider leur pertinence physiologique, une meilleure connaissance des mécanismes de biogenèse et de sécrétion est également nécessaire.

Dans les paragraphes suivants, il sera développé l'état actuel de la recherche concernant la compréhension de la biogenèse des VE, de leur structure, de leur contenu et de leur rôle

possible dans les pathologies cardiaques. Leur présentation comme nouvel outil thérapeutique pour lutter contre l'IDM et l'IC ischémique sera également abordé.

b) Classification des différents types de vésicules

Provenant des endosomes ou de la membrane plasmique, le terme VE regroupe une famille hétérogène de vésicules qui se compose de corps apoptotiques (de 50 nm à 5 µm de diamètre), de microvésicules (50 nm à 1 µm) et d'exosomes (40 à 200 nm) (Kervadec et al. 2016). La formation d'exosomes des microvésicules se produit par deux voies distinctes, tandis que les corps apoptotiques se forment à la suite de bourgeonnement de la membrane plasmique pendant l'apoptose (Nawaz et al. 2014) (Figure 23).

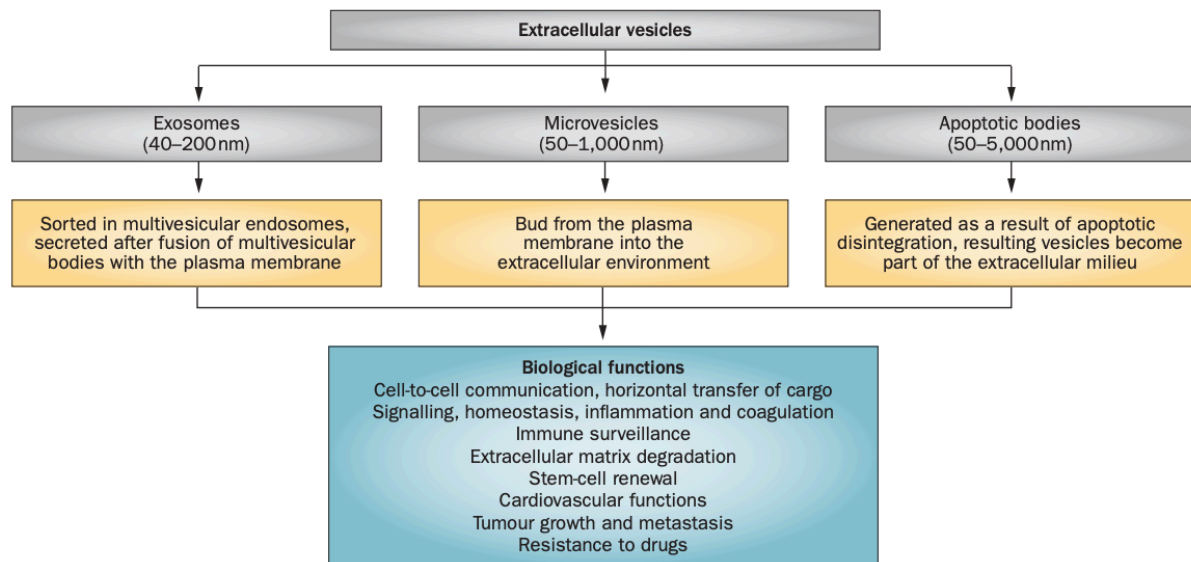


Figure 23 : Différentes classes de vésicules extracellulaires selon leur origine et leur taille (Nawaz M, 2014).

Il a d'abord été pensé que les VE permettaient une élimination des protéines surabondantes (Trams et al. 1981). Aujourd'hui, il est reconnu qu'elles participent à la médiation de la communication intracellulaire dans les processus normaux et pathologiques (Johnstone et al. 1987; Minciacchi, Freeman, and Di Vizio 2015; Trams et al. 1981). Le terme "exosome" a été inventé par Rose Johnston en 1987 après avoir découvert quelques années plus tôt que de petites vésicules de 50 à 90 nm étaient libérées dans l'environnement extracellulaire après la fusion d'endosomes tardifs/corps multivésiculaires avec la membrane plasmique (Johnstone et al. 1987) (Figure 24). La biogenèse de l'exosome commence par l'invagination de la membrane plasmique, transportant la vésicule jusqu'à l'endosome précoce (Figure 24a). Par la suite, l'endosome précoce se transforme en endosome tardif, par bourgeonnement,

production et accumulation de vésicules intraluminales dans la lumière de ces organites (Minciacchi et al. 2015). Ces vésicules intraluminales peuvent être sécrétées sous forme d'exosomes, mais elles peuvent aussi être dégradées ou recyclées dans la cellule mère. Au cours de la production des vésicules intraluminales dans les MVB, des sous-ensembles de protéines de surface comme CD9, CD81, Alix, TSP-1, SOD-1 et pyruvate kinase aident à trier et à charger sélectivement les protéines, lipides et acides nucléiques dans les ILV (Gupta, Bang, and Thum 2010). De plus, le tri de la cargaison et le chargement des protéines sont régulés par des mécanismes tels que les complexes de tri endosomaux nécessaires au transport (ESCRT) avec les sous-complexes 0, I et III. D'autres mécanismes indépendants de l'ESCRT comprennent les mécanismes lipido-dépendants ou les tétraspanines avec des clusters de différenciation CD 81, 9 et 63 (Emanuelli et al. 2015). La voie du domaine tardif (domaine L), conservée au cours de l'évolution, contribue également au chargement des protéines dans les exosomes. Les domaines L sont utilisés pour le recrutement des composants ESCRT dans les membranes cellulaires et sont nécessaires à la formation des MVB. Par exemple, la protéine synténine du domaine L a été identifiée dans le recrutement d'ALIX (une protéine associée à l'ESCRT) et dans la formation et la charge subséquente des exosomes (Baietti et al. 2012). De même, la protéine Ndfip1 contenant le domaine L a été identifiée dans le chargement spontané de protéines dans les exosomes (Putz et al. 2008, 2012) et même exploitée pour forcer le chargement de protéines spécifiques dans les exosomes (Sterzenbach et al. 2017).

Les exosomes vont contenir différents types de molécules d'ARN, notamment des ARN messager (ARNm), ARN circulaire (ARNcir), ARN long non codant (ARN lnc) et microARN (miARN ; Coumans et al. 2017; S. Li et al. 2018). Les miARN sont de petits ARN non codants capables de régulation post-transcriptionnelle de l'expression génétique. Pour ce faire, chaque miARN cible une série d'ARNm, induisant généralement une dégradation des ARNm ou une inhibition de la traduction. Grâce à leur membrane bi-lipidique, les exosomes protègent leur cargaison contre la digestion par les RNases (Arroyo et al. 2011; Li et al. 2015; Vickers et al. 2011). Il est important de noter que les exosomes transportent des miARN biologiquement actifs des cellules mères aux cellules réceptrices, propageant ainsi leur action (Caporali et al. 2016). En fait, des preuves recueillies de façon indépendante suggèrent que lors de la délivrance d'exosomes aux cellules réceptrices, les miARN régulent l'expression des gènes dans les cellules réceptrices, influençant profondément le comportement cellulaire (Beltrami et al. 2017; Mathiyalagan et al. 2017).

Après le chargement de la cargaison d'exosomes, le MVB fusionnera avec la membrane interne conduisant à la libération des exosomes dans l'espace extracellulaire par un mécanisme Rab GTPases dépendant (Hsu et al. 2010). Les membranes exosomales conservent la typologie de la cellule mère et contiennent des microdomaines (radeau lipidique), ce qui favorise l'absorption par la cellule réceptrice, comme l'endocytose médiée par des radeaux lipidiques (Zakharova, Svetlova, and Fomina 2007). Par la suite, les exosomes atteindront les cellules réceptrices affectant leur programme d'expression génétique et, dans plusieurs cas, leur fonction. Trois types de mécanismes d'internalisation ont été décrits comme étant impliqués dans l'absorption des exosomes par les cellules réceptrices : liaison directe, fusion ou endocytose (Morrison, Bailey, and Dear 2016). Lorsque les exosomes se lient à une cellule réceptrice, ils peuvent agir à l'extérieur (c.-à-d. sans qu'il soit nécessaire de les incorporer à la cellule) comme ligands pour activer la transduction du signal par le récepteur. Par exemple, les exosomes du complexe de sclérose tubéreuse auraient affecté les cellules en activant Notch1 et mTOR, inhibant ainsi la différenciation des cellules environnantes (Patel et al. 2016). Lorsque les exosomes fusionnent directement avec la membrane cellulaire réceptrice, la cargaison est libérée dans le cytoplasme (Parolini et al. 2009). Les mécanismes d'endocytose tels que la phagocytose, la micropinocytose, l'endocytose médiée par la clathrine ou cavéoline et l'endocytose lipidique (« raft-dépendant ») dépendent probablement du type de cellules et de leur état physiologique mais ne sont pas entièrement compris (Fitzner et al. 2011; Morelli et al. 2004; Mulcahy, Pink, and Carter 2014; Nanbo et al. 2013).

Les microparticules :

Elles vont être issues du bourgeonnement de la membrane (Figure 24b), de sa fission puis fusion résultante d'un processus dynamique conduisant à la redistribution des phospholipides de la MP et à la contraction des protéines du cytosquelette. Le premier mécanisme identifié à l'origine de ce phénomène implique la floppase qui contrôle la translocation de la phosphatidylsérine à la membrane externe. Cette modification entraîne un déséquilibre des lipides conduisant à des courbures de la MP puis bourgeonnements à l'origine des microparticules. Un second mécanisme a été mis en évidence impliquant la protéine ARF6 à l'origine d'une cascade de signalisation activant la contraction du cytosquelette.

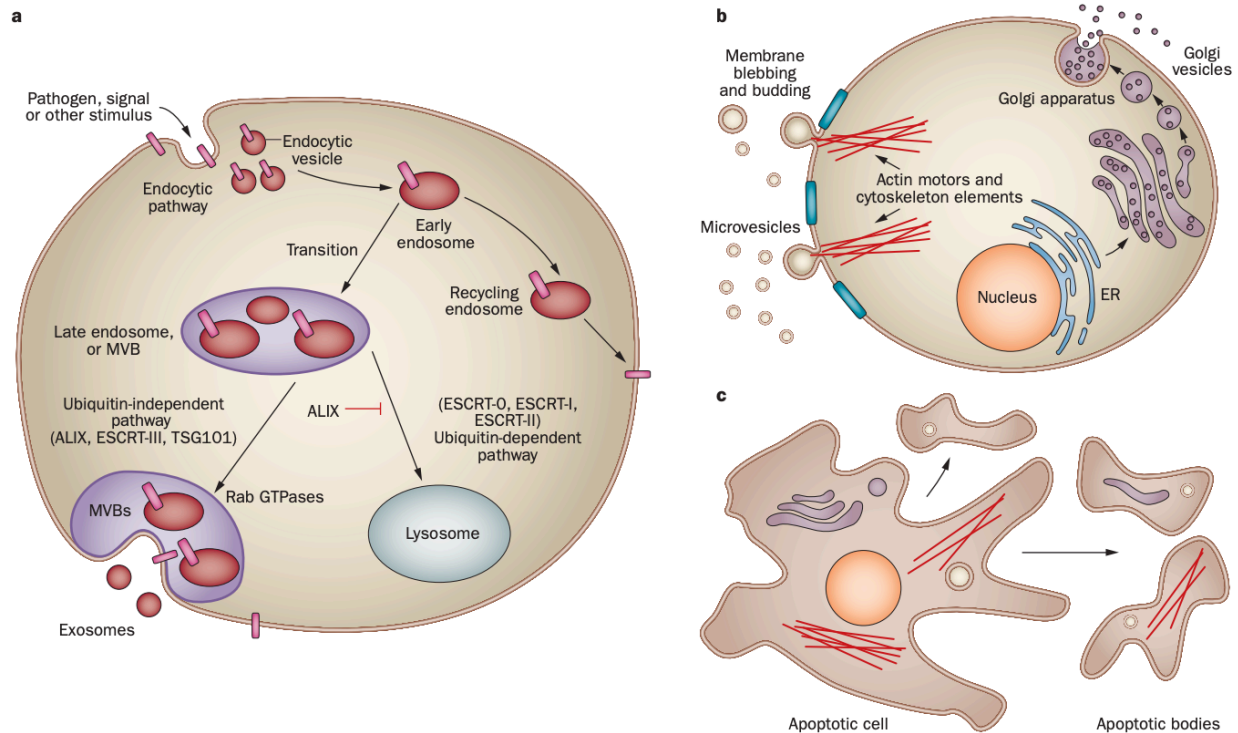


Figure 24 : Synthèse schématique de la biogenèse et sécrétion des exosomes a) Biogenèse des exosomes. b) Biogenèse des microparticules. c) Biogenèse des corps apoptotiques (par Nawaz M, 2014).

Corps apoptotiques :

Les cellules tumorales subissant une désagrégation apoptotique peuvent produire des corps apoptotiques ou des apoptosomes (Saraste and Pulkki 2000), des boursouflures relativement importantes de la membrane sont créées (Figure 24c). Les corps apoptotiques contiennent des noyaux fragmentés ainsi que des fragments d'organelles cytoplasmiques, qui pourraient être absorbées par les cellules dans le micro-environnement tumoral, influençant ainsi la réponse cellulaire en transférant leurs contenus oncogènes dans les cellules réceptrices (Bergsmedh et al. 2001).

Après invagination, les particules peuvent agir sur les voies de signalisation en libérant la cargaison par fusion, se dégrader dans le lysosome ou être recyclés dans la membrane plasmique. Il est intéressant de noter que lorsque les protéoglycanes héparine sulfate sur la membrane plasmique de la cellule réceptrice sont bloqués par l'héparine ou par l'ajout d'un récepteur piège de type B-1 éliminant le cholestérol, on observe une diminution de l'absorption des exosomes (Atai et al. 2013; Christianson et al. 2013).

c) Caractéristiques biochimiques : composition

La plupart des études sur la composition biochimique des VE sont des analyses de populations mixtes de vésicules obtenues par ultracentrifugation différentielle. Dans certaines études, les exosomes ont été purifiés par immuno-isolation (Tauro et al. 2012; Wubbolts et al. 2003), éliminant des sous-populations de vésicules. Dans le paragraphe suivant, un état actuel de la littérature concernant la composition spécifique des différents sous-types de VE est présenté (Figure 25).

Protéines :

La teneur en protéines des exosomes ou des vésicules membranaires a fait l'objet d'études approfondies depuis leur description initiale. Des techniques permettant la détection à base d'anticorps spécifiques (western blot, immunohistochimie) ont d'abord été utilisées, mais le développement des techniques d'analyses protéomiques dans les années 1990 a rapidement permis l'identification à grande échelle de protéines non prédéterminées dans les préparations de VE. Les premières études utilisant la digestion à la trypsine et la cartographie par spectrométrie de masse sur les exosomes (c.-à-d. 100 000×g) obtenus à partir de cultures de cellules dendritiques de souris (Théry et al. 1999, 2001) ont été rapidement suivies par de nombreuses études similaires réalisées sur des exosomes d'origines diverses. Les résultats de ces études et de nombreuses autres sur les exosomes de mammifères ont été rassemblés dans une base de données appelée Exocarta (Mathivanan et al. 2012). Exocarta a récemment été intégré à une base de données plus complète appelée Vesiclepedia, qui comprend également des données provenant d'autres types de VE (<http://microvesicles.org>) (Kalra et al. 2012) et est continuellement mise à jour avec l'aide de la communauté scientifique qui effectue des recherches sur les VE. Les bases de données contiennent des données non seulement sur les protéines, mais aussi sur les acides nucléiques et les lipides, ainsi que sur les procédures de purification utilisées. Leur mise à jour continue en fait un outil crucial pour améliorer la compréhension de la complexité des VE.

Les premières études protéomiques ont montré que les exosomes contiennent un sous-ensemble spécifique de protéines cellulaires, dont certaines dépendent du type de cellule qui les sécrète, alors que d'autres se trouvent dans la plupart des exosomes, indépendamment du type cellulaire. Ces dernières comprennent les protéines d'origine endosomale, de la membrane plasmique et du cytosol, tandis que les protéines du noyau, des mitochondries, du

réticulum endoplasmique et du complexe de Golgi sont le plus souvent absentes. Ces observations mettent en évidence la spécificité de la formation de ces vésicules et montrent qu'elles représentent un compartiment sous-cellulaire spécifique. La Figure 25 est une représentation schématique d'un exosome canonique (Chaput and Théry 2011; Théry et al. 2001; Théry, Ostrowski, and Segura 2009). Cependant, ce schéma est global (VE) et non un schéma spécifique d'exosomes. En effet, des analyses protéomiques plus récentes d'autres VE (Kowal et al. 2016; Turiák et al. 2011) montrent un large chevauchement de l'expression des protéines avec celles énumérées ci-dessus dans les exosomes, ce qui suggère que les protéines spécifiquement exprimées dans les exosomes comme opposées aux vésicules issues de la membrane plasmique doivent encore être identifiées. De plus, certaines de ces protéines ne sont très probablement pas également présentes dans tous les sous-types de vésicules copurifiées dans les échantillons analysés jusqu'ici. Le développement récent d'outils d'analyse protéomique quantitative ou semi-quantitative couplé à une purification plus poussée par gradient de densité OptiPrep™ ou par immunoaffinité ont permis d'observer un fort enrichissement de certaines protéines (par exemple TSG101, CHMP2A, RAB11B) mais pas d'autres (par exemple ALIX, CHMP4B, RAB11A, RAB5) ce qui suggère que les dernières sont plus ubiquitaires dans toutes les VE. Il a également été observé que CD9 est probablement plus omniprésente que les autres tétraspanines dans les VE. Enfin, grâce à une quantification minutieuse de la proportion relative des vésicules porteuses de CD63 ou du CMH de classe II, un enrichissement plus important de CD63 dans les plus petites vésicules (<50 nm) a été mis en évidence (Colombo et al. 2013), tandis que les molécules du CMH II étaient plus abondantes dans les vésicules plus grandes (>100 nm), montrant encore la présence simultanée de différents sous-types de vésicules. Le perfectionnement des techniques d'analyse et de purification au cours des prochaines années devrait permettre de clarifier la composition protéique de chaque sous-type de VE.

Lipides :

Moins d'études ont analysé la composition lipidique des VE (Laulagnier et al. 2004; Llorente et al. 2013; Trajkovic et al. 2008; Wubbolts et al. 2003). Celle-ci va avoir un rôle important dans la stabilité et la rigidité des VE et participer aux mécanismes de fusion intracellulaire et de bourgeonnement des VE. En comparant les vésicules sécrétées aux membranes cellulaires totales, trois de ces études sur quatre ont observé un enrichissement en sphingomyéline,

phosphatidylsérine, phosphatidyléthanolamine, phosphatidylcholine, phosphatidylinositol et ganglioside GM3, qui sont des lipides membranaires, et en cholestérol, prostaglandines, céramides et généralement en acides gras saturés (Durcin et al. 2017). Ces résultats montrent donc une composition lipidique spécifique des VE, avec certaines caractéristiques (p. ex. sphingomyéline et cholestérol) qui rappellent les sous-domaines résistants aux détergents de la membrane plasmique appelés radeaux lipidiques (Ikonen 2001). Les lipides vont varier en fonction des sous-types de VE et de leur cellule d'origine. En effet, les exosomes vont, par exemple, être enrichis en gangliosides GM3 et en céramides impliqués dans leur relargage.

Acides nucléiques :

Après la première description des acides nucléiques (ARNm et miARN) dans les exosomes sécrétés par les mastocytes (Valadi et al. 2007), de nombreux groupes ont analysé la présence de matériel génétique dans les VE. La plupart des études décrivent donc de petits ARN, y compris des ARNm et des miARN de différentes tailles, avec des niveaux faibles ou indétectables d'ARN ribosomal 18S et 28S (sur bioanalyseur) dans les VE purifiés. Dans la plupart des études, les ARNm sont contenus dans les VE, comme en témoigne leur résistance à la digestion par les RNAses (Valadi et al. 2007). Cette incorporation de miARN dans les vésicules serait médiée par la ribonucléoprotéine nucléaire A2B1, bien que tous les mécanismes impliqués restent encore à déterminer. Des études à haut débit, plus récentes, ont mis en évidence la présence d'ARN ribosomiaux, d'ADN mitochondrial, d'ARN de transfert, d'ARN longs non-codants, d'ARN interférants et même, d'ADN génomique double brin (Kalluri and Lebleu 2016).

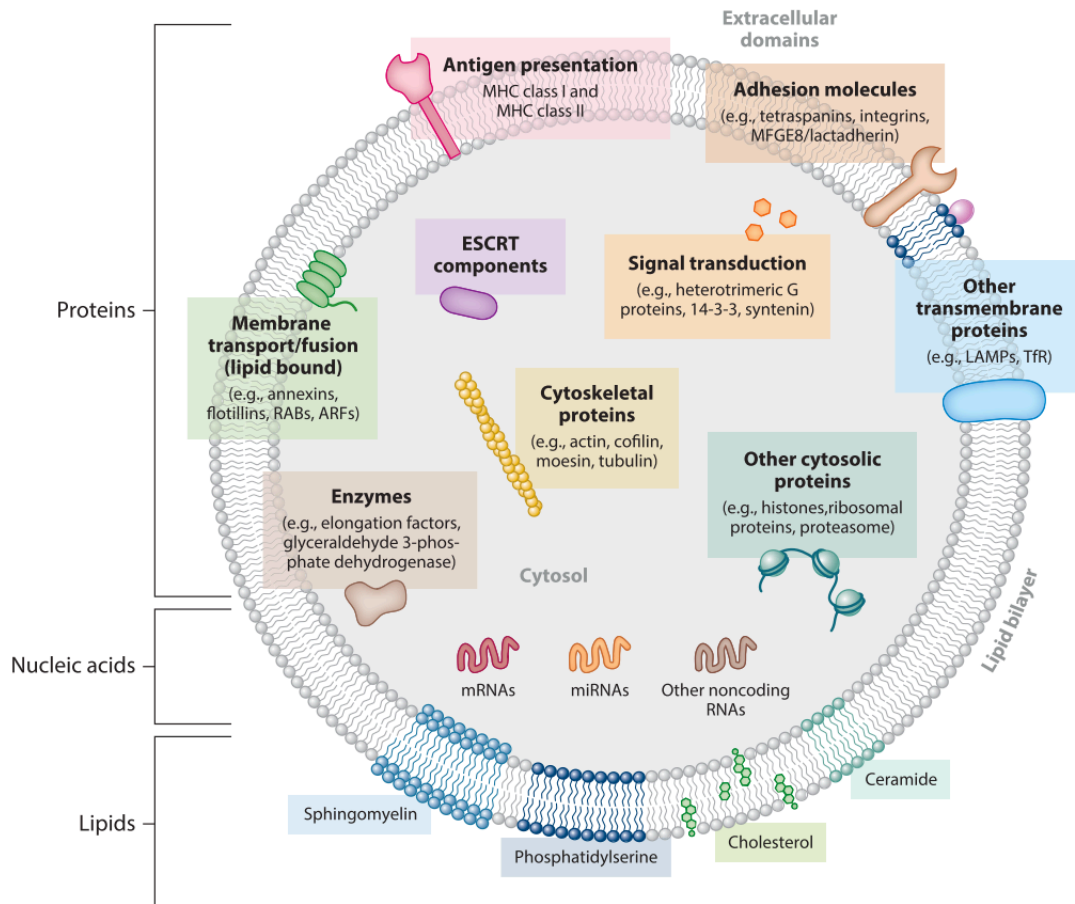


Figure 25 : Composition des vésicules extracellulaires (par Colombo M, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014).

Changements possibles dans la composition des VE :

La composition globale des exosomes ou VE décrites jusqu'à présent est représentative des populations mélangées. Au cours des dernières années, de nombreuses études ont fait état de changements dans la composition des VE induits par des modifications des conditions de culture, qui peuvent imiter différents environnements extracellulaires ou différents états physiologiques ou de différenciation des cellules sécrétrices.

Par exemple, les signaux inflammatoires (p. ex. LPS, TNF α , IFN γ) affectent fortement la composition en protéines et/ou en ARN des VE libérées par les cellules dendritiques (Segura et al. 2005), les cellules endothéliales (de Jong et al. 2012) et les CSM (Kilpinen et al. 2013). L'hypoxie, une situation pathologique observée au cœur de grosses tumeurs ou à la suite d'une lésion vasculaire, modifie la composition en protéines et en ARN des VE libérées par les cellules endothéliales (de Jong et al. 2012) et tumorales (Kucharzewska et al. 2013). La

composition lipidique des vésicules sécrétées est également modifiée lorsque les cellules tumorales sont cultivées dans un environnement acide, ce qui imite le noyau profond des tumeurs (Parolini et al. 2009). Il est important à l'avenir de déterminer si ces changements dans la composition globale reflètent des changements dans le type de VE sécrétées ou plutôt dans le ciblage intracellulaire des composants analysés sur ces VE.

d) Différentes techniques de purification

Les VE peuvent être isolées par de nombreuses méthodes différentes incluant la centrifugation différentielle, la centrifugation à gradient de densité, l'ultrafiltration, la chromatographie, l'isolement par affinité, la précipitation polymérique et par l'utilisation de dispositifs microfluidiques (Tableau VIII). Cependant, aucune approche ne permet une purification complète de toutes les vésicules et toutes les méthodes disponibles ont des avantages et des inconvénients. La méthode de choix devrait tenir compte du volume de l'échantillon (par exemple, si l'échantillon est dérivé de fluides biologiques ou à partir de milieux de culture cellulaire), la pureté, l'intégrité et le rendement de VE nécessaires (comme l'analyse protéomique ou l'étude des ARN à haut débit), ainsi que l'instrumentation disponible et le temps des processus. Une comparaison des méthodes d'isolement pour différents échantillons, comme le plasma sanguin, le lait, l'urine et les milieux de culture cellulaire, a déjà été entreprise (Alvarez et al. 2012; Kalra et al. 2013; Rekker et al. 2014; Tauro et al. 2012; Taylor, Zacharias, and Gercel-Taylor 2011; Yamada et al. 2012). En plus des méthodes existantes et validées, de nouvelles technologies sont en cours de développement pour l'isolement des vésicules.

Le protocole initialement développé pour purifier les exosomes réticulocytaires à partir d'un milieu conditionné en culture tissulaire (Johnstone et al. 1987) a ensuite été utilisé pour purifier ces vésicules des cellules présentatrices d'antigènes (Raposo et al. 1996; Zitvogel et al. 1998), comme décrit en détail (Théry et al. 2006). Ce protocole repose sur une centrifugation différentielle, les plus petites vésicules (exosomes compris) étant sédimentées à 100 000 g par ultracentrifugation. Avant l'ultracentrifugation, les grandes vésicules sont éliminées par centrifugations successives à des vitesses croissantes par sédimentation, sans créer artificiellement de petites vésicules à partir de grandes par centrifugation directe à grande vitesse. Plusieurs variantes de cette méthode sont aujourd'hui utilisées et peuvent impliquer une ultracentrifugation à plus grande vitesse [par exemple 140 000 g (Baietti et al.

2012)] et/ou inclure différentes étapes avant l'ultracentrifugation finale, comme la filtration pour éliminer les débris et les vésicules supérieures à 220 nm (Théry et al. 2006) ou la chromatographie par exclusion pour récupérer les entités supérieures à 50 000 kDa et donc éliminer les protéines solubles (Taylor, Chou, and Black 1983). De même, la plupart des protocoles utilisés pour purifier les VE de plus grandes tailles impliquent également une centrifugation, généralement à une vitesse inférieure, c'est-à-dire de 10 000 g (Muralidharan-Chari et al. 2009) à 50 000 g (Baj-Krzyworzeka et al. 2006). Dans tous les cas, l'ultracentrifugation ne permet que l'enrichissement en sous-types de VE ou d'exosomes et ne permet pas une purification totale, car différentes vésicules de taille similaire ainsi que des agrégats de protéines peuvent co-sédimer à 100 000 g. Une technique disponible permettant de séparer les vésicules des agrégats protéiques est d'utiliser un gradient de sucrose (Escola et al. 1998). Les agrégats protéiques sédimentent à travers le sucrose, tandis que les vésicules contenant des lipides flottent jusqu'à une position d'équilibre. Une variante de cette approche a été utilisée pour purifier les VE de qualité clinique à des fins thérapeutiques (Lamparski et al. 2002) en combinant la filtration/concentration à travers une membrane de 500 kDa et l'ultracentrifugation à travers un coussin D20/sucrose pour retenir les vésicules.

Tableau VIII : Avantages et limites des principales techniques utilisées pour isoler les VE.

Method	Principle	Advantages	Disadvantages	References
Differential centrifugation	Sedimentation based on size and density	Gold standard Most widely used Suitable for large-volume isolations	Requires expensive ultracentrifuge Time consuming Recovery based on sedimentation efficiency No absolute separation of vesicle subpopulations Risk of contamination and formation of protein aggregates	Alvarez et al. (2012) ⁶⁹ Johnstone et al. (1987) ¹⁶⁴
Density gradient centrifugation	Flotation based on density	Increases the purity by removal of contaminating protein aggregates	Requires expensive ultracentrifuge Time consuming Sucrose toxicity might limit downstream functional studies No absolute separation of vesicle subpopulations owing to overlapping density	Tauro et al. (2012) ⁷² Théry et al. (2006) ¹⁶⁵
Ultrafiltration	Separation based on size	Easy and fast	Small sample volume limitations Protein contamination Loss of yield owing to trapping in filter pores	Cheruvanky et al. (2007) ⁷⁸ Merchant et al. (2010) ⁷⁹
Chromatography	Separation based on size	Increases purity and integrity Suitable for isolation from complex biofluids	Requires specialized equipment Small sample volume limitations Time consuming	Chen et al. (2011) ⁸⁰ Lai et al. (2012) ⁸¹ Taylor et al. (1983) ⁸²
Affinity isolation	Separation based on affinity interactions	Increases purity High specificity to isolate subpopulations	Requires prior knowledge of vesicle characteristics Requires specific antibody Not suitable for large sample volumes Captured vesicles might not retain functionality after elution	Chen et al. (2010) ⁸⁴ Clayton et al. (2001) ⁸³
Polymeric precipitation	Separation based on PEG precipitation	Quick and relatively cheap High yield	Low purity caused by contamination Low specificity	Burns et al. (2014) ¹⁶⁶ Rekker et al. (2014) ⁷¹
Microfluidic devices	Separation based on mechanics of fluid flow	Increases throughput and allows multiplexing Reduced cost, sample size and processing time	Not applicable to large sample volumes	Chen et al. (2010) ⁸⁴

De nos jours, dans la plupart des études, les VE sont séparées des cellules et isolées par centrifugation différentielle (Ayers et al. 2011; Berckmans et al. 2011; Lacroix et al. 2012). Cependant, comme le montre la Figure 26, les plaquettes et les grosses VE, comme les oncosomes, se chevauchent en taille et peuvent donc être exclues au cours de cette première étape de centrifugation. La figure met également en évidence que la concentration des VE diminue en raison des pertes par centrifugation et de l'agrégation des sous-populations de VE. Les dispositifs sensibles de détection d'une seule particule, tels que la détection par impulsions résistives accordables (TRPS) et l'analyse de suivi des nanoparticules (NTA), détectent donc une concentration de VE plus faible que prévu. Cependant, les dispositifs de détection de particules insensibles, tels que les cytomètres à flux standard, détectent ces agrégats plus gros, et donc une concentration de particules plus élevée. Ainsi, bien que les protocoles de centrifugation différentielle puissent être facilement appliqués, les données obtenues peuvent ne pas être fiables et difficiles à interpréter. Certains problèmes d'isolement peuvent être surmontés en diluant dans une solution saline ou une solution saline tamponnée au phosphate avant la centrifugation. Cette procédure a été signalée en 1967 et son efficacité pour l'isolement des VE a été confirmée récemment (Momen-Heravi et al. 2012; Wolf 1967).

Ultrafiltration :

Basées sur le passage à travers des filtres possédant des nanopores ou des micropores, les VE peuvent également être isolées par ultrafiltration, ce qui ne nécessite pas d'équipement coûteux (Cheruvanky et al. 2007; Merchant et al. 2010). Bien que l'ultrafiltration soit rapide, la contamination protéique abondante et la rétention des VE dans les pores des membranes conduisent à une réduction de leur rendement.

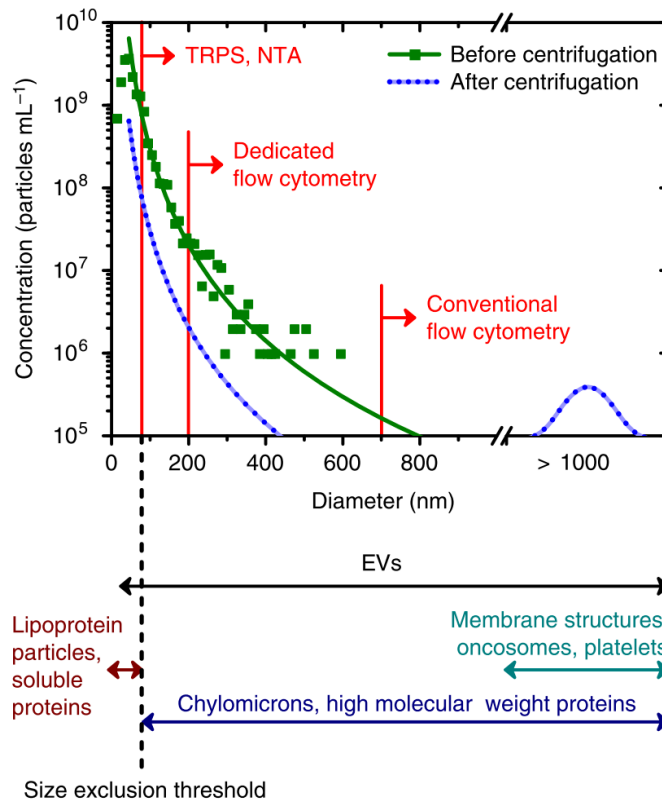


Figure 26 : Concentration particulaire mesurée en fonction du diamètre des VE et de la technique utilisée.

Chromatographie :

En 2014, le projet METVES a redécouvert la chromatographie d'exclusion de taille (SEC) pour l'isolement des VE du plasma et d'autres fluides biologiques. À l'heure actuelle, de nombreux groupes de recherche testent ou utilisent la SEC. Cette méthode : (i) est relativement facile et rapide ; (ii) a un taux de récupération des VE allant jusqu'à 80% ; et (iii) peut-être plus important encore, entraîne l'élimination presque complète des protéines solubles et de la plupart des lipoprotéines du plasma (Böing et al. 2014; Varga et al. 2014). Lorsqu'on applique la SEC pour isoler les VE du plasma, les VE isolées demeurent biologiquement actives et sont suffisamment pures pour servir de matrices de départ pour des applications comme la microscopie électronique, la protéomique et la diffusion des rayons X à petit angle. Le protocole utilise un matériau en phase stationnaire qui sépare les particules en fonction de leur taille (ici < 75 nm) des particules plus grosses, mais divers matériaux sont disponibles pour adapter la taille de séparation aux besoins de l'utilisateur. Cependant cette technique est longue et demande du matériel spécialisé (Chen et al. 2011; Taylor et al. 1983).

Récemment, des méthodes disponibles dans le commerce revendiquant une purification exosomale rapide et simple de procédure, sans ultracentrifugation, ont été mises en avant par diverses entreprises. Parmi ces kits, on utilise soit une précipitation à base de polymères, soit une immunocapture par des billes enrobées d'anticorps. La première devrait précipiter une gamme de vésicules plus large, et la seconde, inversement, une gamme plus restreinte, que celle obtenue par ultracentrifugation. Par conséquent, un processus de comparaison approfondi est encore nécessaire pour valider ces nouveaux outils et déterminer les types de vésicules qu'ils précipitent.

e) Techniques d'analyse qualitative et quantitative

La caractérisation, l'évaluation de la pureté et la quantification des vésicules peuvent être réalisées par de nombreuses méthodes plus ou moins récentes. Une combinaison de plusieurs techniques est souvent nécessaire pour surpasser les difficultés liées à la détection des vésicules de par leur taille et le manque de marqueurs spécifiques.

De nombreux faits nouveaux sont à signaler en ce qui concerne la détection et la normalisation des mesures des VE. Depuis 2010, des méthodes de détection permettant d'étudier les particules individuelles en suspension < 200 nm sont devenues disponibles, telles que TRPS (Tunable Resistive Pulse Sensing) et NTA (nanoparticle tracking analysis). Entre-temps, les limites de la cytométrie en flux ont été découvertes, des cytomètres en flux avec une sensibilité améliorée sont devenus disponibles, la standardisation des mesures des VE a été réalisée et des techniques sont combinées pour étudier simultanément de multiples propriétés physiques (Van Der Pol et al. 2010; Sitar et al. 2015; Varga et al. 2014).

Les méthodes de détection TRPS et NTA sont deux méthodes récentes qui permettent de mesurer la distribution granulométrique et la concentration des particules en solution avec une erreur de mesure inférieure à 10%, sauf pour les mesures de concentration avec NTA, qui peuvent présenter des pourcentages d'erreurs allant jusqu'à 70%. La Figure 26 montre que les deux méthodes sont capables de détecter les VE d'un diamètre de 70 à 100 nm (van der Pol et al. 2014) et de tailles inférieures avec les dernières technologies et logiciels développés. La combinaison du TRPS, du NTA, de la microscopie électronique à transmission et de la cytométrie en flux a considérablement amélioré les connaissances sur la relation entre la concentration et la taille des VE dans les fluides biologiques. Par exemple, la Figure 26 montre

que la relation concentration-taille suit une fonction puissance, ce qui signifie que les petites VE (diamètre inférieur à 100 nm) sont plus nombreuses que les grandes. Par conséquent, la concentration de VE détectée dépend fortement de la taille limite de détection.

Les futures mesures de concentration de VE nécessiteront une déclaration de la limite inférieure de détection de la méthode appliquée afin de pouvoir standardiser et comparer les données. Outre la recherche fondamentale, le NTA et le TRPS sont d'une utilité limitée pour l'étude d'échantillons cliniques. Premièrement, les deux méthodes sont lentes et laborieuses. Par exemple, l'analyse de 1000 particules prend généralement ≥ 30 min par TRPS, 10 min pour le NTA, et moins d' 1 s pour la cytométrie en flux. Deuxièmement, le TRPS et le NTA ont peu d'options pour identifier les types de VE et distinguer les VE des autres particules, comme les lipoprotéines. Les nouveaux instruments NTA développés ont la capacité de détecter la fluorescence ou la diffusion d'une seule VE. Cependant, lorsque les VE sont colorées avec une protéine fluorescente ou des anticorps conjugués à de l'isothiocyanate de fluorescéine, de la phycoérythrine ou de l'alloxycyanine, le colorant est blanchi soit avant que les VE atteignent le champ de vision du microscope, soit avant que les VE puissent être suivies pendant une durée suffisante pour une estimation précise de leur taille. Pour comparaison, la cytométrie en flux peut détecter à la fois la fluorescence et la diffusion à partir d'une seule VE et n'a pas de problèmes de blanchiment, car l'acquisition des données est effectuée en moins de $\sim 1 \mu\text{s}$. Par conséquent, la détection de fluorescence sur plusieurs canaux reste la seule technologie favorable, mais cette technologie n'est pas encore couplée au TRPS ou NTA.

Cytométrie en flux :

La cytométrie en flux, par contre, peut fournir des informations biochimiques sur l'origine cellulaire d'une seule VE en mesurant la fluorescence multiplex à un taux de dizaines de milliers de particules et de VE par minute. La vitesse élevée et la praticité rendent la cytométrie en flux adaptée aux applications de recherche clinique. Il n'est donc pas surprenant que la plupart des laboratoires utilisent cette technique pour étudier les VE.

Cependant, étant donné que les cytomètres diffèrent par leur configuration optique et leur sensibilité et que les données sont exprimées en unités arbitraires, l'interprétation et la comparaison des résultats entre laboratoires ne sont pas simples. Cette technique est également limitée par la taille des éléments à étudier. Cependant, les nouveaux cytomètres en flux ont une sensibilité accrue par rapport aux anciens instruments. Certains sont capables

de détecter des billes de polystyrène < 100 nm, qui sont comparables à des VE de environ 180 nm après correction pour la différence d'indice de réfraction (Van Der Pol et al. 2010).

Microscopie :

Parce qu'elles se situent en dessous du seuil de résolution de la microscopie optique, la microscopie électronique à transmission (TEM) a été jusqu'à présent la technique préférée pour l'observation directe de la taille et de la morphologie des VE. Analysés sous forme de vésicules entières montées sur des grilles, fixées et contrastées dans un mélange d'acétate de furanyle et de méthylcellulose (Raposo et al. 1996), les VE ont un aspect en forme de coupe. Cette apparence morphologique est un artefact de l'étape de fixation/contraste qui induit la contraction des structures subcellulaires. Les exosomes observés par cryo-EM (technique par laquelle les échantillons sont vitrifiés dans de l'éthane liquide pour empêcher la formation de cristaux de glace qui peuvent altérer l'ultrastructure des cellules et des membranes) ont une forme ronde (Raposo and Stoorvogel 2013). Parmi les autres techniques de microscopie électronique, plus récemment utilisées dans la préparation des VE, on peut citer la microscopie à force atomique, une variante de la ME à balayage (Sharma et al. 2011) dans laquelle une sonde mécanique mesure la taille et la structure des VE individuels dans leur état naturel. Lorsqu'elle est analysée de façon quantitative, c'est-à-dire, en mesurant des centaines d'éléments individuels dans chaque échantillon, plutôt que de montrer une image d'une seule vésicule, toutes ces études de microscopie ont mis en évidence l'hétérogénéité des VE.

Quant aux vésicules plus grosses, elles peuvent être visualisées par microscopie à fluorescence. Etant donné la limite de résolution de 200 nm des microscopes optiques classiques, les objets ainsi observés ne sont pas des vésicules individuelles mais plutôt des VE concentrées ou agrégées, voire agrégées avec les anticorps ou fluorophores utilisés pour le marquage. Les progrès récents de la microscopie à super-résolution mèneront éventuellement à de nouvelles technologies d'analyse des petites et grandes vésicules, mais elles ne sont pas encore disponibles comme outil de caractérisation de base des VE.

2. Rôle des vésicules extracellulaires cardiaques endogènes dans un contexte sain et pathologique

De nombreux rôles ont été attribués aux VE. Il a été mis en évidence leur participation dans l'hémostase avec le transport de molécules pro- ou anti-coagulantes et fibrinolytiques (Gao et al. 2013). Elles vont également avoir un rôle dans le développement embryonnaire par le transport de protéines (ex : Wnt et Hedgehog) impliquées dans la régulation de la croissance et la différenciation des cellules au cours du développement (McGough and Vincent 2016). Elles sont aussi décrites comme messenger du système immunitaire inné et ont un rôle ou anti-inflammatoire selon le contexte (Boilard et al. 2010). Elles vont également être impliquées dans de nombreux processus physiologiques tels que le développement du système nerveux, la calcification osseuse, la grossesse, l'homéostasie du foie ou la réparation tissulaire (Yáñez-Mó et al. 2015). Dans les paragraphes suivants, nous nous intéresserons plus précisément à l'implication des VE dans le tissu cardiaque dans un contexte sain et pathologique.

Le cœur humain adulte est composé de milliards de cellules, dont près d'un tiers sont des CM, tandis que le reste est composé de cellules endothéliales (CE), de cellules musculaires lisses, de cellules neuronales, de CS résidentes et de fibroblastes (Zhou and Pu 2016). La communication intercellulaire dans les états sains et malades est très probablement différente et il est donc crucial de l'étudier (Chistiakov, Orekhov, and Bobryshev 2016; Garcia et al. 2016; Yang et al. 2016). Gupta et Knowlton ont été les premiers à décrire la libération d'exosomes par les CM de rats adultes et ont observé que ces exosomes contiennent la Heat Shock protéine 60 (HSP60) qui peut protéger les cellules contre les lésions comme celles générées lors d'un l'IDM (Gupta and Knowlton 2007). Il a ensuite été montré que les VE sécrétées par les cellules HL-1 (un modèle cellulaire de CM) transportaient des ARNm qui étaient captés par les fibroblastes en co-culture, et induisaient des changements dans l'expression génique des cellules cibles (Waldenström et al. 2012). Le même groupe a démontré que la stimulation par TGF- β 2 et PDGF-BB modifiait la teneur en ARN des exosomes sécrétés par les cellules HL-1, donnant ainsi foi à l'idée que les exosomes reflètent l'état physiologique des cellules mères (Gennebäck et al. 2013). De même, Garcia et al. ont montré que lorsqu'ils sont soumis à une privation *in vitro* (ici en glucose), les CM néonataux de rat libèrent plus d'exosomes. Des résultats similaires ont été observés suite à l'exposition à une hypoxie modérée. Yang et coll. ont mis en évidence que les exosomes sériques des patients

présentant un IDM aigu étaient enrichis en miR-30a. Ils ont également montré que les exosomes des CM hypoxiques libèrent plus de miR-30a et que ce miR régule l'autophagie des CM receveurs (Yang et al. 2016). L'hypoxie pourrait induire la libération de vésicules contenant des protéines ayant des activités opposées (ex : pro et anti-apoptotique). La sévérité et la durée de l'hypoxie moduleraient le contenu des vésicules (Yu et al. 2012).

Implication des vésicules cardiaques dans la communication CM – cellules endothéliales :

Les communications entre les cellules musculaires cardiaques et les CE intracardiaques jouent un rôle crucial dans le processus de régulation de la fonction des vaisseaux sanguins cardiaques assurant les besoins en oxygène et nutriments du myocarde. Il a été démontré que les VE sont impliquées dans les contacts myocytaires-endothéliaux cardiaques. Chez les CM de porcelets nouveau-nés soumis à l'hypoxie, la régulation à la hausse HIF-1 α conduit à l'induction de Hsp20 (Louapre et al. 2005). Hsp20 a une activité angiogénique induisant l'expression du récepteur 2 du VEGF dans les CE qui stimule l'angiogenèse cardiaque en réponse à une hypoxie. Il a été démontré que les exosomes dérivés de cellules progénitrices cardiaques stimulent la migration des CE qui peuvent être utiles pour la réparation cardiaque et la néovascularisation des tissus cardiaques infarciés (Vrijssen et al. 2010).

Il est intéressant de noter que ces effets ont été fortement influencés par l'origine des CM : lorsqu'ils ont été cultivés chez des rats sains, les exosomes ont favorisé l'angiogenèse. Par contre, lorsque les CM ont été préparés à partir de rats diabétiques, leurs exosomes ont favorisé la mort des CE et perturbé l'angiogenèse, peut-être par transfert de miR-320 (Wang et al. 2016; Xiaohong Wang et al. 2014). De plus, les exosomes des myocytes cardiaques soumis à une surpression cardiaque ont montré qu'ils délivraient des récepteurs fonctionnels de l'angiotensine II de type 1 (AT1R) aux CM, aux myocytes squelettiques et aux vaisseaux de résistance mésentérique et étaient suffisants pour donner une réponse de pression artérielle à l'angiotensine II en perfusion à des souris knockout AT1R (Pironti et al. 2015). Il a été démontré que les exosomes des CM hypoxiques régulent la mort cellulaire d'autres CM (Zhang et al. 2008). De plus, il existe des preuves préliminaires que les exosomes sécrétés par les CM dans l'IDM aigu contiennent du TNF- α , un médiateur de l'inflammation (Yu et al. 2012). A contrario, dans un autre protocole de co-culture, il a été démontré que les exosomes libérés par les CE étaient enrichis en miR-143/145 et étaient transférés dans des cellules musculaires

lisses, contrôlant alors leur expression génétique, pour activer un programme athéroprotecteur (Hergenreider et al. 2012).

Bien que dans le contexte de soins aigus susmentionné, un pourcentage élevé des exosomes circulants pourraient avoir été d'origine cardiaque, dans des états physiologiques et pathologiques stables, on s'attend à ce que les exosomes plasmatiques et sériques proviennent d'une variété de sources cellulaires différentes, dont l'endothélium, les plaquettes et les leucocytes. On pense que les exosomes circulants ont une importance biologique (Davidson et al. 2018; Davidson, Takov, and Yellon 2017) et qu'ils pourraient jouer un rôle de médiation dans les réactions post-IDM (Vicencio et al. 2015).

Le liquide péricardique, qui est un ultrafiltrat plasmatique, contient également des exosomes, d'une origine cardiaque plus probable que le plasma ou le sérum périphérique (Beltrami et al. 2017). Les exosomes du liquide péricardique contiennent de la clusterine, une glycoprotéine capable d'améliorer la performance myocardique par la médiation de l'activation épicaudique, l'artériogénèse et la prolifération des CM (Foglio et al. 2015). De plus, les exosomes du liquide péricardique contiennent un miARN hautement proangiogénique : let-7b-5p et induisent une angiogénèse thérapeutique *in vitro* et *in vivo* (Beltrami et al. 2017).

Au vu de toutes ces données, il est légitime de spéculer que les exosomes, via les miARN et autres médiateurs, jouent un rôle important dans la communication cellule-cellule cardiovasculaire (paracrine) et la communication à distance (de type autocrine) et ceci est affecté par les états pathologiques (Van Rooij and Olson 2012).

3. MicroARN exosomiques cardiaques comme biomarqueurs diagnostiques de l'infarctus aigu du myocarde

Dans l'IDM aigu, les lésions myocardiques entraînent l'apparition rapide de biomolécules spécifiques des CM dans la circulation sanguine, un phénomène utile pour un diagnostic précoce de l'IDM. À ce jour, la détection des troponines cardiaques circulantes (comme la troponine I et la troponine T) est largement utilisée pour le diagnostic. Cependant, la troponine I n'est pas un indicateur spécifique des lésions cardiaques post-IDM, puisque ses concentrations plasmatiques peuvent éventuellement augmenter en cas d'insuffisance rénale chronique, d'embolie pulmonaire et après une chirurgie non cardiaque (Mannu 2014).

Les CM produisent de nombreux miARN ; quatre d'entre eux (miR-1, miR-133a/b, miR-208a et miR-499) sont spécifiquement et/ou abondamment exprimées dans ces cellules (Li et al. 2012). Les miARN cardiaques spécifiques jouent un rôle crucial dans la régulation de la cardiogénèse et de la fonction cardiaque (c.-à-d. la contractilité et la conductance) (Malizia and Wang 2011; Mitchelson 2015; Oliveira-Carvalho, Carvalho, and Bocchi 2013). Dans les lésions cardiaques, ces miARN apparaissent rapidement dans le sang, indiquant des lésions myocardiques (Corsten et al. 2010; Kuwabara et al. 2011). Dans le cas de l'IDM, les taux plasmatiques de miARN cardiaques spécifiques sont considérablement augmentés. Par exemple, chez les patients ayant subi un IDM, les concentrations plasmatiques de miR-208b pourraient être 1600 fois (Corsten et al. 2010) voire 3000 fois (Gidlöf et al. 2011) plus élevées que chez les sujets sains. Les miARN cardiaques spécifiques pourraient être détectés dans le sang plus tôt (<4 h après l'IDM) que les troponines cardiaques, ce qui indique leur avantage potentiel pour un diagnostic plus précoce de cette pathologie (Chen et al. 2015). En outre, plusieurs études ont montré que la détection des miARN circulants spécifiques du cœur dans l'IDM a une meilleure sensibilité et spécificité que la troponine T (Devaux et al. 2015; Olivieri et al. 2013; Sayed et al. 2013). De plus, des miARN exosomaux spécifiques du cœur pourraient être détectés dans l'urine de patients atteints d'IDM, contrairement aux troponines (Cheng et al. 2012). En fait, ces observations suggèrent une valeur potentielle, des miARN cardiaques circulants comme biomarqueurs diagnostiques prometteurs pour le diagnostic précoce de l'IDM (Cheng et al. 2014).

Cette augmentation de VE/exosomes libérés par les cellules endommagées du muscle cardiaque reflète une réaction d'adaptation, avertissant les autres cellules d'une lésion cardiaque. Les miARN cardiaques spécifiques régulent l'expression des gènes sarcomériques (tels que miR-208 et miR-499) et des gènes des canaux ioniques impliqués dans la conductance cardiaque, la rythmicité et l'automatisme (tels que miR-1 et miR-133a). Les miARN cardiaques spécifiques présentent également des propriétés anti-apoptotiques (miR-133a et miR-499), anti-fibrotiques (miR-133a) et anti-oxydantes (miR-1). Ainsi, la libération post-IDM d'exosomes contenant des miARN cardiaques spécifiques est essentielle pour la cardioprotection et l'induction de la réparation des tissus cardiaques.

4. Vésicules extracellulaires/exosomes comme médiateurs de la thérapie cellulaire dans l'infarctus du myocarde et l'insuffisance cardiaque

Ces dernières années, de nombreuses publications ont permis de mettre en évidence, comme précédemment mentionné, l'implication des VE dans l'initiation et/ou la participation à la progression d'une pathologie. De nombreuses stratégies ont été développées dans le but d'inhiber les VE, notamment dans les cancers (Marleau et al. 2012). A l'opposé, dans le cas de la thérapie cellulaire, les VE seraient responsables de l'effet bénéfique des cellules mères et contiendraient les molécules actives.

En effet, différents types de CS (et de cellules progénitrices, comme les CSM, les CSE, les CSH et les CSC, ont démontré leur capacité à se différencier en CM (ou en cellules de type « cardiomyocytaire ») et en cellules vasculaires a minima *in vitro* (Dixit and Katare 2015; Nosedá, Abreu-Paiva, et al. 2015). De plus, comme mentionné précédemment, les CS et progénitrices favorisent la survie des cellules cardiaques et l'angiogenèse par des actions paracrines (Donndorf et al., 2013). Dans la recherche de nouvelles solutions thérapeutiques pour la cardioprotection, la cardiomyogénèse et l'angiogenèse, différents types de CS et progénitrices ont été testés sur des modèles animaux d'IDM, suivis des premiers essais cliniques, souvent à petite échelle, chez l'Homme. Les thérapies à base de CS se sont révélées prometteuses dans les modèles précliniques (Chong et al. 2014b; Nosedá, Abreu-Paiva, et al. 2015; Orlic et al. 2001). Toutefois, les résultats des premiers essais cliniques ont été moins concluants et ont stimulé un fort débat scientifique, qui sera fondamental pour les progrès futurs de ce domaine de recherche. Plusieurs études chez l'Homme et chez l'animal ont mis en évidence qu'à quelques exceptions près, la majorité des CS injectées se greffaient très mal dans le cœur du receveur et que le taux de différenciation en myocytes et CE était également limité *in vivo* (Kim et al. 2015; Nosedá, Harada, et al. 2015; Vrtovec et al. 2011). Ces conclusions suggèrent donc un effet des CS et des cellules progénitrices par le biais de mécanismes paracrines jusqu'alors inconnus (Glembotski 2017). Dans le même ordre d'idées, de multiples rapports scientifiques ont démontré que les CSM, les CSE, les CPC et les iPSC médiaient le remodelage cardiaque par des signaux paracrines (Kervadec et al. 2016; Khan et al. 2015; Nosedá, Abreu-Paiva, et al. 2015). Il a également été mis en évidence que la communication intercellulaire entre les CS et les cellules environnantes induisait l'angiogenèse et prévenait

l'apoptose des CM par des mécanismes paracrines (Lui et al. 2013; Xiao et al. 2016). Tous les signaux paracrines ne sont pas des facteurs solubles qui peuvent facilement se déplacer dans l'environnement extracellulaire pour atteindre leurs cellules réceptrices cibles avant d'être dégradés. Cependant, une série d'autres messagers peuvent être transportés par des exosomes et autres VE (Santangelo et al. 2016). Dans le cadre des activités paracrines des CS et d'autres cellules, les VE fonctionnent comme « des navettes » de miRs et d'autres formes moléculaires, conférant ainsi une protection contre la dégradation et aidant leur localisation vers les cellules réceptrices. De multiples études ont montré que les exosomes dérivés de CS induisaient des capacités de protection et de régénération (Emanuelli et al. 2016; Xu, Chen, and Yang 2017) (Figure 27). Kang et coll. ont montré que les exosomes dérivés de CSM surexprimant CXCR4 activaient la voie de signalisation Akt *in vitro* et dans un modèle IDM murin (Kang et al. 2015). Les résultats *in vitro* ont montré des effets cytoprotecteurs des exosomes sur les cardiomyocytes, induisant une surexpression du VEGF et augmentant ainsi par la suite la formation des vaisseaux. *In vivo*, l'implantation de feuillets cellulaires, composés de CSM prétraités avec des exosomes, sur la zone infarctée du myocarde, entraîne une réduction de la taille de l'infarctus par survie cellulaire, un meilleur remodelage cardiaque et une augmentation de l'angiogenèse (Kang et al. 2015). De plus, les exosomes dérivés des CSM ont induit l'angiogenèse et facilité les communications athéro-protectrices par le miR-126 et le miR-294, respectivement (Gonzalez-King et al. 2017; Vickers et al. 2011). En sus, Lai et al. ont identifié un effet cardioprotecteur des exosomes sécrétés par les CSM humaines d'origine embryonnaire dans un modèle murin d'ischémie/reperfusion (Lai et al. 2010). Shao et al. ont, quant à eux, mis en évidence que les exosomes dérivés des CSE contiennent les miR-24 et -29, favorisant la réparation cardiaque (Shao et al. 2017). Des exosomes enrichis en miR-146, injectés dans des cœurs lésés de souris, inhibent l'apoptose, favorisent l'angiogenèse et la prolifération des CM, agissant ainsi sur les étapes critiques post-ischémie afin de permettre une protection et une régénération cardiaque efficace (Ibrahim, Cheng, and Marbán 2014). Sahoo et coll. ont démontré que les exosomes sécrétés par les CS CD34⁺ de la moelle osseuse avaient des effets pro-angiogéniques lorsqu'ils étaient testés *in vitro* et sur un modèle murin d'ischémie et que leur effet thérapeutique était au moins comparable à celui de la transplantation des cellules mères (Bang et al. 2014; Sahoo et al. 2011). Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres populations cellulaires. En effet, des études ultérieures ont démontré que les exosomes dérivés de cellules progénitrices cardiaques

jouent un rôle dans la survie des CM après IDM via le miR-21 et dans la protection cardiaque via le miR-451 (Chen et al. 2013a; Xiao et al. 2016). La Figure 27 présente un aperçu des effets des exosomes/VE dérivés des CS sur le cœur.

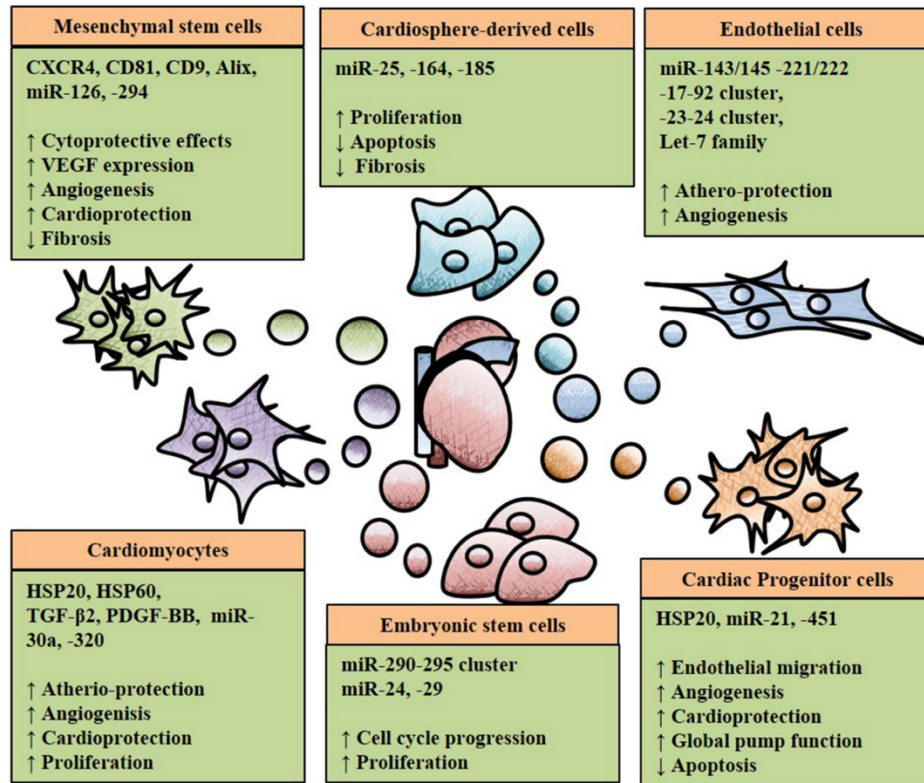


Figure 27 : Revue de six différents types cellulaires sécrétant des VE ayant un potentiel thérapeutique cardiaque (Shanmuganathan et al. 2018).

5. Thérapies à base d'exosomes ou de vésicules extracellulaires

La fonction naturelle des exosomes à protéger, cibler et délivrer des composants cellulaires aux cellules réceptrices font d'eux de nouveaux outils pour la médecine régénérative. De plus, il peut être possible de concevoir artificiellement des exosomes (Arenaccio et al. 2018), permettant de protéger une cargaison, y compris des miARN, et les administrer à un patient ayant un infarctus aigu, pour favoriser la cardioprotection et l'angiogénèse thérapeutique, et/ou une hémorragie cardiaque, pour favoriser la régénération cardiaque (Sluijter et al. 2018).

L'utilisation d'exosomes naïfs dérivés de CS ou d'exosomes préparés pour transporter une charge spécifique de médicaments est une approche potentielle envisagée. Le premier à avoir mis en évidence l'administration d'acides nucléiques par médiation exosomale a été MJ Wood

en injectant des exosomes de souris contenant de l'ARN interférence (siRNA) pour détruire la BACE1, une cible thérapeutique dans le cadre de la maladie d'Alzheimer (Alvarez-Erviti et al. 2011). D'autres, ont publié des protocoles pour manipuler la cargaison interne de l'exosome (Beltrami et al. 2017). Il est important de noter que dans des études cliniques, des exosomes ont déjà été utilisés comme vecteurs médicamenteux favorisant le rejet de tumeurs chez les patients (Rountree et al. 2011). De même, ils ont été utilisés dans le cancer de la prostate, le cancer du poumon et dans les milieux précliniques comme agents anti-inflammatoires et pour inhiber un cancer multirésistant en transportant le paclitaxel chimiothérapeutique chez la souris (Kim et al. 2016; Sun et al. 2016). Certaines technologies prometteuses sont apparues dans la recherche sur les exosomes pour les pathologies cardiovasculaires, comme la reprogrammation directe des fibroblastes sur les myocytes cardiaques. Il a été montré que les fibroblastes injectés par voie intramyocardique qui avaient été engagés avec des exosomes dérivés de cellules dérivées de cardiosphères augmentaient la fonction pompe globale et la densité vasculaire tout en réduisant la taille de la zone infarctée dans des modèles murins d'IC chronique (Gallet et al. 2017; Tseliou et al. 2015). Cet effet aurait pu être médié en partie par le miR-146a (Ibrahim et al. 2014).

Afin d'améliorer la transmission des messages thérapeutiques à l'intention des cellules cardiaques dans le besoin, les exosomes peuvent être conçus pour modifier leur cargaison et leurs membranes. Vandergriff et al. ont conjugués des exosomes avec des peptides de ciblage cardiaque pour cibler les CM *in vitro* et *in vivo* dans un modèle animal d'ischémie/reperfusion (Vandergriff et al. 2018). Les résultats prometteurs ont montré une réduction de la taille des zones infarctées et une augmentation de la prolifération cellulaire et de l'angiogenèse.

La recherche du contenu exosomal le plus adapté pour la réparation cardiaque conjugué à des peptides permettant un ciblage optimal demeure un défi pour les MCV (Kuehbacher et al. 2007). Pour obtenir une régénération complète avec un myocarde fonctionnel, les cellules endothéliales doivent être spécifiquement ciblées pour la formation des vaisseaux sanguins, les CM pour la prolifération et les fibroblastes pour enlever le tissu cicatriciel excessif et faciliter la contraction cardiaque (Gallet et al. 2017; Vandergriff et al. 2018). Dans cette recherche d'une protection et d'une régénération cardiaque post-ischémique globale, des exosomes endogènes améliorés ainsi que des exosomes synthétiques d'inspiration naturelle pourraient jouer un rôle fondamental.

Les limites et avantages d'une thérapie acellulaire :

Les VE vont présenter de nombreux avantages comparés aux cellules incluant l'absence de noyau donc une absence de transformation néoplasique. Elles peuvent être modifiées que ce soit en terme de contenu ou de molécules de ciblage. De plus, par leur petite taille, elles évitent l'effet de premier passage pulmonaire et pénètrent profondément dans la plupart des tissus. Les VE vont également présenter l'avantage de posséder un potentiel immunogène limité par rapport à leurs cellules d'origine. Enfin elles ne peuvent pas provoquer de tératomes (Khan et al. 2015).

Cependant, de nombreux challenges restent encore à surmonter avant une application clinique à grande échelle. En effet, lors de la conception d'exosomes synthétiques ou d'exosomes d'origine naturelle comme outils thérapeutiques, les chercheurs font face à de nombreux obstacles avec l'isolement, la purification et la production à grande échelle et à un niveau clinique approprié (Li et al. 2018).

Dans la cardiopathie ischémique, les exosomes/VE naturels/modifiés pourraient remplacer et surpasser les thérapies à base de CS de première génération dont l'efficacité a été démontrée principalement par des actions paracrines. De plus, les exosomes pourraient jouer de concert avec les thérapies cellulaires améliorées et l'ingénierie tissulaire pour fournir des solutions thérapeutiques transformatrices à long terme.

POSITIONNEMENT DES TRAVAUX DE THÈSE

1. Positionnement des travaux de thèse

Dans les années 2000, l'UMR 703 INRA/Oniris a initié un programme de recherche dont l'objectif a été d'identifier un candidat cellulaire pour le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). En 2011, l'UMR a isolé, sur la base de ses propriétés d'adhérence tardive, un progéniteur myogénique dérivée du muscle squelettique, nommées cellules MuStem. L'injection systémique des cellules allogéniques MuStem dans le modèle canin pertinent de la DMD a permis de mettre en évidence leur efficacité thérapeutique (Rouger et al. 2011), laissant envisager un potentiel clinique en thérapie cellulaire régénérative de cet agent. Par la suite, cette population a été isolée à partir de prélèvements humains. Une caractérisation comportementale et phénotypique approfondie des cellules humaines, nommées hMuStem, a été produite avant le début de mes travaux de thèse (Lorant et al. 2018; Saury et al. 2018).

Forte d'une importante capacité proliférative, la population hMuStem est composée de progéniteurs myogéniques précoces d'origine périvasculaire. En effet, elle est caractérisée par l'expression d'une combinaison de marqueurs myogéniques (CD56, Myf5 et desmine), mésenchymateux (CD29, CD44, CD73, CD90 et CD105) et péricytaire (CD140b, CD146 et NG2). Elle est, par ailleurs, exempte de marqueurs hématopoïétiques (CD34 et CD45) et endothéliaux (CD31 et CD144). *In vitro*, outre leur capacité de différenciation myogénique, des potentiels ostéogéniques et adipogéniques ont pu être observés après induction dans des milieux spécifiques. *In vivo*, il a été mis en évidence, consécutivement à l'administration de ces cellules dans un muscle lésé de souris immunodéficientes, une capacité d'intégration au sein du tissu musculaire. De façon intéressante, les cellules participent activement à la régénération musculaire avec jusqu'à 80% de noyaux retrouvés dans les fibres et la production de protéines structurales humaines (Lorant et al. 2018). Dans une démarche préclinique, une étude a été menée parallèlement au laboratoire, afin de définir les modalités de préparation *in vitro* compatible pour la confection de lots cliniques (Saury et al. 2018).

Ces différents travaux positionnent la population MuStem comme candidat thérapeutique prometteur pour les affections musculo-squelettiques.

Parallèlement à cela, malgré de nombreuses avancées thérapeutiques dans la prise en charge actuelle de l'IDM, aucune solution ne permet le remplacement des cellules détruites et la restauration d'une architecture cardiaque fonctionnelle. C'est dans ce contexte, que l'utilisation des CS a émergé comme outil thérapeutique prometteur. Ainsi de nombreuses études ont été menées à la fois en préclinique et clinique, mettant en évidence le potentiel d'une thérapie cellulaire cardiaque que ce soit avec des progéniteurs cardiaques ou des CS exogènes.

C'est sur cette description initiale que se sont appuyés mes travaux de thèse.

2. Objectifs des travaux de thèse

La partie introductive a permis de décrire, dans un premier temps, la prise en charge actuelle de l'IDM qui reste incomplète malgré l'incidence qui ne cesse d'augmenter. Différents types de thérapie innovante sont en cours d'évaluation, parmi lesquelles, l'approche de thérapie cellulaire qui représente une proposition prometteuse. C'est sur cet état de l'art que dans un second temps, les différentes populations cellulaires investiguées ont été décrites ainsi que les difficultés et limites rencontrées. Dans un dernier temps et afin de mieux comprendre les possibles interactions et effets des cellules, un chapitre final s'est intéressé aux VE.

Mes travaux de thèse se sont inscrits dans cette démarche de recherche translationnelle engagée par le laboratoire afin de conforter le positionnement des cellules hMuStem comme candidat thérapeutique en médecine régénérative. Ils sont divisés en deux chapitres. Un axe principal d'étude du remodelage tissulaire et fonctionnel du cœur infarci suite à l'injection intramyocardique des cellules hMuStem et un axe secondaire d'analyse des VE produites par les cellules hMuStem

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Chapitre 1 : Remodelage tissulaire et fonctionnel du cœur infarci consécutivement à la greffe des cellules hMuStem

1. Positionnement

Compte tenu de l'incapacité intrinsèque du cœur à se réparer suite à une lésion telle que l'IDM (Hansson, Lindsay, and Chien 2009; Madonna et al. 2014), la transplantation intramyocardique de CS/progénitrices a suscité un grand intérêt pour rétablir la fonction cardiaque et prévenir le développement d'IC (Segers and Lee 2008). Au cours des deux dernières décennies, de nombreux types cellulaires ont fait l'objet d'une évaluation préclinique de leur potentiel régénératif. Ils correspondaient aux myoblastes (Beltrami et al. 2003; Menasché et al. 2003; Wang et al. 2017), aux BMMNC (Bel et al. 2003; De Silva et al. 2008), aux CSM (Gnecchi et al. 2006; Yang et al. 2019) et aux progéniteurs cardiaques endogènes, dont les CSC c-kit⁺ (Bolli et al. 2013a), CSC sca1⁺ (Matsuura et al. 2009) et CDC (Cheng et al. 2014). Des CSE (Richart et al. 2014; Romagnuolo et al. 2019) et des iPSC et des CM induits (Castro et al. 2019; Kawamura et al. 2012) ont également été testés. La réduction de la fibrose myocardique, la néovascularisation, la prévention de la dilatation du ventricule gauche et l'amélioration de la contractilité cardiaque locale ont été décrites successivement pour les CS de différentes origines (Chen et al. 2013; Schmuck et al. 2015; Zhang et al. 2015), entraînant une transition rapide aux essais cliniques pour un sous-groupe de ces types cellulaires.

Jusqu'à présent, des succès limités avec une efficacité à long terme modeste ont été obtenus dans les essais cliniques randomisés pour l'IDM, contrastant fortement avec les résultats précliniques encourageants (Menasche 2011). Les principales raisons invoquées étaient la faible survie et greffe des cellules injectées dans l'environnement cardiaque ischémique ainsi qu'une différenciation directe négligeable en cardiomyocytes et/ou cellules vasculaires (Makkar et al. 2012; Zeng et al. 2007).

Cependant, après la transplantation dans le cœur de souris adultes immunodéficientes atteintes d'IDM aigu, un type de CS dérivées du muscle murin isolées sur la base d'un défaut d'adhésion initial, a été décrit comme pouvant s'implanter dans la zone infarctée, induire une néo-angiogenèse et provoquer une amélioration significative de la fonction cardiaque (Oshima et al. 2005). Il est important de noter que ces différentes caractéristiques ont été

décrites comme étant beaucoup plus efficaces que celles obtenues avec les myoblastes dont la transplantation chez les petits et les gros animaux a été associée à une faible rétention, une diffusion limitée au point d'injection et des arythmies (Fernandes et al. 2006; Menasché 2004; Tambara et al. 2003).

Considérant les résultats prometteurs obtenus dans un contexte d'IDM avec les MDSC murines, il apparaît intéressant d'explorer le comportement de la population de CS hMuStem dans un tel contexte, afin d'élargir son champ d'application en médecine régénérative. Cela semble d'autant plus nécessaire que les données précliniques/cliniques obtenues jusqu'à présent avec les stratégies de thérapie cellulaire restent mitigées.

2. Résumé de la démarche expérimentale

Le détail du matériel et méthodes utilisés étant décrit dans l'article joint ci-après, seul un résumé des principaux points méthodologiques et des données complémentaires seront présentés ici.

Cette étude a été réalisée entre deux centres distants de Nantes et a permis la mise en place, pour la première fois, d'une collaboration entre l'UMR 703 INRA/Oniris et l'Institut du thorax. Ce projet pluridisciplinaire associe des compétences de l'UMR703 dans la thérapie cellulaire, la biologie des progéniteurs myogéniques, la biologie cellulaire et moléculaire et l'exploration *in situ* à celles de l'Institut du Thorax dans la physiologie, la physiopathologie cardiaque, la chirurgie, l'imagerie et l'exploration cardiaques.

a) Prélèvement musculaire humain

Parallèlement, le laboratoire, grâce à son partenariat avec le CHU de Nantes, a obtenu des prélèvements de muscles posturaux de jeunes patients, ne présentant pas de pathologie musculaire et opérés principalement dans un contexte de scoliose aigüe. Toutes les études réalisées pendant mes travaux de thèse ont été effectuées à partir de quatre lots différents de cellules issus de prélèvements distincts. Ces lots ont été caractérisés et injectés à passage P5.

b) Caractérisation des cellules hMuStem : Digital gene expression sequencing

Dans le but de compléter la caractérisation des cellules hMuStem, une analyse de séquençage à haut débit a été réalisée au laboratoire. A partir de 4 lots de cellules, des culots d'ARN ont été préparés. L'intégrité des ARN a été déterminée par le kit « Agilent Eucaryote Total RNA Nano kit » avec le bioanalyseur 2100 (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Un protocole de séquençage 3' ARN à haut débit (DGE-sequencing) (n=4) a été réalisé sur la plateforme GenoBird de Nantes. Les bibliothèques ont été formées à partir de 10 ng d'ADN total (Saury et al., unpublished).

c) Culture des cellules hMuStem en milieu de différenciation

Pour déterminer si la population hMuStem possède une capacité intrinsèque à s'engager dans la voie de différenciation cardiomyogénique, 3 lots de cellules hMuStem ont été placés dans leurs conditions de culture en 2 dimensions (2D) standard avec leur milieu de prolifération (M2Stem) et soumis à différents traitements précédemment démontrés comme induisant *in vitro* une différenciation cardiaque (Tableau IX). Tout au long des cultures (jusqu'à décollement du tapis cellulaire, J28-30), le milieu a été changé tous les 3 jours et à cette occasion des clichés de l'évolution des cultures ont été réalisés.

Tableau IX : Tableau récapitulatif des différents paramètres et molécules testés en culture 2D.

Coating	Cellstart, collagène et Matrigel
Support	P96 et P12
Milieu	M2Stem, DMEM, surnageant de cardiomyocytes
Pourcentage de sérum humain	2, 5 et 10%
Molécules et gamme de concentration	AR de 10^{-7} à 10^{-9} M et PDGF-BB 20 à 50 $\mu\text{g/l}$ + combinaison des deux molécules Cocktail : Activine-A, le BMP-2, le VEGF, le TNF- β et l'IGF-1 +/- EGF et bFGF
Densité cellulaire au moment de l'induction	40, 60 et 80% de confluence
Temps d'ajout de la ou des molécules testée(s)	Toutes les 36 ou 72h

d) Réalisation de culots secs

Dans un premier temps, les cellules ont été rincées avec du PBS à 37°C avant d'être incubées 5 min avec une solution de TrypLE™ Select CTS™ (Gibco, Life technologies) dilué au tiers. Après centrifugation à 400 g, les culots cellulaires ont été repris dans du PBS chaud et dénombrés. Des culots secs d'un nombre précis de cellules ont été alors réalisés et congelés à -80°C.

e) Extraction ARN et traitement DNase

Les ARN totaux ont été extraits à partir de culots secs de cellules grâce au kit RNeasy mini kit (Qiagen, Santa Clara, CA, USA) selon les instructions du fournisseur. Le dosage des ARN extraits a été réalisé au Nanodrop (Nanodrop technology, ÇA, USA). 0,5 µg d'ARN a servi à la réverse transcription (RT) grâce à la GoScript reverse transcriptase (Promega, Madison, USA) dans un volume final de 20 µL.

Le kit « DNA-free™ Kit » (Ambion) va permettre, grâce à l'utilisation de la DNase I recombinante, d'éliminer les contaminants ADN mais également, dans un second temps, par l'ajout de « DNase Inactivation Reagent », d'éliminer à la fois la DNase I et les cations divalents qui pourraient catalyser la dégradation des ARN.

La RT des ARN a été effectuée grâce au kit « GoScript™ Reverse Transcription System » (Promega). Pour une concentration d'ARN de 0,05 µg/µL, 0,5 µg d' amorces aléatoires (random primers) ont été ajoutés. L'hybridation a été réalisée pendant 5 min à 70°C. La RT est effectuée en présence de tampon de réaction « Goscript™ 5X Reaction Buffer » auquel ont été ajoutés du MgCl₂ (2,5 mM), des dNTP (0,5 mM), un inhibiteur de ribonucléases « Recombinant Rnasin Ribonuclease inhibitor » (20 U/µL) et l'enzyme « Go Script Reverse Transcriptase » (1,25 U). Le thermocycleur « Labcycler Gradient » (SensoQuest, Germany) a été programmé pour réaliser un cycle composé de 5 minutes à 25°C puis d'1 heure à 42°C pour la synthèse des brins et 15 minutes à 70°C.

f) PCR quantitative

La qPCR a été réalisée sur les RT obtenues. Deux protocoles distincts ont été utilisés en fonction du type d'amorces selon les recommandations du fabricant (myogénine et Myf5 : marqueur myogénique; Nkx2.5, RYR, TBX5, TNNT2, SCN5A, MYH7 : marqueurs cardiaques et RPS18 : gène de ménage). Le kit MESA Blue qPCR MasterMix Plus for SYBR® (Eurogentec™) et

le kit TaqMan® universal PCR Master Mix (Life technologie™) qui permet une détection plus sensible de facteurs peu exprimés pour les marqueurs cardiaques ont été utilisés. Les amorces TaqMan ont été testées et approuvées par le fabricant.

g) Design expérimental de l'étude *in vivo*

Tout d'abord, lors d'une étude pilote, une validation de l'implantation et du devenir des cellules hMuStem dans le myocarde a été réalisée. Ces rats (groupe « sham ») n'ayant pas subi de ligature coronaire, mais uniquement le passage du fil de suture, ont été injectés une semaine plus tard. L'implantation myocardique des cellules a été évaluée 24h, 6 jours et 21 jours après leur injection selon un protocole d'immunohistochimie utilisant un anticorps spécifique anti-lamine A/C humaine. L'immunodéficiência des rats a été évaluée en collaboration avec la plate-forme TRIP (Nantes). De plus, l'impact de cette injection sur l'activité électrique et contractile du cœur a été évalué par échographie et ECG. Les rats sélectionnés sont des mâles afin de ne pas interférer avec la disponibilité de la cohorte femelle sur laquelle l'induction de l'infarctus est réalisée sur le site de l'Institut du thorax.

Consécutivement, l'étude principale, a consisté en la transplantation des cellules hMuStem dans un modèle d'IDM. L'impact de la xénotransplantation sur la fonction électrique et contractile cardiaque après IDM a été étudiée sur une période de 4 semaines. Afin de compléter cette exploration fonctionnelle, une étude tissulaire et moléculaire a été menée (immunohistochimie, PCR) au sein de l'UMR 703 INRA/Oniris. L'IDM est obtenu par ligature définitive de l'artère coronaire marginale gauche chez le rat immunodéficient. Ce modèle classiquement utilisé, n'est pas le plus pertinent cliniquement dans la mesure où, aujourd'hui une proportion importante de patients pris en charge bénéficient d'une reperfusion coronaire. Il permet cependant d'obtenir des tailles reproductibles d'infarctus, dont les limites anatomiques sont facilement identifiables et c'est donc le modèle de choix pour établir la preuve de concept de l'intérêt des cellules hMuStem dans la prise en charge de la cardiopathie ischémique.

h) Animaux

Toutes les expérimentations animales ont été réalisées à l'UTE (Unité Thérapeutique Expérimentale), structure située à l'Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes

(IRS-UN). Les procédures expérimentales mises en place lors de ce travail ont été approuvées préalablement par le CEEA (Comité d'Éthique en Expérimentation Animale - Pays de la Loire). Afin de pouvoir réaliser ces expérimentations en étroite collaboration avec G. Toumaniantz et A. Hivonnait de l'Institut du Thorax (IRS, Nantes), j'ai suivi successivement sur 2016 et 2017 deux formations réglementaires, à savoir la formation à l'expérimentation animale niveau concepteur – « rongeurs et lapins » et la formation de base en chirurgie chez le rongeur complété par le module cathétérisation vasculaire chez la souris.

i) Préparation des sérums

Des prélèvements de sang ont été réalisés sur les animaux à différents temps (basal, à J15 et J21 post-transplantation). Le sérum a été obtenu après centrifugation 15 min à 1500 g à 4°C. En contrôle, des rats non-immunodéficients (n=3) ayant subi le même protocole ont été inclus.

j) Cytométrie en flux

Les cellules hMuStem ont été resuspendues dans du PBA (tampon phosphate salin 1X, 10% Bovine Serum Albumin, 0.1% sodium azide) et distribués dans des plaques de microtitrage 96 puits (Nunc Inc., Naperville, IL). Les IgG antihumaines ont été détectées en incubant les cellules avec des sérums individuels de rat inactivés par la chaleur (dilués 1/5, 1/40 et 1/160 en PBA) pendant 30 minutes à 4°C, puis en incubant avec une IgG antihumaine conjuguée FITC (Jackson ImmunoResearch). La fluorescence a été analysée à l'aide d'un cytomètre FACSVerse (BD Biosciences) et du logiciel FlowJo® (TreeStar, Inc., Ashland, OR).

k) Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart-type. L'analyse statistique entre les échantillons a été effectuée par un test de Mann-Whitney en utilisant le logiciel GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Les différences associées aux valeurs de probabilité $< 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

3. Résumé des résultats obtenus

Dans la présente étude, nous avons fourni des données originales sur le potentiel de réparation de cette population de CS adultes dans un contexte d'IDM, qui sous-tend son utilisation potentielle en médecine régénérative.

Une première étude reposant sur l'administration des cellules MuStem dans un cœur sain nous a permis de valider la capacité d'implantation et de survie de nos cellules dans le myocarde. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'impact des cellules hMuStem dans un contexte pathologique. Dans cette étude, nous avons démontré que l'administration de cellules hMuStem dans la zone bordante de l'IDM était associée à leur persistance *in situ* au niveau du tissu cicatriciel, à une atténuation du remodelage tissulaire néfaste du ventricule gauche et à une amélioration de la fonction cardiaque dans les semaines suivantes. Les zones infarctées et en particulier la fibrose globale ont été réduites chez les rats ayant reçu l'injection de cellules hMuStem par rapport au groupe témoin. L'angiogenèse et la néo-myogenèse se sont avérées être les principaux facteurs de préservation de l'architecture du myocarde ventriculaire gauche.

De plus, il a été mis en évidence que consécutivement à l'administration intramyocardique, la moitié des cellules hMuStem implantées dans la région infarctée contribuaient à générer principalement des fibres squelettiques, ce qui pourrait être une preuve de sa spécification dans son tissu original. Des fibres beaucoup moins fréquentes présentaient un phénotype cardiaque. Cependant aucun phénotype hybride n'a été observé. De façon intéressante, une fraction importante des cellules souches hMuStem implantée dans les tissus infarctés ne se sont pas directement différenciées, mais ont plutôt adopté un emplacement interstitiel.

D'autre part, l'arythmogénèse, qui est un risque majeur consécutif à la mise en place d'une thérapie à base de CS dans les pathologies cardiaques, a été renseignée. Fait intéressant, bien que l'implantation des cellules hMuStem et leur maintien aient été confirmés, aucune arythmie ou modification des propriétés électriques cardiaques (fréquence cardiaque, conduction cardiaque et repolarisation ventriculaire) n'ont été observées en plus de celles produites par l'infarctus. De plus, un résultat majeur de cette étude a été la préservation de la fraction d'éjection du ventricule gauche trois semaines après la transplantation des cellules hMuStem.

En résumé, le protocole de greffe de cellules souches hMuStem dans un contexte d'IDM développé dans cette étude a révélé de façon originale la capacité de cette population bien que d'origine musculaire squelettique à s'implanter dans un cœur infarci conduisant à une atténuation du remodelage tissulaire néfaste associé à une amélioration des performances du ventricule gauche sans induire d'arythmies.

4. Résultats

a) Marqueurs cardiomyogéniques de la population hMuStem

Les cellules hMuStem correspondent à une population de progéniteurs myogéniques précoces non engagés dans la lignée cardiaque. Afin de compléter cette caractérisation, nous nous sommes intéressés aux résultats obtenus dans une étude de DGEseq réalisée au laboratoire (Saury et al., données non publiées). Sur ces données, une recherche spécifique des gènes d'origine cardiaque, a été effectuée (Figure 28).

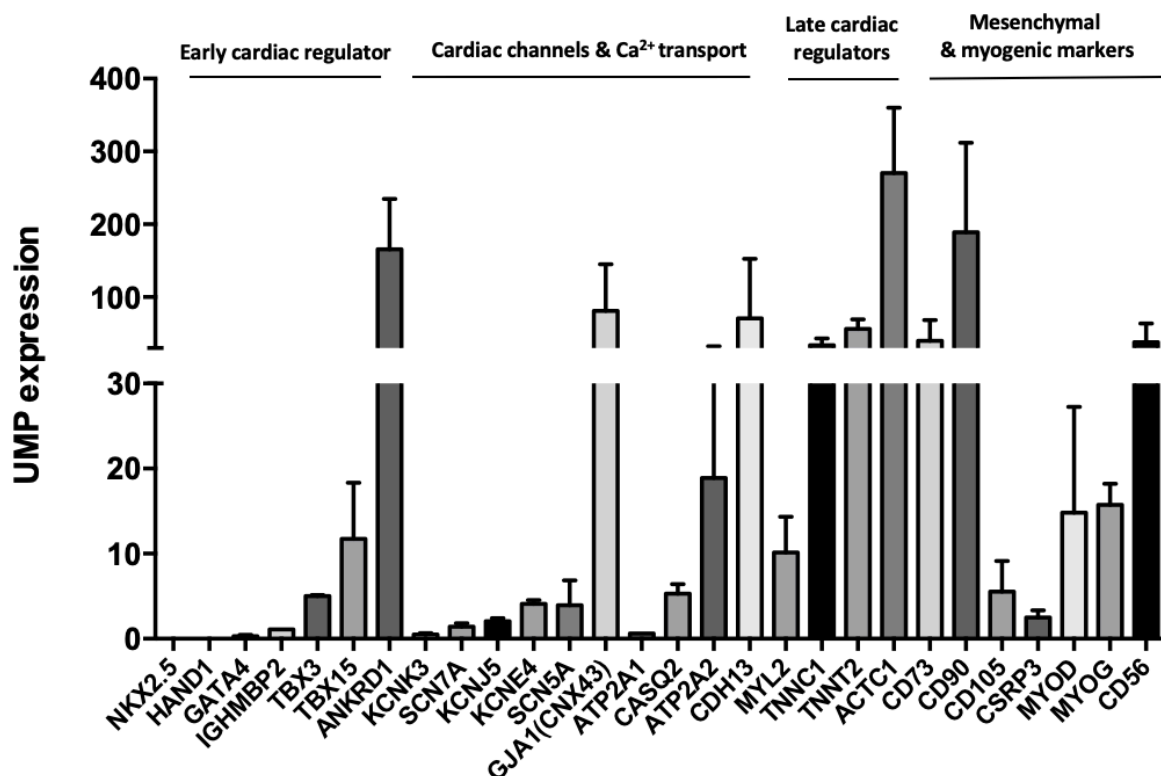


Figure 28 : Phénotype spécifique de la population de cellules souches hMuStem déterminé par une étude globale de DGEseq (n=4).

Nous observons une expression faible ou une absence d'expression des marqueurs précoces d'engagement cardiomyogénique (NKX2.5 ; GATA4...), ainsi qu'une faible expression des

marqueurs cardiaques classiques (SCN5A ; ATP2A1...). Seuls ANKRD1 (ankyrin repeat domain 1) et GJA1 (Connexine-43) sont fortement exprimés. Le premier gène code un facteur de transcription décrit comme un régulateur négatif de l'expression des gènes cardiaques et le second, une protéine impliquée dans les connexions intercellulaires et dont le transcrit est présent dans de nombreux types cellulaires comme les CSM (Wiesner et al. 2018). De nombreux marqueurs structuraux cardiaques et squelettiques (ACTC1 ; TNNT2 ; TNNC1...) sont exprimés. Cependant aucun n'est cardio-spécifique ce qui suggère l'absence d'engagement cardiomyogénique. Cette étude nous permet également de confirmer la signature périvasculaire mésenchymateuse des cellules (CD73, CD90...).

Cette étude globale, réalisée sans a priori, complète la signature moléculaire de nos cellules et démontre que nous sommes bien face à un progéniteur myogénique précoce non engagé dans la lignée cardiaque.

b) Etude du potentiel de différenciation cardiomyogénique des cellules hMuStem

Pour déterminer si la population hMuStem possède une capacité intrinsèque à s'engager dans la voie de différenciation cardiomyogénique, les cellules hMuStem ont été placés dans leurs conditions de culture 2D standards avec leur milieu de prolifération et soumis à différents types de traitements précédemment démontrés comme induisant *in vitro* une différenciation cardiaque (Sachinidis *et al.*, 2003 ; Invernici *et al.*, 2008) : acide rétinoïque [AR] seul (gamme de 10^{-7} à 10^{-9} M), platelet-derived growth factor-BB [PDGF-BB] seul (gamme de 20 à 50 $\mu\text{g/l}$). Ces 1^{ères} gammes ont permis de valider le support plaque P12 avec un revêtement collagène, lequel permet de garder les cultures primaires une trentaine de jours sans décollement du tapis cellulaire (Figure 29). Concernant les morphologies cellulaires observées deux types principaux ont été observés (A) : la présence d'un maillage composé de cellules allongées et fines ou un tapis cellulaire composé de cellules rondes semblant présenter un cytoplasme chargé.

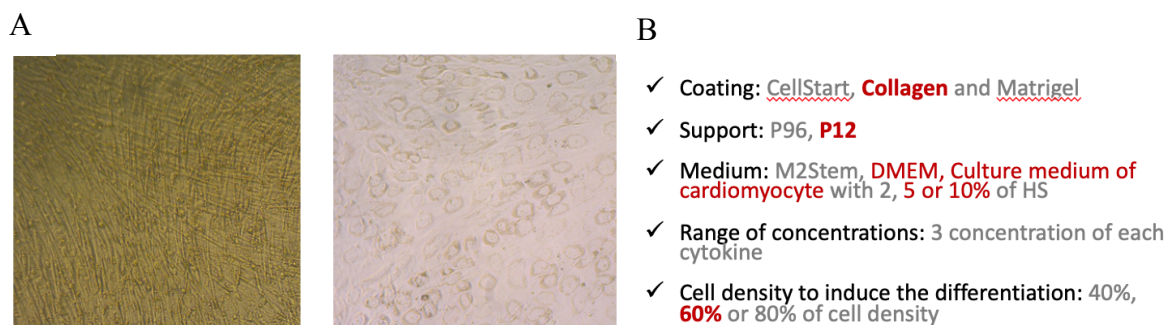


Figure 29 : A) Illustrations représentatives des 2 types de culture obtenus grâce à la validation des premiers éléments après ajout des différentes combinaisons d'AR et de PDGF-BB. B) Elements en rouges ont validés pour le coating, le support, le milieu et la densité cellulaire au moment de l'induction suite aux premiers tests réalisés.

Suite aux premiers tests, d'autres éléments ont pu être validés ou éliminés (B). En effet, un milieu M2Stem, sûrement trop riche, ne permettait pas un arrêt de la prolifération des cellules et a donc été éliminé. A contrario, une supplémentation en sérum humain de seulement 2% conduisait à un stress cellulaire trop important. Afin de remédier au décollement précoce du tapis cellulaire, empêchant de maintenir les cultures suffisamment longtemps pour une différenciation, différents pourcentage de confluence au moment de l'induction ont été testés. Une trop forte confluence, sans arrêt de la prolifération malgré l'ajout des molécules cardiomyogéniques ont conduit à un décollement du tapis cellulaire précoce (après env. 15 jours de culture). A l'inverse, un trop faible pourcentage de confluence a conduit à un stress cellulaire conduisant à l'apoptose.

Une fois ces premiers tests effectués, nous nous sommes intéressés aux différentes morphologies cellulaires obtenues au cours du temps en fonction des différentes combinaisons moléculaires réalisées (Figure 30). En effet, dans les différents articles utilisant ces molécules, il a été décrit une augmentation de la taille et un étalement cellulaire 3 jours après l'induction et l'apparition des premiers battements et un diamètre cellulaire d'environ 15 μm 15 jours après l'induction (Invernici et al. 2008; Sachinidis et al. 2003). Nous avons pu observer de longues cellules fines sous forme de maillage avec dans certains cas, la présence d'épaississements (Figure 30).

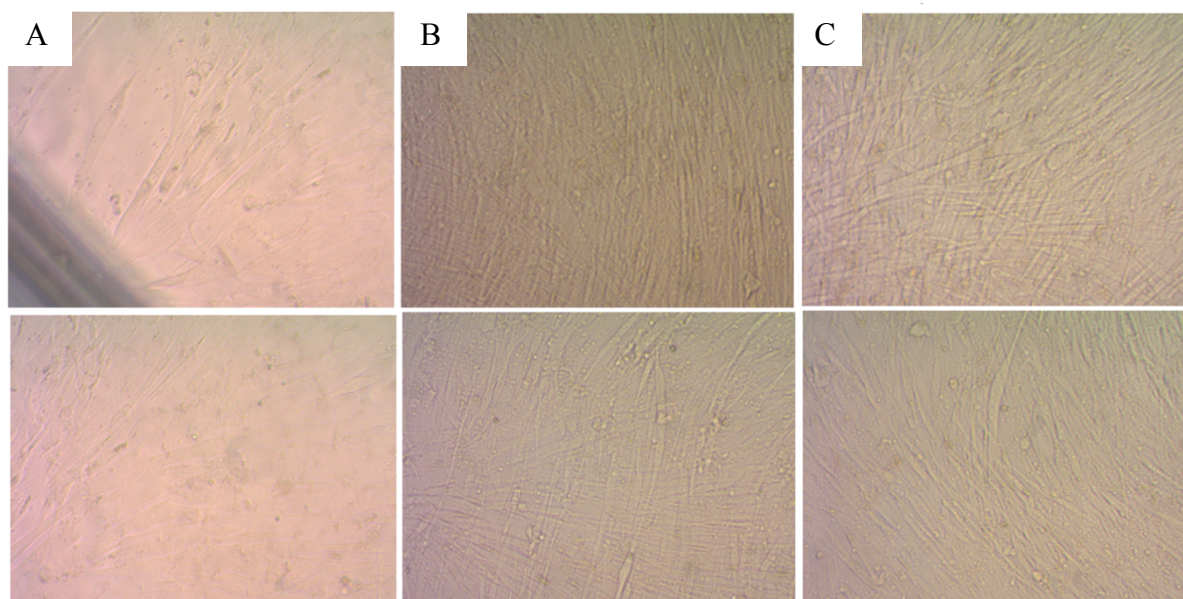


Figure 30 : Morphologies cellulaires obtenues suite aux différentes combinaisons testées. A) Présence de longues cellules fines suite à l'ajout d'AR à une concentration de 10^{-8} M. B) Densité cellulaire plus faible et présence d'un maillage suite à l'ajout de PDGF-BB à une concentration de $40 \mu\text{g/L}$. C) Présence de quelques épaissements suite à l'ajout d'AR à 10^{-9} M et de PDGF-BB à $50 \mu\text{g/L}$.

Les différentes combinaisons de milieux et de facteurs d'induction testées n'ont pas permis de mettre en évidence de changement majeur évocateur d'une orientation vers la lignée cardiomyogénique. Seuls quelques rares épaissements étaient présents avec une présence majoritaire de cellules longues et fines sans arrêt de la prolifération conduisant, après trente jours de culture, à un tapis cellulaire composé de multicouches. Afin de remédier à cette absence de la prolifération normalement induite par l'ajout des molécules, des tests ont été effectués avec un ajout de l'AR et du PDGF-BB toutes les 36 heures. Cet ajout plus fréquent n'a pas permis d'observer l'apparition de nouvelles morphologies cellulaires.

Récemment, de nouvelles associations de facteurs ont été présentées comme permettant de favoriser une orientation de divers types de progéniteurs vers la différenciation cardiomyogénique (Abdel-Latif et al. 2008; Bartunek et al. 2007, 2013; DeGeorge et al. 2008) : WO2011067317A1 ; WO 2009151907A2 ; EP2303310A2). Sur la base de ces données, une nouvelle combinaison de cytokines associant l'activine-A, le BMP-2, le VEGF, le TNF- β et l'IGF-1 avec ou sans EGF et bFGF a été définie et testée sur les cellules hMuStem.

À l'arrêt des cultures, des extractions d'ARN ont été réalisées sur les culots cellulaires obtenus dans les différentes conditions. Seules certaines conditions représentatives des résultats obtenus sont présentés ici (Figure 31).

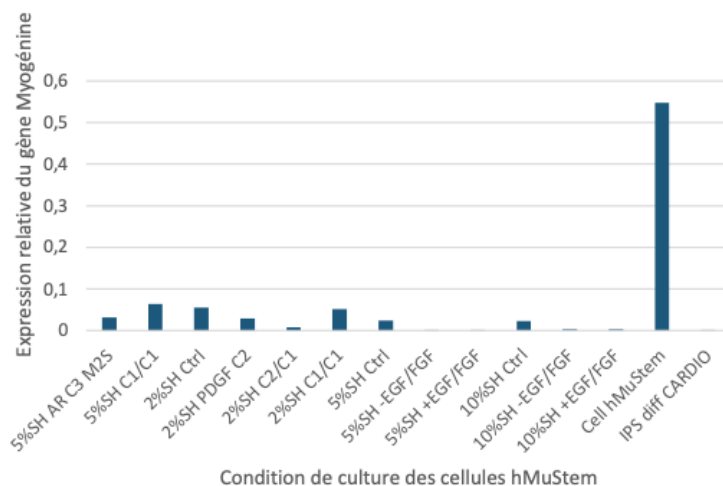


Figure 31: Analyse qPCR du gène musculaire myogénine sur différentes conditions de culture testées.

Des cellules hMuStem non induites sont utilisées en contrôle négatif et des cellules iPSC différenciées en cardiomyocytes en contrôle positif. On peut voir que quelque soit la condition, on a une perte d'expression de la myogénine est observée contrairement à ce qui est obtenu dans les cellules MuStem native. Des résultats similaires ont été obtenus avec MYF5. De plus, tous les marqueurs cardiaques explorés, précoces ou tardifs, ont été retrouvés négatifs. Ces résultats mettent en évidence une perte du phénotype myogénique des cellules hMuStem associée à une absence d'engagement dans la lignée cardiomyogénique.

c) Validation du protocole expérimental chez le rat immunodéficient

Sur une première période de trois mois, une série de 30 rats sains a été utilisée afin d'acquérir la technique chirurgicale (manipulation des rats, injections sous-cutanée et intra-péritonéale sur rats vigiles, maîtrise des appareillages tels que le poste à anesthésie, le respirateur, acte d'intubation, pose d'une ligature coronaire ou encore double thoracotomie à une semaine d'intervalle) et d'optimiser le mode opératoire (conditions d'asepsie associées à la chirurgie sur des rats immunodéficients, différents fils de suture [5/0, 4/0, prolène et soie], points [point par point, surjet et sous cutané], pose de point avec et sans péricarde pour limiter les

adhérences du cœur à la paroi, réouverture en 3/4 ou 4/5, gestion de la douleur, définition des points limites (Figure 32).

L'acquisition progressive de ces différents actes a permis de diminuer le taux de mortalité d'environ 30% et de rendre nul le taux d'infection obtenu suite aux deux opérations chez les animaux facilitant ainsi la seconde ouverture.

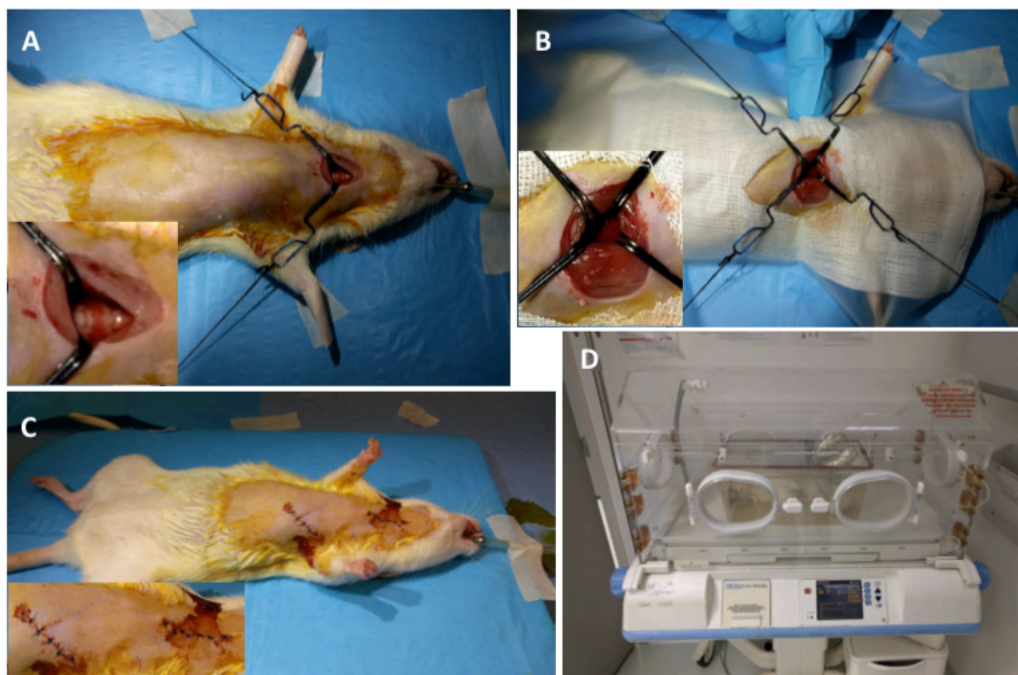


Figure 32 : Protocole expérimental de chirurgie chez le rat. (A) Ouverture de la gorge pour intubation. (B) Thoracotomie et pose de la ligature coronaire. (C) Suture de l'animal. (D) Réveil en couveuse de l'animal.

Cette étude préliminaire a également permis de valider la faisabilité du protocole qui sera ensuite réalisé sur la cohorte d'intérêt.

d) Implantation et survie des cellules hMuStem dans un myocarde sain

Tout d'abord, nous avons cherché à déterminer si les cellules hMuStem qui proviennent du muscle squelettique pouvaient être implantées dans le tissu cardiaque, car de nombreuses études mettent en évidence une absence des cellules candidates au-delà de 48h (Kervadec et al. 2016). Nous avons mené une étude dans le temps avec une recherche de l'implantation des cellules à 1, 6 et 21 jours post-transplantation. Pour cela, les cellules ont été administrées

en six sites localisés dans la partie médiane du VG de 8 rats immunodéficients et des explorations immunohistochimiques ont été effectuées aux différents temps, à l'aide d'un anticorps spécifique anti-lamine A/C humaine qui ne « cross-réagit » pas avec les rongeurs (cf Fig. 2A de l'article).

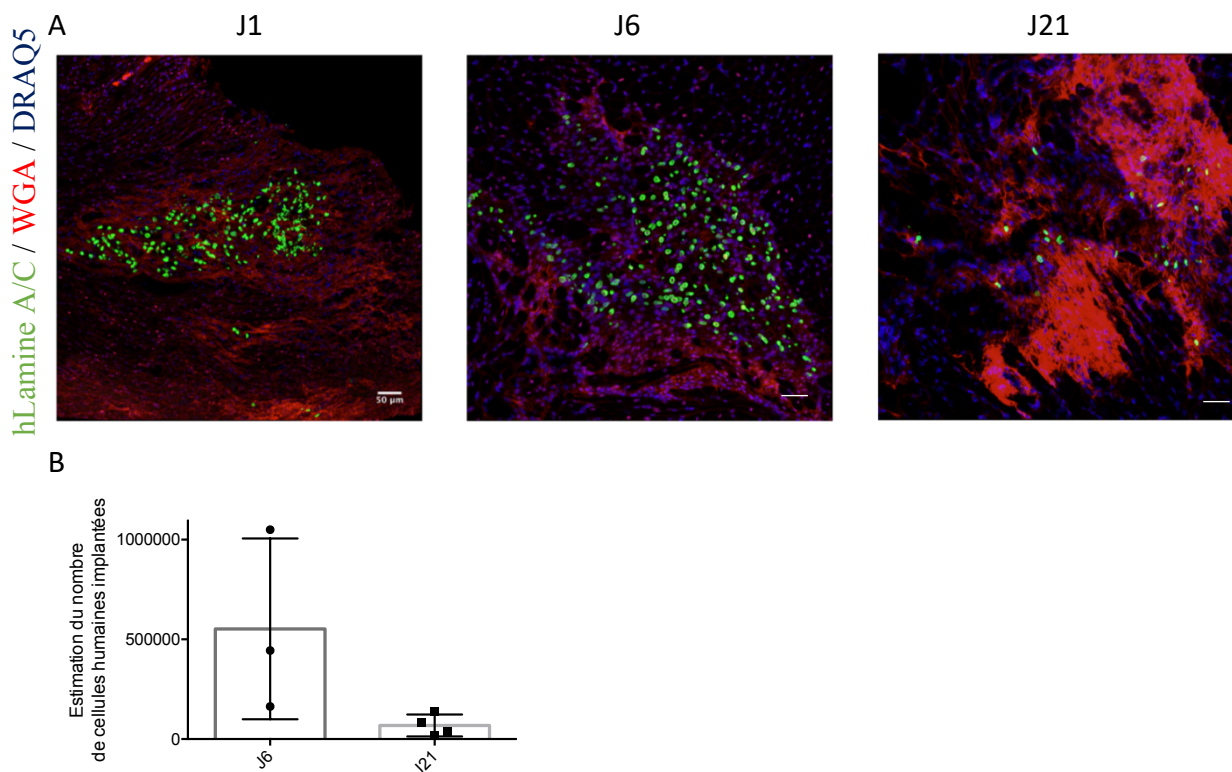


Figure 33 : Implantation des cellules hMuStem dans le cœur de rat sain à différents temps. A) Immunomarquages spécifiques de la Wheat germ agglutinin (WGA, rouge) et de la lamine A/C humaine (vert) sur des coupes transversales congelées du cœur de rat transplanté à J1, J6 et J21. Les noyaux ont été contre-colorés au DRAQ5 (bleu foncé). Barre d'échelle, 10 µm. B) Quantification du nombre de cellules hMuStem implantées aux différents temps grâce à une sonde Alu humaine.

Pour les différents temps, la présence de cellules humaines a été mise en évidence avec détection de foyers de noyaux lamine A/C⁺ dans tous les cœurs injectés. Ces cellules étaient principalement dispersées dans le tissu conjonctif visualisé par le marquage à la WGA (Kostrominova 2011) et rarement présentes dans le tissu myocardique (Figure 33A). Lorsque que nous avons regardé plus précisément aux différents temps, la présence de foyers denses a été mise en évidence à J1 et J6. Pour les rats à J21, la présence de cellules a également été détectée, mais rarement avec de telles densités. Les cœurs n'ayant pas été complètement débités, il est possible que nous soyons passés à côté des foyers les plus importants. Afin de compléter ces observations, le nombre de cellules hMuStem a été estimé à l'aide d'une technique basée sur une sonde Alu pour détecter l'ADN génomique humain (Funakoshi et al.

2017). Cette technique a mis en évidence la présence d'environ 2 500 000 cellules 24h après injection soit de l'ordre de 90% des cellules initialement injectées (Figure 33B). Les cellules semblent donc résister au washout primaire et posséder la capacité à s'implanter. Cependant à J6, une forte hétérogénéité a été observée sur les 3 rats étudiés avec 170 000 cellules à 1 000 000 de cellules détectées selon le rat (correspondant à 6% et 37% des cellules injectées). A J21, au moins 16 600 à 139 390 cellules ont été détectées selon les rats, ce qui correspond à 1-5% du nombre de cellules humaines administrées à l'origine. Ces données indiquent que malgré l'absence de contexte pathologique et donc de stimulation environnementale, une partie des cellules hMuStem a la capacité de se maintenir dans le cœur.

A ces mêmes temps, la présence des cellules hMuStem a également été recherchée dans différents organes (foie, de poumon, de rate, de cerveau, de rein et de muscle squelettique) en utilisant les mêmes approches.

A J1 post-transplantation, il a été mis en évidence la présence de quelques cellules dans la lumière vasculaire au niveau des poumons (Figure 34). A J6, la présence de ces cellules a complètement disparue tendant à indiquer que les cellules précédemment décrites correspondraient donc à des cellules présentes dans la circulation sanguine consécutivement à des injections trop profondes. A J21, l'ADN humain n'a jamais été détecté dans les différents organes.

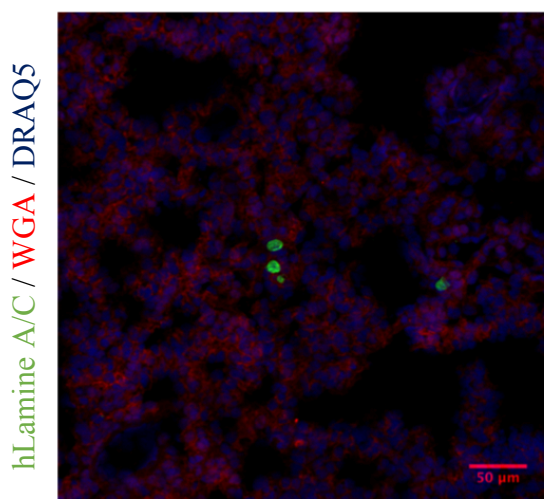


Figure 34 : Mise en évidence de la présence de cellules humaines à J1 post-transplantation dans la lumière des vaisseaux au niveau des poumons grâce à des immunomarquages spécifiques de la Wheat germ agglutinin (WGA, rouge) et de la lamine A/C humaine (vert) et une contre-coloration des noyaux au DRAQ5 (bleu). Barre d'échelle, 50 μ m.

L'ensemble de ces résultats met en évidence la présence de cellules dans le myocarde jusqu'à 3 semaines post-injection ainsi que leur absence dans les organes filtres démontrant une capacité des cellules à s'implanter et se maintenir pour partie dans le cœur.

e) Absence de réponse humorale consécutive à la xénogreffe

L'analyse en cytométrie de flux du sérum des rats collectés trois semaines après l'injection des cellules a mis en évidence une différence statistique avec une très forte réactivité dans le groupe de rats contrôles (non-immunodéficients) injectés avec des cellules contrairement aux autres groupes de rats immunodéficients traités avec les cellules hMuStem qui présentent des niveaux indétectables (Figure 35). En effet, les rats contrôles vont présenter 94,6% de cellules reconnues par les anticorps IgG anti-humain. Ceci est cohérent avec le fait que les rats RRG se sont montrés profondément immunodéficients avec une absence de production d'immunoglobulines (Ménoret et al. 2018).

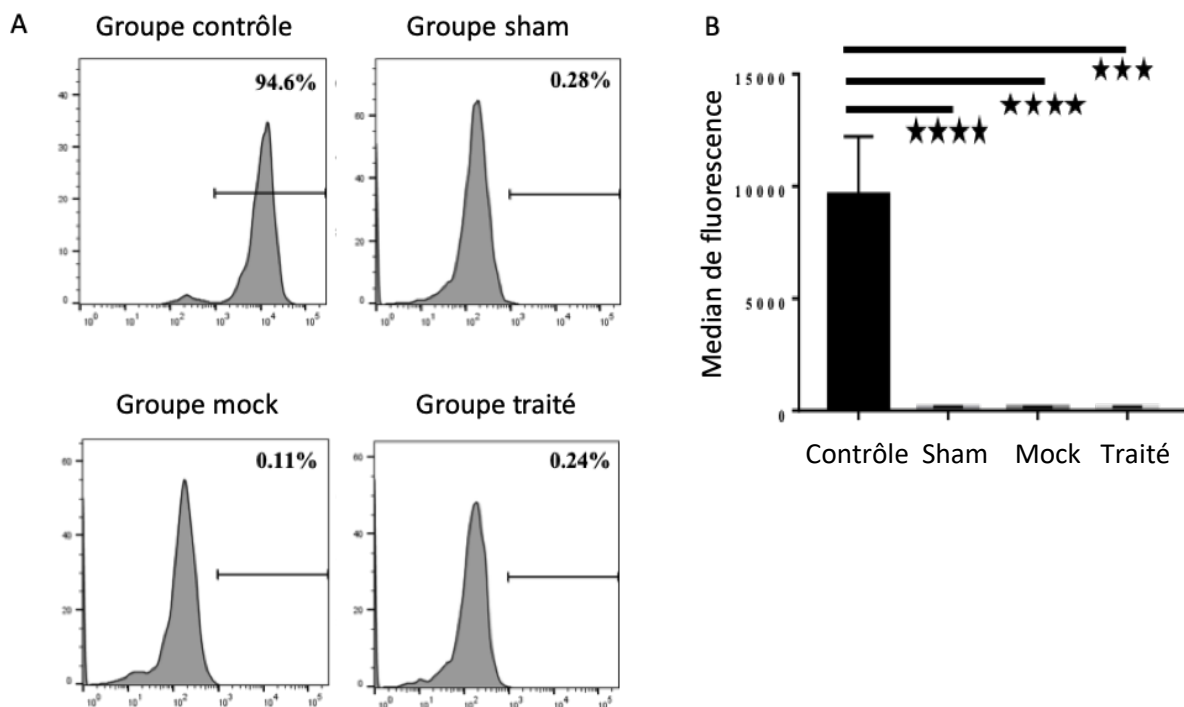


Figure 35 : Analyse de la présence d'anticorps anti-IgG humaines dans les sérums de rats. Les sérums de rat ont été collectés 3 semaines après injection des cellules hMuStem. La réactivité aux IgG humaines a été testée par incubation des sérums de rats inactivés par la chaleur (dilués au 1/5). Les anticorps liés ont été détectés par cytométrie de flux à l'aide d'un anticorps IgG anti-humaine conjugué FITC. A) Les histogrammes de gauche sont représentatifs de l'analyse FACS à dilution 1/5 et montrent le pourcentage de cellules reconnues par les anticorps IgG anti-humains. B) Le graphique de droite montre les taux d'IgG humaines contre les cellules huMuStem. Les résultats sont exprimés en valeur moyenne d'intensité de fluorescence \pm SEM et un t test de Student a été réalisé $***p=0,0001$ et $****p<0,0001$.

Cette étude qui permet de valider le modèle animal nous confirme également que le nombre de cellules retrouvées dans le myocarde n'est pas impacté par une réponse du système immunitaire envers la xénogreffe.

f) Article

Ces résultats font l'objet d'un article soumis à Science Advances (AAAS Science Advances, manuscrit number aa25367).

1 **FRONT MATTER**

2
3 **Title**

- 4 • **Human MuStem cells implanted into rat infarcted heart attenuate adverse tissue**
5 **remodeling and preserve cardiac function**
- 6 • **hMuStem cells preserve function of infarcted heart**

7
8 **Authors**

9 A. Rannou^{1,2,3}, G. Toumaniantz^{2,3}, T. Larcher¹, I. Leroux¹, M. Ledevin¹, A. Hivonnait², C.
10 Babarit¹, R. Fleurisson¹, L. Dubreil¹, S. Ménoret⁴, I. Anegon⁴, F. Charpentier^{2,5,†}, K. Rouger^{1,*,†},
11 L. Guével^{1,3†}

12
13 **Affiliations**

14
15 ¹PAnTher, INRA, École nationale vétérinaire, agro-alimentaire et de l'alimentation Nantes-
16 Atlantique (Oniris), Université Bretagne Loire (UBL), Nantes, F-44307, France.

17 ²l'institut du Thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, France.

18 ³Université de Nantes, Nantes, France.

19 ⁴UMR 1064/Plate-forme TRIP/Nantes Université, CHU Nantes, INSERM, CNRS, SFR Santé,
20 INSERM UMS 016,CNRS UMS 3556, F-44000 Nantes, France.

21 ⁵l'institut du thorax, CHU Nantes, Nantes, France.

22 *To whom correspondence should be addressed: karl.rouger@inra.fr

23 †Equal contribution to this work

Abstract

Myocardial infarction represents one of the leading causes of mortality and morbidity worldwide. In preclinical studies, transplantation of several cell types provided promising results while weak viability and tissue retention were recorded clinically, limiting structural and functional benefits. We have described a type of human skeletal muscle-derived stem (hMuStem) cells that efficiently promoted repair following delivery into injured skeletal muscle. However, their ability to repair infarcted heart remained unknown, restricting their scope of application in regenerative medicine. Here, human cells were locally administrated into immunodeficient rats one week post-infarction. Reduced myocardial fibrosis and increased angiogenesis were observed three weeks post-transplantation. This was associated with skeletal and cardiac muscle fiber formation in the infarct site. Echocardiography and electrocardiography analysis revealed an attenuated left ventricle dilatation and a preserved contractile function without inducing arrhythmias. Overall, we showed that intramyocardial transplantation of hMuStem cells could represent a suitable strategy for treating myocardial infarction.

MAIN TEXT**Introduction**

Considering the insufficient intrinsic ability of the heart to repair its damages following a severe injury such as myocardial infarction (MI) (1, 2), intramyocardial transplantation of stem/progenitor cells met with great interest to restore cardiac function and to prevent heart attack in the context of MI (3). During the past two decades, multiple cell types have underwent preclinical evaluation of their regenerative potential. They corresponded to myoblasts (4), bone marrow mononuclear cells (5), mesenchymal stem cells (MSCs) (6), and endogenous cardiac progenitors including c-kit⁺ cardiac progenitor cells (CPCs) (7), sca1⁺ CPCs (8) and cardiosphere-derived cells (9). Embryonic stem cells (10) and induced pluripotent stem cells (iPSC)-induced cardiomyocytes (CMs) (11) were also tested. Reduction of myocardial fibrosis, neovascularization, prevention of left ventricle (LV) dilatation and enhancement in local cardiac contractility were successively described for the stem cells from different origins (12–14), leading to rapid transition to clinical trials for a subset of these cell types.

So far, limited successes with modest long-term efficacy have been obtained in randomized clinical trials for MI, highly contrasting with encouraging preclinical results (15). The main reasons given were poor survival and engraftment of injected cells in the harsh cardiac environment as well as negligible direct differentiation into CMs and/or vascular cells (16, 17).

Following transplantation into the heart of adult immunodeficient mice injured by acute MI, a type of murine muscle-derived stem cells (MDSCs) isolated on the basis of initial adhesion defect were described as being capable to implant into infarcted zone, to induce neo-angiogenesis and to elicit significant improvement in cardiac function (18). Importantly, these different features were described as much more efficient than those obtained with myoblasts whom transplantation in small and large animals was associated with poor retention, limited spreading at the site of

00 injection and arrhythmias (19, 20). We have isolated and characterized a type of MDSCs from
01 canine healthy skeletal muscle, named MuStem cells, and have demonstrated its therapeutic
02 potential after systemic delivery in the Golden Retriever Muscular Dystrophy dog. In this
03 clinically relevant animal model of Duchenne Muscular Dystrophy, induction of beneficial
04 muscle repair through action on several pathways and long-term clinical status stabilization were
05 shown (21–23). More recently, we have isolated the human counterpart of MuStem (hMuStem)
06 cells and have established an equivalent robust muscle regenerative potential after delivery into
07 injured skeletal muscle of immunodeficient mice (24). On the basis of all these properties,
08 hMuStem cells were presented as an attractive candidate for therapeutic approaches of skeletal
09 muscle diseases. Considering also the promising results obtained in the MI context with the
10 mouse MDSCs, it appears highly interesting to explore the behavior of the hMuStem cell
11 population in such context, in order to inform the scope of its application in regenerative
12 medicine. This seems all the more necessary as the preclinical/clinical data obtained so far with
13 cell-based therapy strategies remain mixed.

14 In the present work, we investigated the xenotransplantation of hMuStem cells in a
15 immunodeficient rat model of MI. hMuStem cells were isolated from skeletal muscle, *in vitro*
16 expanded and characterized before transplantation into heart for which the infarction was
17 experimentally generated a week earlier. Three weeks post-transplantation, hMuStem cells
18 showed a discriminating ability to engraft into infarcted zone, contribute to the formation of
19 skeletal and cardiac muscle fibers and generate interstitial reserve cells. In addition, they
20 attenuated the LV dilatation and improved its performances without inducing negative changes of
21 the electrocardiographic parameters. Taken together, these data demonstrate the potential of
22 hMuStem cells to positively act on the adverse cardiac tissue remodeling and the preservation of
23 its function. Also, they suggest that they could represent an interesting avenue for therapeutic
24 application of cardiac diseases in addition to its initial indication for the skeletal domain.

25

26 **Results**27 *hMuStem cells correspond to early-myogenic progenitors uncommitted into the cardiac lineage*

28 To qualify the hMuStem cell populations used for the transplantation protocol, a short panel of
29 lineage-specific markers was tested in 4 independent batches expanded at passage 5 under good
30 manufacturing practice-like conditions, using flow cytometry and RT-PCR. In agreement with our
31 previous works (24, 25), we determined that more than 71% of *in vitro* expanded cells expressed
32 the canonical satellite cell and myoblast marker CD56, while all cells were robustly positive for
33 the recently identified satellite cell markers CD29, CD82 and CD318. Representative profiles are
34 shown in Fig. 1A. In addition, the typical MSC markers CD73, CD90 and CD105 were uniformly
35 detected in hMuStem cells that were concomitantly negative for the classical hematopoietic stem
36 cell marker CD45. hMuStem cells exhibited a homogeneous expression for the well-described
37 perivascular cell markers CD140b and CD146. Concerning the cardiac-lineage markers, RT-
38 qPCR analysis showed a lack of expression for the well-known early transcriptional factor *NK2*
39 *Homeobox 5 (NKX2.5)* and *T-box5 (TBX5)* as well as for *ryanodine receptor-2 (RYR2)* in all
40 hMuStem cell batches (Fig. 1B). A low expression was noted for the other classical structural
41 markers, *voltage-gated sodium channel α - subunit 5 (SCN5A)* and *troponin T2 (TNNT2)*. Only
42 *gap junction protein, $\alpha 1$ (GJA1; connexin 43)*, which is required to establish intercellular
43 connections between myocytes but also known to be expressed by other progenitor cells such as
44 MSCs (26, 27), has been detected in the hMuStem cells. Overall, these results indicated that
45 cultured hMuStem cells are early myogenic progenitors with a perivascular/mesenchymal
46 signature, which do not exhibit any intrinsic cardiac lineage commitment in native condition.

47

48

49

50 *Skeletal hMuStem cells can engraft and remain with time in healthy myocardium*

51 First, we sought to determine if the hMuStem cells that originate from skeletal muscle could be
52 implanted into heart tissue. For that, they were administrated in six sites localized in the mid
53 portion of the LV of 9 immunodeficient rats. Functional and histopathological explorations were
54 performed three weeks after cell administration, as recapitulated in the experimental scheme (Fig.
55 2A). The extent of the human cell engraftment was also analyzed by immunohistochemistry
56 approach, using an anti-human lamin A/C antibody (Ab) that does not cross-react with rodents.
57 For this time-point, presence of human cells was evidenced by detection of large lamin A/C⁺
58 nuclei clusters in all injected hearts. These cells were mainly randomly scattered in the connective
59 tissue visualized by the wheat germ agglutinin (WGA) labeling (28) and rarely present in
60 myocardial tissue (Fig. 2B). Using topographic HES staining, these cells displayed either very
61 scant, barely visible cytoplasm or mild amount of eosinophilic cytoplasm around a large
62 paracentral euchromatic nucleus (Fig. 2C). Picrosirius staining confirmed their main localization
63 in the dense connective tissue. The number of hMuStem cells was estimated using Alu-based
64 technique for detecting human genomic DNA (29). It revealed that uninjured hearts retained at
65 least 16,600 to 139,390 cells depending on the rat, which corresponded to 1% to 5% of the
66 number of original administrated human cells. In addition, we determined that samples from liver,
67 lung, spleen, brain, kidney and skeletal muscle were all negative for hDNA in rats at this time-
68 point (data not shown).

69 We also had to exclude cardiac electrical, structural or contractile dysfunctions associated
70 with the persistence of the hMuStem cells into injected heart. No electrical abnormalities were
71 determined by ECG analysis (Fig. 2D, table S1). Recording showed that neither the heart rate, nor
72 the atrial (P wave duration), atrio-ventricular (PR interval) and ventricular (QRS complex
73 duration) conduction, nor ventricular repolarization (QT interval) were altered by the presence of
74 hMuStem cells. In order to observe a possible structural remodeling, the left ventricle end-

75 diastolic diameter (LVEDD) and the free wall end-diastolic thickness were measured from images
76 obtained by M-mode echocardiography. An absence of structural remodeling was first determined
77 with no change in the LVEDD (7.22 ± 0.27 mm and 7.43 ± 0.23 mm for baseline and 3 weeks
78 post-injection conditions, respectively) and the LV end-diastolic wall thickness (LVEDWT =
79 1.63 ± 0.07 mm and 1.73 ± 0.08 mm, respectively) (Fig. 2D, tables S1 and S2). Furthermore, the
80 systolic function was assessed by the ejection fraction (EF), while transmitral flow measurements
81 of ventricle filling velocity were obtained using pulsed Doppler, with an apical four-chamber
82 orientation to investigate the diastolic function (fig. S1). At a functional level, we observed no
83 change in systolic function, as shown by EF ($84\% \pm 3\%$ and $87\% \pm 2\%$ for baseline and 3 weeks
84 post-injection conditions, respectively). In the same way, no change was noted in diastolic
85 markers, E/A ratio ($E/A = 1.68 \pm 0.12$ and 1.50 ± 0.08 for baseline and 3 weeks post-injection
86 conditions, respectively), in Doppler-derived Deceleration Time ($TD = 39 \pm 2$ and 44 ± 4 ms,
87 respectively) or in IsoVolumetric Relaxation Time ($IVRT = 27 \pm 0.5$ and 26 ± 0.9 ms
88 respectively). These data demonstrated the absence of structural remodeling or functional
89 alteration in hearts, 3 weeks after myocardial transplantation. Overall, these findings showed that
90 skeletal muscle-derived hMuStem cells exhibit a potential to engraft into uninjured heart without
91 generating adverse cardiac effect, regarding electrical function, structural remodeling as well as
92 systolic or diastolic function.

93

94 *hMuStem cells attenuate the infarct-induced adverse left ventricle tissue remodeling*

95 To explore whether the repair potential previously demonstrated for the MuStem cells in
96 dystrophic or injured skeletal muscle (21, 24, 30) could be extended to the heart in a context of
97 MI, a cell transplantation protocol was designed in female immunodeficient rats in which
98 permanent occlusion of the left anterior descending (LAD) coronary artery was done 1 week
99 before. It was combined with functional and histopathological explorations as recapitulated in the

00 experimental scheme (Fig. 3A). The coronary ligation protocol practiced here generated a 19.79%
01 \pm 1.93% reduction in the LV ejection fraction (LVEF) after 1 week, indicating the induction of a
02 moderate MI. One week post-infarction, 21 rats were blindly randomized and received either 2.7
03 $\times 10^6$ hMuStem cells (treated group) or vehicle (mock group) in the border zone of the infarct.
04 Three weeks later, rats were sacrificed and the LV was transversely sectioned from the apex to the
05 base. Based on planned exploration, all or only half of the slides were frozen and/or embedded in
06 paraffin (table S3). In the mock group, MI was characterized on HES-stained sections by
07 extensive remodeled areas, with an irregular shape resulting in multiple foci of heterogeneous size
08 in section (Fig. 3B). These areas displayed a similar organization that could be divided in two
09 parts: a central zone and a border zone. The first one was characterized by a complete loss of CMs
10 that were replaced by fibrotic tissue rich in collagen as confirmed by Saffron staining, with large
11 fibroblasts displaying euchromatic nucleus and infiltrated by mixed inflammatory cells. An
12 irregular boundary-demarcated border zone, about 30 to 70 μm in thickness, surrounded the
13 central one and was mainly composed of hypereosinophilic ovoid-shaped CMs, with marked
14 anisocytosis, individually surrounded by thick bundles of connective tissue rich in collagen. At
15 the periphery of the infarct, viable myocardium showed a globally preserved organization with
16 clearly intact cells. In contrast, in the treated group, all rats showed a much smaller central zone
17 compared to the mock group. In addition, the border zone appeared either thinner or sometimes
18 even absent with normal CMs directly adjacent to the central zone.

19 Fibrotic tissue surface represented 12.6% \pm 2.9% and 9.4% \pm 1.8% of the whole section in
20 the mock and treated groups, respectively, revealing a tendency for a global decrease in fibrosis
21 following the hMuStem cell administration (Fig. 3C). The number of fibrotic foci composing the
22 infarct was 14.4 \pm 1.2 and 7.6 \pm 2.8 in the mock and treated group respectively, showing that
23 hMuStem cell administration mitigated the development of myocardial fibrosis ($p = 0.059$, Mann-
24 Whitney test). Comparing infarcted and peripheral (*i.e.*, viable) zones, fiber size appeared to be

25 more heterogeneous and globally increased in the infarcted one. Fiber size was then measured and
26 expressed as minimal Ferret diameter (Fig. 3D). One-way ANOVA analysis enabled to identify a
27 zonal effect on the fiber size but no effect of the hMuStem cell transplantation comparing rats of
28 the treated group to those of the mock group ($p < 0.001$). To document this criterion, size
29 distribution of fibers in infarcted zone was also depicted (Fig. 3E). A marked anisocytosis was
30 confirmed in rats of both mock and treated groups. Strikingly, some small fibers (less than 5 μm)
31 were exclusively identified in the treated group.

32 Revascularization of the heart by the formation of new vessels is one of the preferred
33 therapeutic approaches in the case of MI. Capillary density within the infarct was assessed using
34 von Willebrand factor (vWF) labeling of endothelial cells with WGA labeling for connective
35 frame. In the mock group, the central zone of MI was characterized by the presence of WGA⁺
36 dense areas with a low density of blood capillaries and a few larger blood vessels. Conversely, in
37 the border zone, blood capillaries were more numerous and displayed a dilated lumen delineated
38 by large endothelial cells (Fig. 4A). In rats from the mock group, the whole vWF⁺ surface
39 represented $16.13\% \pm 5.32\%$, $7.46\% \pm 1.81\%$ and $5.87\% \pm 1.82\%$ of the infarcted, border and
40 viable zones, respectively (Fig. 4B). In contrast, it represented $32.83\% \pm 4.52\%$, $18.30\% \pm 3.64\%$
41 and $9.60\% \pm 0.56\%$ of the corresponding zones in the treated group. A 2-fold and 2.5-fold
42 increase of vWF⁺ structure were determined in infarcted and border zones respectively in the
43 treated group compared to the mock group, demonstrating an increased density of capillaries in
44 both zones following hMuStem cell administration ($p < 0.001$). In addition, no changes were
45 noted in the remote viable zone. These findings importantly indicated that transplanted hMuStem
46 cells induced an angiogenic effect within the infarcted hearts by promoting host angiogenesis not
47 only in the border zone, where classically the vascular structures are yet observed, but also in the
48 infarcted zone defined by a lack of blood vessels. Interestingly, this pointed out that the infarcted
49 zone is an active area for the development of vessels following the hMuStem cell administration,

50 despite the ischemia and cell death conditions observed in the permanent ligation model used.
51 Taken together, these results showed that hMuStem cell administration induces a profound
52 remodeling of the infarcted heart by acting on cardiomyogenic, fibrotic and angiogenic
53 compartments.

54 55 *hMuStem cells engraft into infarcted tissue*

56 Post-transplantation survival of stem/progenitor cells is considered to be a crucial factor
57 determining the long-term efficacy of transplant protocols. In this context, we wanted to know if
58 the beneficial effects observed after the hMuStem cell administration were associated with
59 colonization of the injured heart by human cells. Three weeks post-implantation, the hMuStem
60 cells populated the infarct of all rats from the treated group (Fig. 5A). Foci composed of 15 to
61 over 300 large lamin A/C⁺ nuclei *per* section were detected over the entire depth of the infarct.
62 Based on topographic HES staining, we observed that cells containing lamin A/C⁺ nuclei
63 displayed either very scant, barely visible cytoplasm or mild amount of eosinophilic cytoplasm
64 around the paracentral nucleus. In confocal microscopy, the presence of lamin A/C⁺ nuclei in
65 WGA⁺ area revealed that most cells were located inside the infarcted fibrotic zones (Fig. 5A).
66 Rare donor cells were observed within the host viable myocardium. Quantitative analysis revealed
67 that 98.5% of donor nuclei were found in the infarcted zone while 1.0% and 0.5% were identified
68 in the border and viable zones respectively, suggesting that hMuStem cells concentrated in the
69 acute infarcted zone from the initial injection site in the border one. To further confirm the
70 retention of the hMuStem cells after administration in MI, LV of 3 rats from the treated group
71 was considered to detect and quantify human Alu sequences on genomic DNA extraction. At 3
72 weeks post-injection, seven injected rats were analyzed by qPCR and three representative rats
73 were assessed in all slices of the heart to determine the tissue distribution. Based on the genomic
74 hDNA ranging from 93,400 to 153,820 cells depending on the rat, we determined that at least 4%

75 to 5.7% of the transplanted cells remained in all animals. In addition, we observed that samples
76 from liver, lung, spleen, brain, kidney and muscle were all negative for hDNA in rats at this time-
77 point (data not shown).

78 Interestingly, in terms of cell behavior, we first determined that 1% of the donor nuclei
79 expressed the PCNA, revealing donor cell proliferation *in vivo* (Fig. 5B). Also, less than 1%
80 (0.56%) of cells containing lamin A/C⁺ nuclei were positive for TUNEL labeling, which indicated
81 that quite all implanted donor cells do not correspond to apoptotic cells but rather to reserve cells
82 in the quiescent state.

83 Then, we tracked the hMuStem cell fate by regarding their *in vivo* differentiation potential
84 (Fig. 5C-F). Fluorescent co-immunolabelings against the human lamin A/C and either the fast
85 skeletal myosin heavy chain (MHC) isoform, the slow skeletal troponin T1 (TNNT1) isoform or
86 the cardiac troponin I (TNNI) showed that part of transplanted hMuStem cells contributed to form
87 fast or slow skeletal muscle fibers as well as cardiac ones. As shown on HES-stained sections,
88 these human nuclei-containing fibers colonized the conjunctive tissue with occasional clusters of
89 skeletal muscle fibers. In return, human TNNI⁺ fibers appeared isolated in the fibrotic zone. The
90 fibers positive for the skeletal MHC and TNNT1 isoforms represented 18% and 19% of fibers
91 respectively, while 5% expressed the TNNI isoform. Histomorphometry analysis attributed a
92 minimal Feret diameter of $9.01 \pm 5.2 \mu\text{m}$ and $13.53 \pm 8.3 \mu\text{m}$ for these skeletal and cardiac fibers
93 respectively, corroborating the detection of small fibers previously described in the infarct zone of
94 rat from the treated group. These results revealed that about 42% of the hMuStem cells that
95 survived following myocardial administration have differentiated mainly toward a skeletal
96 myogenic lineage and more modestly have acquired a cardiac phenotype. Importantly, no hybrid
97 fiber, *i.e.*, containing both human skeletal and cardiac markers, were observed. Some lamin A/C⁺
98 nuclei were sporadically and not in all rats observed with alpha-SMA labeling, revealing that
99 some hMuStem cells differentiated in myofibroblasts (Fig. 5G). Finally, muscle fibers containing

00 several lamin A/C⁺ nuclei were observed, revealing that hMuStem cells primarily fused with each
01 other when injected into cardiac context (Fig. 5H). Overall, the results indicated that hMuStem
02 cells have potential to remain in the infarcted heart with a multifocal presence throughout the
03 depth of the infarction, mainly located in the acute fibrotic zone where they either contribute to
04 the formation of skeletal and cardiac muscle fibers or constitute reserve cells in the connective
05 matrix.

07 *hMuStem cells preserve the function of infarcted heart*

08 Four weeks post-MI, rats from the mock and treated groups were characterized by an ST segment
09 undershift in lead I (Fig. 6A). As observed in sham-operated rats, engraftment of hMuStem cells
10 did not modify the heart rate (RR interval) and other ECG parameters (Fig. 6A, tables S2 and S4).
11 Moreover, it did not induce spontaneous arrhythmias: four weeks post-MI, only one rat in the
12 mock group and one rat in the treated group exhibited ventricle premature beats (16 and 1
13 premature beat during the ECG recording period, respectively). Thus, our results described a lack
14 of genesis of arrhythmia consecutive to the injection or the implantation of the hMuStem cells.
15 This absence of arrhythmia or change in heart rate allowed secondary and robust
16 echocardiography analysis to investigate the influence of the hMuStem cells on LV structure and
17 function. Ultra-sound investigations were performed repeatedly 1, 3 and 4 weeks after MI. As
18 expected, MI induced an increase in LV structural remodeling, characterized by an increase in LV
19 chamber dimensions (LVED diameter), leading to a decrease in the systolic function that was
20 assessed by the EF (Fig. 6B, tables S2 and S5). Diastolic diameter was found to be increased to
21 $108.93\% \pm 3.74\%$, $122.13\% \pm 5.81\%$ and $115.20\% \pm 3.70\%$ of control values respectively for 1, 3
22 and 4 weeks post-MI in rats from the mock group. It was increased to only $102.23\% \pm 2.39\%$,
23 $110.29\% \pm 4.59\%$ and $105.64\% \pm 4.01\%$ of control values respectively in rats from the treated
24 group (Fig. 6C and movies S1-S4). Although not significant, these differences suggested that the

25 presence of hMuStem cells seemed to preserve the LVEDD as compared to the mock group. The
26 absence of change in LV wall thickness at the end of diastole was expected at this post-infarction
27 remodeling stage (first phase of the pathological ventricle dilatation). While no change in
28 diastolic function, such as DT of the E wave of the mitral flow, was observed, the hearts of the
29 treated group demonstrated a significant improvement of LV performance when compared with
30 those of the mock group. Indeed, while the EFs were found to be reduced to $80.56\% \pm 2.40\%$,
31 $70.39\% \pm 4.53\%$ and $72.78\% \pm 3.56\%$ respectively for 1, 3 and 4 weeks post-MI for rats in the
32 mock group, these parameters were significantly less reduced with values of $79.88\% \pm 3.09\%$,
33 $90.50\% \pm 3.79\%$ and $91.10\% \pm 2.64\%$ respectively in the treated group (tables S2 and S5) ($p =$
34 0.0007 and 0.003 at 3 and 4 weeks respectively, Mann-Whitney test). Overall, these data
35 suggested that hMuStem cell delivery preserved the cardiac function in our rat model of MI.

36
37

38 Discussion

39 In the perspective of positioning the human skeletal muscle-derived MuStem cells as a potential
40 advanced therapy medicinal product, the present study aimed to test the feasibility of their
41 intramyocardial transplantation in a rat model of MI. In previous preclinical studies, the ability of
42 the MuStem cells to survive in severely damaged tissue such as the dystrophic or cryo-injured
43 skeletal muscle was established (21, 24, 30). We also observed that they can generate significant
44 and persistent clinical and tissue benefits in the clinically relevant dystrophic dog model. In the
45 present study, we provided original data on the repair potential of this adult stem cell population
46 in a context of MI, underlying its potential use in regenerative medicine for muscle diseases. We
47 successfully demonstrated that administration of human MuStem cells in the border zone of the
48 MI was associated with their persistence within injured heart, an attenuation of the adverse LV
49 tissue remodeling and an improvement of cardiac function in the following weeks. Zones of
50 infarction and especially fibrosis were remarkably reduced in the hMuStem cell-injected rats

51 compared to the mock group. Angiogenesis and neo-myogenesis were found to be the main
52 factors for preserving the architecture of LV myocardium.

53 While less than three millions of hMuStem cells were injected to the surrounding sites of MI,
54 which corresponds to a lower number of injected cells compared to other studies, several tens of
55 thousands of cells were found in each transplanted rat 3 weeks later, revealing a remarkable
56 retention rate. Importantly, these data distinguished hMuStem cells from MSCs that were
57 characterized by a low viability in the harsh conditions of damaged area, MSCs dying shortly
58 after implantation or within one week post-injection (31, 32) . The same observation was done
59 for genetically engineered myoblasts (19, 33). This could suggest that hMuStem cells are less
60 sensitive to hypoxia and oxidative stress that define MI site. Of note, the sensitivity of cells to the
61 inflammatory response, which also characterizes MI, cannot be considered here given the retained
62 immunodeficient animal model.

63 It was apparent from the intramyocardial administration protocol used in the present study
64 that half of the hMuStem cells implanted into the infarcted region contributed to generate mainly
65 skeletal fibers, which might be an evidence of its specification in its original tissue. Far less
66 frequent fibers displayed a cardiac phenotype. This finding is consistent with the work conducted
67 by Zhang *et al.* (2015) who demonstrated a very limited contribution of bone marrow (BM)-
68 MSCs to cardiac muscle cells following their transplantation in mouse acute model of MI, with
69 less than 0.1% grafted cells expressing specific cardiac markers (13). The presence of muscle
70 fibers expressing the human cardiac marker TNNI revealed an intrinsic potential of the hMuStem
71 cells to commit into cardiomyogenic lineage. This observation reinforced the definition of
72 oligopotent stem cells already described on the basis of their ability to generate *in vitro* myogenic,
73 adipogenic and osteogenic cells (24, 25). In a comparative study, Bartunek *et al.* (2013) showed
74 that BM-MSCs stimulated with a cardiopoietic cytokine cocktail before endomyocardial delivery
75 in MI context generated an increase of LVEF by 7% compared to 0.2% for cells without

76 stimulation (34). In keeping with this observation and the potential of hMuStem cells to
77 differentiate into cardiac cells, it might be interesting to further investigate the consequences of
78 their *in vitro* preconditioning before transplantation. A little more than half of the donor nuclei
79 were found outside skeletal or cardiac fibers as well as myofibroblasts and located in the collagen
80 matrix 3 weeks after intramyocardial transplantation. This indicated that an important fraction of
81 the hMuStem cells that survived in infarcted tissue did not directly differentiate but rather adopted
82 an interstitial location. Interestingly, we have already described such behavior of hMuStem cells
83 injected in cryo-injured skeletal muscle of immunodeficient mice giving rise to interstitial cells
84 after administration (24). These data are also consistent with findings reported by Quevedo *et al.*
85 (2009) who have determined that 76% of MSCs were located within the interstitial compartment
86 several weeks after their transendocardial injection in pig model of MI (35). These cells are
87 smaller than CMs and did not display cardiogenic phenotype, evoking an immature state.
88 Importantly, in contrast to what has been described with the murine MDSCs following their
89 implantation in acute MI in mice (18), we never observed fibers displaying hybrid skeletal and
90 cardiac muscle phenotype.

91 Arrhythmogenesis is a major risk consecutively to the set-up of a stem cell-based therapy in
92 heart diseases. Several serious ventricle arrhythmic events including tachycardia, bradycardia and
93 bigeminy were described following administration of murine MDSCs in a model of chronic MI
94 (36). Similar results were reported after transplantation of hESC-derived CMs in non-human
95 primate models of MI with detection of significant ventricle arrhythmias (37). Interestingly,
96 although the implantation of the hMuStem cells and their maintenance have been confirmed, no
97 arrhythmias or changes in cardiac electrical properties (heart rate, cardiac conduction and
98 ventricular repolarization) were observed in addition to those produced by the infarct. Here, the
99 small number of newly formed CMs probably explains at least in part why an absence of
00 arrhythmia was noted. Another explanation lies in the fact that donor cell-derived CMs were

01 implanted into the conjunctive matrix that did not allow a contact with host CMs and therefore
02 disturb their electrical properties.

03 In the heart of rats injected with hMuStem cells, the infarcted zone was characterized by the
04 presence of many human rapid and slow skeletal fibers as well as human TNNI⁺ fibers, this
05 limited the scar fibrotic tissue. It could be envisaged that the formation of these new muscle
06 fibers, although mainly of skeletal origin, may have a beneficial effect on LV remodeling
07 compared to a scar fibrous tissue, by allowing a mechanical stabilization of the weakened
08 myocardium. In connection with that, the use of acellular epicardial patches in the context of MI
09 has been shown to provide a therapeutic efficacy by increasing the mechanical integrity of
10 damaged LV tissues (38, 39). The authors described a reduced stress in the myocardium wall, a
11 reversed remodeling and an improved heart function with notably an increase in LVEF. An
12 essential finding in the present study is that LVEF was preserved 3 weeks after the transplantation
13 of hMuStem cells into the border region of the infarct. The presence of differentiated cells could
14 promote healing of the infarcted region by maintaining a better ventricle wall elasticity, inducing
15 a long-term preservation of function that could be associated with a reduction in LV dilation that
16 is the expected process during MI scarring. These findings are consistent with those of a previous
17 study revealing that the functional benefit of MSC therapy appeared to be out of proportion as
18 compared to what would be expected from the rate of engraftment (40). Due to the very limited
19 number of human TNNI⁺ fibers detected in the grafted host myocardium, this result could not be
20 attributed to the acquisition of a cardiac phenotype by the hMuStem cells. Our findings are in
21 agreement with those of Oshima *et al.* (2005) who also have reported a positive functional effect
22 despite a low incidence of cardiac phenotype acquisition (18).

23 We showed that the intramyocardial transplantation of hMuStem cells highly promoted host
24 angiogenesis by increasing capillary density in both central and border zones of infarct. These
25 findings, which probably contributed directly to structural and function recoveries, are in

26 agreement with those of Chen *et al.* (2013) who have described an increased microvascular
27 density within the infarcted region and in the peri-infarcted zones after human pericyte
28 transplantation in immunodeficient mice with acute MI (12). Of note here, microRNA-138 (mir-
29 138) has been shown to be involved in the increased angiogenesis associated with the repair of
30 infarct following the transplantation of adventitial progenitor cells (41). Moreover, the exosomal
31 mir-21 produced by MSCs increased the angiogenic proteins in MI model (42), while delivery of
32 adipose MSCs-derived exosomes in the peri-infarcted site promoted angiogenesis in a mouse
33 model of ischemic heart disease (43). Further experiments aimed to investigate the miRNA
34 secreted by hMuStem cells could significantly contribute to our understanding of their mode of
35 action.

36 Face to MI, a solution is to open the artery as soon as possible after the onset of symptoms.
37 For this clinical situation, the most relevant experimental model is that of ischemia reperfusion.
38 However, when the clinical delay is too long or the coronary obstruction makes it impossible to
39 pass a catheter, the angioplasty becomes impossible. These clinical cases may require the
40 injection of cells as soon as possible after MI to try to regenerate the injured areas of the heart
41 muscle or at least preserve its function. Our permanent ligation model with a short delay of 4
42 weeks post-MI is then quite relevant. However, despite routine use of this protocol in the
43 laboratory and preparatory work for optimal placement of the ligation on the coronary network,
44 the decrease in LVEF has never exceeded 20% of average. The weakness of the recorded values
45 is surely related to the expected reduced inflammatory response of this rat model. Considering
46 that cardiac muscle and vasculature in the heart are excessively damaged following MI, our
47 results obtained here on the LV remodeling appeared of major interest, establishing an anti-
48 apoptotic activity on host CMs and a pro-angiogenic effect. Besides, this global beneficial impact
49 on tissue organization was obtained after administration of a very low number of hMuStem cells,
50 suggesting that an even greater effect could be generated with a more elevated number of

51 transplanted hMuStem cells or alternatively with concomitant injection of hMuStem cell
52 secretome. The use of immunodeficient rats is another limitation of our study to fully understand
53 the behavior of the hMuStem cells and their actions on damaged heart tissue in the context of MI.
54 Indeed, it did not allow consideration of the immunological component which is yet essential for
55 survival, recruitment and function of donor cells through their interactions with inflammatory
56 cells (33, 44, 45). Moreover, this is important for cardiac remodeling, particularly with regard to
57 the critical supportive role of monocytes and/or macrophages for cardiogenesis and tissue repair
58 (46, 47). Finally, a limitation of the present study is that it did not allow to determine whether the
59 beneficial effect observed on the LV remodeling and the cardiac function could reflect a clinical
60 relevance, since our observation was made 4 weeks after the MI induction. It will be necessary to
61 perform a long-term analysis to determine how transplanted rats react after the compensatory
62 phase and whether they progressively develop a heart failure, as expected for untreated animals.

63 In conclusion, the hMuStem cell transplant protocol developed in the present study into MI
64 context originally revealed an ability to this skeletal muscle-derived stem cell population to
65 implant into infarcted heart where it highly attenuates the adverse tissue remodeling by
66 significantly limiting development of the fibrotic zone and improves the left ventricle
67 performances without otherwise inducing rhythmic abnormalities. Based on this preservation of
68 the cardiac function, these new findings pave the way for a potential expansion of clinical
69 applications of the hMuStem cells to heart diseases.

70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81

82 **Materials and Methods**

83

84 **Experimental design**

85 The present study was designed to characterize the graft behavior of the hMuStem cells into MI
86 context induced one week earlier in immunodeficient *Rag1* and *Il2rg* KO Sprague-Dawley rats
87 (RRG rats) as well as the tissue and functional consequences of this xenotransplantation protocol.
88 MI was generated by ligation of the left anterior descending (LAD) coronary artery. hMuStem
89 cells were independently isolated from skeletal muscle of four donors and phenotypically
90 characterized using a panel of appropriate cell surface markers and cardiac-lineage ones. To study
91 the functional parameters of the infarcted heart, ECG and echocardiography analyses were
92 performed repeatedly 1, 3 and 4 weeks after MI. To investigate *in vivo* the hMuStem cell fate,
93 fluorescent immunolabelings were developed using specific antibodies directed against human
94 lamin A/C, skeletal and cardiac muscle markers. To define the hMuStem cell impact on the MI-
95 induced adverse tissue remodeling, histological exploration and histomorphometry study were
96 done at the end of the protocol (*i.e.*, 4 weeks after the MI induction), with a focus on fibrosis,
97 vascularization, neomyogenesis and muscle fiber anisocytosis.

98

99 **Human skeletal muscle tissue**

00 *Paravertebralis* muscle biopsies of 12 to 19-year-old patients were sampled. Patients were free of
01 known muscle disease and underwent surgery for acute scoliosis at the Department of Pediatric
02 Surgery of the *Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Nantes* (France). A written informed
03 consent was collected for all patients. All protocols were approved by the Clinical Research
04 Department of the CHU (Nantes, France), according to the rules of the French Regulatory Health
05 Authorities (approval number: MESR/DC-2010-1199). The biological sample bank was
06 constituted in compliance with the national guidelines regarding the use of human tissue for
07 research (approval number: CPP/29/10).

08

09 Animals

10 Immunodeficient *Rag1* and *Il2rg* KO Sprague-Dawley rats (RRG rats) (48) were obtained from
11 obtained from plateforme TRIP (Nantes, France) and housed in a controlled environment
12 (temperature $21\pm 1^\circ\text{C}$, 12-h light/dark cycle) in the specific pathogen-free animal facilities at the
13 IRS1-UN (Nantes, France). All efforts were made to minimize suffering. An environmental
14 enrichment was used because the provision of rolls have been described as potentially modifying
15 the behavior of housed animals and deducing chronic pain. In addition, suitable end points that
16 are sufficiently predictive and early enough to limit pain to a minimum have been rigorously
17 applied. A total of 29 rats were included in this study. Animals were subdivided into three main
18 groups. The groups consisted of the necessary numbers of animals in order to obtain statistically
19 exploitable results. This number was determined on the basis of the expertise available to us for
20 the various investigations that we had to carry out. Obviously, we have limited the number of
21 individuals as much as possible. Thus, several investigations were carried out on the same
22 animals, in order to limit the number of experimental groups. The inclusions in the different
23 groups have been progressive in order to be able to anticipate any procedural dysfunction. The
24 first one contained 9 sham-operated rats while the two others, each composed of 10 rats, received
25 either vehicle (mock group) or hMuStem cells (treated group) (see table S3). All experimental
26 procedures with animals were carried out in strict accordance with European Union Directive
27 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes and authorized by the
28 French Ministry of Higher Education and Research after approval by the Ethics Committee on
29 Animal Experimentation from the *Pays de la Loire* Region (approval number: APAFIS 9573-
30 2017041311597719). To minimize suffering, analgesia treatment was performed with
31 buprenorphine (Buprecare[®]) at 0.1 mg/kg before and during 3 days post-MI and lidocaine
32 (Xylocaïne 1%, Laboratoire Aguettant) on local administration before surgical procedure. Rats

33 were euthanized by intravenous administration of sodium pentobarbital (300 mg, Dolethal,
34 Vetoquinol SA, Magny Vernois).

36 **Isolation and culture of hMuStem cells**

37 hMuStem cells were independently isolated from skeletal muscle of four patients as previously
38 described (25). The cells were amplified under standard conditions (37°C in a humidified
39 atmosphere containing 5% CO₂) in growth medium (GM; Macopharma, Mouvoux, France)
40 supplemented with 10% human serum (EFS, Nantes, France), 1% 10,000 IU/mL penicillin, 10
41 mg/mL streptomycin, 25 µg/mL fungizone (PSF; Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier,
42 France), 10 ng/mL human recombinant basic fibroblast growth factor (bFGF; Miltenyi, Bergisch
43 Gladbach, Germany) and 25 ng/mL human recombinant epidermal growth factor (EGF;
44 Miltenyi). Cells were seeded on CELLstart™ substrate-coated plastic flasks (Invitrogen, Cergy-
45 Pontoise, France) at 1.0 to 1.5 x 10⁴ cells/cm² and GM was replaced every 4 days.

47 **Flow Cytometry**

48 Cultured hMuStem cell samples (n = 4; passage 5 corresponding to 10.4-12.7 population
49 doublings) were resuspended in cold PBS/2% human serum and 1.0 x 10⁵ cells were incubated
50 (30 min, 4°C in darkness) with fluorochrome-conjugated antibodies (Abs) against the appropriate
51 cell surface marker at saturating concentration (table S6). Isotype-matched Abs and fluorescence
52 minus control samples were used as negative controls for gating and analyses. When applicable,
53 7-amino-actinomycin D (7-AAD; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) was added to
54 evaluate cell viability. Samples were acquired using a FACS Aria flow cytometer (BD
55 Biosciences) and data were analyzed using FlowJo software (FlowJo, Ashland, OR, USA). For
56 each labeling, at least 15 x 10³ viable cells were considered.

58 Reverse transcription PCR

59 Total RNA was extracted from dry pellets of 10^6 cells using the RNeasy mini kit following the
60 manufacturer's instructions (Qiagen, Santa Clara, CA, USA). After DNase treatment (Ambion,
61 Austin, TX, USA), RNA was quantified using a NanoDrop spectrophotometer (Labtech,
62 Wilmington, DE, USA) and processed for reverse transcriptase as previously described (24).
63 Real-time PCR reactions were performed with specific Taqman® primers and TaqMan®
64 universal PCR Master Mix (Life technologies™, Carlsbad, CA, USA) on the CFX96 PCR System
65 (BioRad, Marnes La Coquette, France). Data were normalized using HPRT1 as an internal control
66 and differential expression was calculated using the Δ Ct method. Oligonucleotide primers are
67 listed in table S7.

68

69 Coronary artery ligation

70 MI was induced by LAD coronary artery ligation. In brief, female RRG rats were anesthetized
71 with a mix of 3% isoflurane/97% oxygen inhalation, treated with buprenorphine (Buprecare®) at
72 0.1 mg/kg and the chest was shaved. A half dose of buprenorphine was injected 15 minutes before
73 the start of the surgery and the rest was added when animal woke up. A subcutaneous injection of
74 1% lidocaine (Xylocaïne) at each cutaneous incision point was realized. A post-operative
75 analgesia was implemented (0.1 mg/mL buprenorphine in subcutaneous injection) for 3 to 6 days
76 as needed. Animals were then intubated and ventilated using a Harvard Rodent Ventilator
77 (Harvard Apparatus, Les Ulis, France). The tidal volume was 2.5 mL and the respiratory rate was
78 63 breaths/min. Animals were placed in a supine position on a heating pad. A left lateral
79 thoracotomy in the fourth intercostal space was performed to expose the anterior surface of the
80 heart and the location of the LAD coronary artery on the surface of LV anterior wall was
81 identified. The proximal LAD coronary artery was ligated and occlusion was confirmed by
82 change in the color and akinesia of the involved LV wall area. Lungs were expanded before the

83 chest was closed to avoid pneumothorax. To locate the segmental parietal disorders and quantify
84 infarction, the wall motion score index was calculated by echocardiography measurements 7 days
85 after MI. The M-mode acquisitions were performed with parasternal incidence in "small axis" at
86 the base, in the middle part and at the apex of the LV. Systolic function was further assessed by
87 calculation of the LVEF using averaged measurements from 3 to 5 consecutive cardiac cycles
88 according to the American Society of Echocardiography guidelines to exclude rats without a
89 significant MI (defined as animals with a LVEF > 20%). Importantly, the parameters of LV
90 dimensions and function measured at day 7 follow-up analysis were not significantly different
91 between inclusion groups. Once this step had been validated, the animals were randomized and
92 underwent intramyocardial administration of either buffer only (mock group) or hMuStem cell
93 suspension (treated group). Each group was composed of 10 animals.

94

95 **Intramyocardial injection of hMuStem cells**

96 Before cell delivery, rats underwent a second open-chest surgery under anesthesia, using the same
97 conditions described above. Cell layers of hMuStem cell-derived primary cultures (n = 4,
98 independent batch) were dissociated after that cells were pelleted and resuspended at 15×10^6
99 cells/mL in 0.9% NaCl/2.5% homologous serum/10 IU/mL heparin. One hundred eighty
00 microliters of suspension (corresponding to 2.7×10^6 cells with an equal contribution of each cell
01 batch) were injected in six sites in the border zone of the infarct using a 1-mL syringe with a 27-
02 gauge needle. A new injection of analgesics, as described above, was performed after the animal
03 awoke before being placed in an incubator.

04

05 **Echocardiography**

06 Two-dimensional (2-D) echocardiography was performed on rat using a Vivid 7 Dimension
07 ultrasonography (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Body temperature was maintained at 37°C

08 with a heating pad (Harvard Apparatus) and ECG was monitored during measurements.
09 Anesthetic induction was achieved at 4% isoflurane (Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA),
10 and anesthesia was maintained at 2.5% for recording. Caution was given not to apply excessive
11 pressure over the chest, which could cause bradycardia and deformation of the heart. In order to
12 observe a possible structural remodeling, left ventricle diameter and free wall thickness were
13 measured from short- and long-axis images obtained by M-mode echocardiography. Systolic
14 function was further assessed by calculation of the LVEF using averaged measurements from 3 to
15 5 consecutive cardiac cycles in accordance with the American Society of Echocardiography
16 guidelines. Left ventricle end-diastolic and end-systolic volumes (LVEDV and LVESV,
17 respectively) were calculated from bi-dimensional long-axis parasternal views taken through the
18 infarcted area by means of the single-plane area-length method. The transmitral flow
19 measurements of ventricle filling velocity were obtained using pulsed Doppler, with an apical
20 four-chamber orientation. Doppler-derived mitral deceleration time, isovolumic relaxation time,
21 the early diastolic (E), the late diastolic (A) and the E/A ratio were obtained to assess diastolic
22 dysfunction. To avoid bias in the analysis, experiments were performed and analyzed by
23 investigators blinded to the inclusion. Echocardiography measurements were performed 1 day
24 before induction of MI (baseline) to overcome any initial functional differences. These steps
25 validated, the myocardial infarct procedure was performed. Ultrasound investigations were also
26 used to assess the consequences of the hMuStem cell delivery at 3 and 4 weeks after the induction
27 of MI. Data were calculated from four cardiac cycles according to the generally accepted formula
28 (49).

29

30 **Electrocardiography**

31 Rats were anaesthetized for electrocardiography (ECG) recording with isoflurane as described
32 above. Body temperature was maintained at 37°C with a heating pad (Harvard Apparatus). Six-

33 lead ECG was recorded with 25-gauge subcutaneous electrodes on a computer through an analog-
34 digital converter IOX 1.585 (EMKA Technologies, Paris, France) for monitoring and later
35 analyzed with ECG Auto v3.2.0.2 (EMKA Technologies). ECG parameters were measured on
36 lead II. Like echocardiography, ECG measurements were performed 1 day before induction of MI
37 (baseline) to overcome any initial functional differences. They were also obtained 4 weeks after
38 the induction of MI to assess the consequences of hMuStem cell delivery.

40 **Histopathological evaluation**

41 Four weeks after the induction of MI, rats were sacrificed by intravenous administration of
42 sodium pentobarbital (300 mg, Dolethal). After gross examination, heart, lungs, liver, spleen,
43 kidney, brain and *Biceps femoris* muscle were sampled to explore the fate of the hMuStem cells in
44 the infarcted heart. Furthermore, the heart was weighted and the tibial bone was measured. Then,
45 the heart was divided in 7 to 8 slices in a rat heart slicer matrix (Zivic Instruments, Pittsburgh,
46 PA, USA). The odd parts were frozen and 10 μ m-thick serial sections were cut for
47 immunolabeling and histo-enzymological assays. The even parts were fixed in 10% neutral
48 buffered formalin, embedded in paraffin wax, and 5 μ m-thick sections were cut and routinely
49 stained with hematoxylin-eosin-saffron (HES) for histopathological evaluation. Additional
50 sections were stained with Picrosirius red stain for collagen. A skilled pathologist certified by the
51 European College of Veterinary Pathology reported all lesions.

53 **Immunohistochemistry**

54 The frozen sections were first permeabilized (30 min, room temperature [RT]) using 0.1% Triton
55 X-100 (Sigma-Aldrich), incubated (30 min, RT) in blocking buffer (10% goat serum in 0.1 M
56 phosphate-buffered saline [PBS]; Sigma-Aldrich) and incubated overnight at 4°C with the
57 following primary Abs: mouse monoclonal IgG2ak anti-PCNA (1:1000, M0879, Dako, Glostrup,

Denmark), Alexa® red 555-conjugated Wheat Germ Agglutinin (1:500, W32464, Invitrogen), mouse monoclonal IgG2b anti-lamin A/C (1:100, MA3-1000, Invitrogen), mouse monoclonal IgG1 anti-skeletal fast myosin (1:400, M4276, Sigma-Aldrich), rabbit polyclonal anti-TNNT1 (1:500, HPA058448, Ozyme SAS, St Quentin Yvelines, France), rabbit monoclonal IgG2b anti-cardiac troponin I (1:250, Ab52852, Abcam, Cambridge, UK) and rabbit polyclonal anti-von Willebrand factor (1:1000, Ab6994, Abcam). Then, the appropriate Alexa® red 555 or green 488 secondary antibodies (1:300, A11008; A21127; A21434, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were added for 1 hour at RT after which the nuclei were counterstained with DAPI. For immunoperoxidase revelation, sections were incubated with biotinylated secondary Abs (1:300, E433; E432, Dako) in PBS with 5% rat serum for 1 hour. Bound Abs were detected with streptavidin (P397; Dako) and DAB Liquid Substrate (Dako). The acquisitions were performed under a confocal laser microscope (LSM 780, Zeiss, Oberkochen, Germany) using ZenBlack software (Zeiss) or under a slide scanner (Zeiss Axio Scan Z1, Zeiss). To assess apoptosis in the infarcted heart, TUNEL staining was performed by the Kit Click-iT® Plus TUNEL Assay (Abcam, Cambridge, UK) following the manufacturer's instructions. The apoptotic cells were scored from five randomly selected fields per group under a confocal laser microscope (LSM 780, Zeiss). Lamin A/C⁺ and differentiated cells were counted within serial sections cut from the apex to the septum of the infarcted hearts (S1, S3, S5 or from S1 to S5 according to the rat). All counting were realized at least in 2 sections separated from 100 µm on each slide of all included rats (n = 5). The differentiated cells were obtained by counting the number of fibers expressing the different human specific antibodies relative to the total number of human element counted (n = 1754 for the 5 rats explored). In the both groups, angiogenesis was expressed as the percentage of the heart section area occupied by vWF immunolabeling in three different areas. For that, the same threshold was applied to each picture using Fiji software while the vWF⁺ area and the size of the different vWF⁺ elements were determined automatically. To investigate anisocytosis, the

83 minimum Feret diameter (MinFeret; shortest distance between two parallel tangents of the muscle
84 fiber edges) of the muscle fibers was used and determined manually on HES sections.

86 **Histomorphometry**

87 Morphometric analysis was done using a digital camera (Nikon DXM 1200; Nikon Instruments,
88 Badhoevedorp, the Netherlands) combined with image-analysis software (NIS; Nikon). The
89 quantifications and morphometric analyses of the immunolabeled sections were blindly
90 performed using x20 magnifications. To investigate anisocytosis, the MinFeret of the transversal
91 CMs was used and determined manually. The recognition of the CM perimeter was manually
92 realized to prevent potential errors. Fiber size was documented measuring the MinFeret on at least
93 100 fibers per sample on at least two randomly selected microscopic fields in HES-stained
94 sections. The same operator measuring five times the same sample tested repeatability. The intra-
95 assay variations coefficients were always lower than 10%. Fibrosis was determined as the ratio of
96 areas rich in collagen using specific Picosirius staining on the total muscle area in overall cross
97 section. To quantify it, the area occupied by collagen labeling was automatically measured using
98 a determined threshold in NIS freeware.

00 **PCR detection of human DNA**

01 The Alu sequence remains the marker of choice when assessing the biodistribution of transplanted
02 cells in xenogeneic models, due to genomic repetition and species specificity. The human Alu
03 (hAlu) sequence can be amplified and quantified by qPCR from genomic DNA (gDNA) with a
04 high degree of accuracy. gDNA was isolated from frozen samples using the NucleoSpin tissue kit
05 (Macherey-Nagel, Hoerd, France) following the manufacturer's instructions. PCR reactions were
06 carried out on 0.5 µg of input gDNA. Human Alu-specific oligonucleotide primers were designed
07 using Oligo Primer Analysis Software v.7 (Molecular Biology Insights, Colorado Springs, CO,

08 USA) and synthesized by MWG Operon (Eurofins, Ebersberg, Germany): forward primer 5'-
09 CATGGTGAAACCCCGTCTCTA-3' and reverse primer 5'-GCCTCAGCCTCCCGAGTAG-3'.
10 Probe: 5'-ATTAGCCGGGCGTGGTGGCG-3'. Primers targeting rat GAPDH were also
11 prepared: forward primer 5'-GAACATCATCCCTGCATCCA-3' and reverse primer 5'-
12 CCAGTGAGCTTCCCGTTCA-3'. PCR amplifications were performed with the following
13 program: initial denaturation (10 min, 95°C), followed by 40 cycles (15 s, 95°C; 1 min, 60°C; and
14 1 min, 72°C). By scatter plotting the standard concentrations versus the (Ct) values and
15 determining the equation of the best fit line, the number of human cell equivalents in each qPCR
16 well was calculated.

17

18 **Statistical analysis**

19 Data were reported as mean \pm standard deviation (SD). Statistical analysis was performed in
20 GraphPad Prism software v6.0f (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) using the Mann-
21 Whitney test and the One or Two-way ANOVA, followed by the application of Sidak multiple
22 comparison post hoc test. Differences were considered significant at p -value < 0.05 .

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43 **H2: Supplementary Materials**
44

45 **Fig. S1.** Study of the Doppler-derived early diastolic (E), the late diastolic (A) and the ratio E/A
46 to assess diastolic dysfunction associated to evaluations of the IsoVolumetric Relaxation Time
47 (IVRT) and deceleration times (DT).

48 **Table S1.** ECG parameters of each sham-operated rat receiving hMuStem cells before (baseline)
49 and 3 weeks after myocardial transplantation (corresponding to 4 weeks after sham procedure):
50 individual values.

51 **Table S2.** Echocardiographic parameters of each sham-operated rat receiving hMuStem cells
52 before (baseline) and 3 weeks after myocardial transplantation (corresponding to 4 weeks after
53 sham procedure): individual values.

54 **Table S3.** Summary of the rat experiments

55 **Table S4.** ECG parameters of each rat injected with vehicle (mock group) or hMuStem cells
56 (treated group) before (baseline) and 4 weeks after induction of myocardial infarction (post-MI):
57 individual values.

58 **Table S5.** Echocardiographic parameters of each rat injected with vehicle (mock group) or
59 hMuStem cells (treated group) before (baseline) and 4 weeks after induction of myocardial
60 infarction (post-MI): individual values.

61 **Table S6.** List of antibodies used for hMuStem cell characterization by flow cytometry analysis.

62 **Table S7.** List of primers used for cardiac-lineage phenotype of hMuStem cells by RT-qPCR
63 analysis.

64 **Movie S1.** (.avi format). Echocardiographic acquisition of baseline values of rats performed with
65 parasternal incidence in "small axis" in the middle part of the LV.

66 **Movie S2.** (.avi format). Increase in LV chamber dimensions following induction of the MI,
67 leading to a systolic function decrease that was assessed by the ejection fraction, as visualized in
68 both mock and treated groups.

69 **Movie S3.** (.avi format). Decrease of the systolic function and LV structural remodeling in the
70 mock group, three weeks post-vehicle injection.

71 **Movie S4.** (.avi format). Preservation of the cardiac function in the treated group, three weeks
72 post-cell injection.

73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96

97 **References**

- 98
- 99 1. E. M. Hansson, M. E. Lindsay, K. R. Chien, Regeneration Next: Toward Heart Stem Cell
00 Therapeutics, *Cell Stem Cell* **5**, 364–377 (2009).
- 01 2. R. Madonna, P. Ferdinandy, R. De Caterina, J. T. Willerson, A. J. Marian, Recent
02 developments in cardiovascular stem cells, *Circ. Res.* **115**, e71–e78 (2014).
- 03 3. V. F. M. Segers, R. T. Lee, Stem-cell therapy for cardiac disease., *Nature* **451**, 937–42 (2008).
- 04 4. P. Menasché, A. A. Hagège, J. T. Vilquin, M. Desnos, E. Abergel, B. Pouzet, A. Bel, S.
05 Sarateanu, M. Scorsin, K. Schwartz, P. Bruneval, M. Benbunan, J. P. Marolleau, D. Duboc,
06 Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular
07 dysfunction, *J. Am. Coll. Cardiol.* **41**, 1078–1083 (2003).
- 08 5. A. Bel, E. Messas, O. Agbulut, P. Richard, J. L. Samuel, P. Bruneval, A. A. Hagège, P.
09 Menasché, Transplantation of autologous fresh bone marrow into infarcted myocardium: A word
10 of caution, *Circulation* **108** (2003).
- 11 6. M. Gnecci, H. He, N. Noiseux, O. D. Liang, L. Zhang, F. Morello, H. Mu, L. G. Melo, R. E.
12 Pratt, J. S. Ingwall, V. J. Dzau, Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified
13 mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement, *FASEB J.* **20**,
14 661–669 (2006).
- 15 7. R. Bolli, X. L. Tang, S. K. Sanganalmath, O. Rimoldi, F. Mosna, A. Abdel-Latif, H. Jneid, M.
16 Rota, A. Leri, J. Kajstura, Intracoronary delivery of autologous cardiac stem cells improves
17 cardiac function in a porcine model of chronic ischemic cardiomyopathy, *Circulation* **128**, 122–
18 131 (2013).
- 19 8. K. Matsuura, A. Honda, T. Nagai, N. Fukushima, K. Iwanaga, M. Tokunaga, T. Shimizu, T.
20 Okano, H. Kasanuki, N. Hagiwara, I. Komuro, Transplantation of cardiac progenitor cells
21 ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction in mice, *J. Clin. Invest.* **119**, 2204–
22 2217 (2009).

- 23 9. K. Cheng, A. Ibrahim, M. T. Hensley, D. Shen, B. Sun, R. Middleton, W. Liu, R. R. Smith, E.
24 Marbán, Relative roles of CD90 and c-Kit to the regenerative efficacy of cardiosphere-derived
25 cells in humans and in a mouse model of myocardial infarction, *J. Am. Heart Assoc.* **3** (2014).
- 26 10. R. Romagnuolo, H. Masoudpour, A. Porta-Sánchez, B. Qiang, J. Barry, A. Laskary, X. Qi, S.
27 Massé, K. Magtibay, H. Kawajiri, J. Wu, T. Valdman Sadikov, J. Rothberg, K. M. Panchalingam,
28 E. Titus, R. K. Li, P. W. Zandstra, G. A. Wright, K. Nanthakumar, N. R. Ghugre, G. Keller, M. A.
29 Laflamme, Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Regenerate the Infarcted Pig
30 Heart but Induce Ventricular Tachyarrhythmias, *Stem Cell Reports* **12**, 967–981 (2019).
- 31 11. M. Kawamura, S. Miyagawa, K. Miki, A. Saito, S. Fukushima, T. Higuchi, T. Kawamura, T.
32 Kuratani, T. Daimon, T. Shimizu, T. Okano, Y. Sawa, Feasibility, safety, and therapeutic efficacy
33 of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte sheets in a porcine ischemic
34 cardiomyopathy model, *Circulation* **126** (2012).
- 35 12. C. W. Chen, M. Okada, J. D. Proto, X. Gao, N. Sekiya, S. A. Beckman, M. Corselli, M.
36 Crisan, A. Saparov, K. Tobita, B. Peault, J. Huard, Human pericytes for ischemic heart repair,
37 *Stem Cells* **31**, 305–316 (2013).
- 38 13. J. Zhang, Y. Wu, A. Chen, Q. Zhao, Mesenchymal stem cells promote cardiac muscle repair
39 via enhanced neovascularization, *Cell. Physiol. Biochem.* **35**, 1219–1229 (2015).
- 40 14. E. G. Schmuck, J. M. Koch, T. A. Hacker, C. R. Hatt, M. T. Tomkowiak, K. K. Vigen, N.
41 Hendren, C. Leitzke, Y. qi Zhao, Z. Li, J. M. Centanni, D. J. Hei, D. Schwahn, J. Kim, P.
42 Hematti, A. N. Raval, Intravenous Followed by X-ray Fused with MRI-Guided Transendocardial
43 Mesenchymal Stem Cell Injection Improves Contractility Reserve in a Swine Model of
44 Myocardial Infarction, *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **8**, 438–448 (2015).
- 45 15. P. Menasche, Cardiac cell therapy: Lessons from clinical trials, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **50**,
46 258–265 (2011).
- 47 16. L. Zeng, Q. Hu, X. Wang, A. Mansoor, J. Lee, J. Feygin, G. Zhang, P. Suntharalingam, S.

- 48 Boozer, A. Mhashilkar, C. J. Panetta, C. Swingen, R. Deans, A. H. L. From, R. J. Bache, C. M.
49 Verfaillie, J. Zhang, Bioenergetic and functional consequences of bone marrow-derived
50 multipotent progenitor cell transplantation in hearts with postinfarction left ventricular
51 remodeling, *Circulation* **115**, 1866–1875 (2007).
- 52 17. R. R. Makkar, R. R. Smith, K. Cheng, K. Malliaras, L. E. J. Thomson, D. Berman, L. S. C.
53 Czer, L. Marbán, A. Mendizabal, P. V. Johnston, S. D. Russell, K. H. Schuleri, A. C. Lardo, G.
54 Gerstenblith, E. Marbán, Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after
55 myocardial infarction (CADUCEUS): A prospective, randomised phase 1 trial, *Lancet* **379**, 895–
56 904 (2012).
- 57 18. H. Oshima, T. R. Payne, K. L. Urish, T. Sakai, Y. Ling, B. Gharaibeh, K. Tobita, B. B. Keller,
58 J. H. Cummins, J. Huard, Differential myocardial infarct repair with muscle stem cells compared
59 to myoblasts, *Mol. Ther.* **12**, 1130–1141 (2005).
- 60 19. P. Menasché, Myoblast transfer in heart failure, *Surg. Clin. North Am.* **84**, 125–139 (2004).
- 61 20. S. Fernandes, J. C. Amirault, G. Lande, J. M. Nguyen, V. Forest, O. Bignolais, G. Lamirault,
62 D. Heudes, J. L. Orsonneau, M. F. Heymann, F. Charpentier, P. Lemarchand, Autologous
63 myoblast transplantation after myocardial infarction increases the inducibility of ventricular
64 arrhythmias, *Cardiovasc. Res.* **69**, 348–358 (2006).
- 65 21. K. Rouger, T. Larcher, L. Dubreil, J. Y. Deschamps, C. Le Guiner, G. Jouvion, B. Delorme,
66 B. Lieubeau, M. Carlus, B. Fornasari, M. Theret, P. Orlando, M. Ledevin, C. Zuber, I. Leroux, S.
67 Deleau, L. Guigand, I. Testault, E. Le Rumeur, M. Fiszman, Y. Chérel, Systemic delivery of
68 allogenic muscle stem cells induces long-term muscle repair and clinical efficacy in duchenne
69 muscular dystrophy dogs, *Am. J. Pathol.* **179**, 2501–2518 (2011).
- 70 22. F. Robriquet, A. Lardenois, C. Babarit, T. Larcher, L. Dubreil, I. Leroux, C. Zuber, M.
71 Ledevin, J. Y. Deschamps, Y. Fromes, Y. Cherel, L. Guevel, K. Rouger, Differential gene
72 expression profiling of dystrophic dog muscle after MuStem cell transplantation, *PLoS One* **10**

- 73 (2015).
- 74 23. A. Lardenois, S. Jagot, M. Lagarrigue, B. Guével, M. Ledevin, T. Larcher, L. Dubreil, C.
75 Pineau, K. Rouger, L. Guével, Quantitative proteome profiling of dystrophic dog skeletal muscle
76 reveals a stabilized muscular architecture and protection against oxidative stress after systemic
77 delivery of MuStem cells, *Proteomics* **16**, 2028–2042 (2016).
- 78 24. J. Lorant, C. Saury, C. Schleder, F. Robriquet, B. Lieubeau, E. Négroni, I. Leroux, L.
79 Chabrand, S. Viau, C. Babarit, M. Ledevin, L. Dubreil, A. Hamel, A. Magot, C. Thorin, L.
80 Guevel, B. Delorme, Y. Péréon, G. Butler-Browne, V. Mouly, K. Rouger, Skeletal Muscle
81 Regenerative Potential of Human MuStem Cells following Transplantation into Injured Mice
82 Muscle, *Mol. Ther.* **26**, 618–633 (2018).
- 83 25. C. Saury, A. Lardenois, C. Schleder, I. Leroux, B. Lieubeau, L. David, M. Charrier, L.
84 Guével, S. Viau, B. Delorme, K. Rouger, Human serum and platelet lysate are appropriate xeno-
85 free alternatives for clinical-grade production of human MuStem cell batches, *Stem Cell Res.*
86 *Ther.* **9** (2018).
- 87 26. F. X. Lin, G. Z. Zheng, B. Chang, R. C. Chen, Q. H. Zhang, P. Xie, D. Xie, G. Y. Yu, Q. X.
88 Hu, D. Z. Liu, S. X. Du, X. D. Li, Connexin 43 Modulates Osteogenic Differentiation of Bone
89 Marrow Stromal Cells Through GSK-3beta/Beta-Catenin Signaling Pathways, *Cell. Physiol.*
90 *Biochem.* **47**, 161–175 (2018).
- 91 27. M. Wiesner, O. Berberich, C. Hoefner, T. Blunk, P. Bauer-Kreisel, Gap junctional
92 intercellular communication in adipose-derived stromal/stem cells is cell density-dependent and
93 positively impacts adipogenic differentiation, *J. Cell. Physiol.* **233**, 3315–3329 (2018).
- 94 28. T. Y. Kostrominova, Application of WGA lectin staining for visualization of the connective
95 tissue in skeletal muscle, bone, and ligament/tendon studies, *Microsc. Res. Tech.* **74**, 18–22
96 (2011).
- 97 29. M. Creane, L. Howard, T. O'Brien, C. M. Coleman, Biodistribution and retention of locally

- 98 administered human mesenchymal stromal cells: Quantitative polymerase chain reaction–based
99 detection of human DNA in murine organs, *Cytotherapy* **19**, 384–394 (2017).
- 00 30. J. Lorant, T. Larcher, N. Jaulin, B. Hedan, A. Lardenois, I. Leroux, L. Dubreil, M. Ledevin,
01 H. Goubin, S. Moullec, J. Y. Deschamps, C. Thorin, C. André, O. Adjali, K. Rouger, Vascular
02 Delivery of Allogeneic MuStem Cells in Dystrophic Dogs Requires Only Short-Term
03 Immunosuppression to Avoid Host Immunity and Generate Clinical/Tissue Benefits, *Cell*
04 *Transplant.* **27**, 1096–1110 (2018).
- 05 31. C. Toma, M. F. Pittenger, K. S. Cahill, B. J. Byrne, P. D. Kessler, Human mesenchymal stem
06 cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart, *Circ.* **1**, 93-98 (2002).
- 07 32. X. P. Huang, Z. Sun, Y. Miyagi, H. M. D. Kinkaid, L. Zhang, R. D. Weisel, R. K. Li,
08 Differentiation of allogeneic mesenchymal stem cells induces immunogenicity and limits their
09 long-term benefits for myocardial repair, *Circulation* **122**, 2419–2429 (2010).
- 10 33. B. Wang, L. Zhang, H. Cao, J. Yang, M. Wu, Y. Ma, H. Fan, Z. Zhan, Z. Liu, Myoblast
11 transplantation improves cardiac function after myocardial infarction through attenuating
12 inflammatory responses, *Oncotarget.* **40**, 68780-68794 (2017).
- 13 34. J. Bartunek, A. Behfar, D. Dolatabadi, M. Vanderheyden, M. Ostojic, J. Dens, B. El Nakadi,
14 M. Banovic, B. Beleslin, M. Vrolix, V. Legrand, C. Vrints, J. L. Vanoverschelde, R. Crespo-Diaz,
15 C. Homsy, M. Tendera, S. Waldman, W. Wijns, A. Terzic, Cardiopoietic stem cell therapy in
16 heart failure: The C-CURE (cardiopoietic stem cell therapy in heart failURE) multicenter
17 randomized trial with lineage-specified biologics, *J. Am. Coll. Cardiol.* **61**, 2329–2338 (2013).
- 18 35. H. C. Quevedo, K. E. Hatzistergos, B. N. Oskouei, G. S. Feigenbaum, J. E. Rodriguez, D.
19 Valdes, P. M. Pattany, J. P. Zambrano, Q. Hu, I. McNiece, A. W. Heldman, J. M. Hare,
20 Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy
21 via trilineage differentiating capacity, *PNAS.* **33**, 14022-14027 (2009).
- 22 36. N. Sekiya, K. Tobita, S. Beckman, M. Okada, B. Gharaibeh, Y. Sawa, R. L. Kormos, J.

- 23 Huard, Muscle-derived stem cell sheets support pump function and prevent cardiac arrhythmias in
24 a model of chronic myocardial infarction, *Mol. Ther.* **21**, 662–669 (2013).
- 25 37. J. J. H. Chong, X. Yang, C. W. Don, E. Minami, Y. W. Liu, J. J. Weyers, W. M. Mahoney, B.
26 Van Biber, S. M. Cook, N. J. Palpant, J. A. Gantz, J. A. Fugate, V. Muskheli, G. M. Gough, K.
27 W. Vogel, C. A. Astley, C. E. Hotchkiss, A. Baldessari, L. Pabon, H. Reinecke, E. A. Gill, V.
28 Nelson, H. P. Kiem, M. A. Laflamme, C. E. Murry, Human embryonic-stem-cell-derived
29 cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts, *Nature* **510**, 273–277 (2014).
- 30 38. X. Lin, Y. Liu, A. Bai, H. Cai, Y. Bai, W. Jiang, H. Yang, X. Wang, L. Yang, N. Sun, H. Gao,
31 A viscoelastic adhesive epicardial patch for treating myocardial infarction, *Nat. Biomed. Eng.*
32 (2019).
- 33 39. N. H. Chi, M. C. Yang, T. W. Chung, N. K. Chou, S. S. Wang, Cardiac repair using chitosan-
34 hyaluronan/silk fibroin patches in a rat heart model with myocardial infarction, *Carbohydr.*
35 *Polym.* **92**, 591–597 (2013).
- 36 40. A. R. Williams, K. E. Hatzistergos, B. Addicott, F. McCall, D. Carvalho, V. Suncion, A. R.
37 Morales, J. Da Silva, M. A. Sussman, A. W. Heldman, J. M. Hare, Enhanced effect of combining
38 human cardiac stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells to reduce infarct size and to
39 restore cardiac function after myocardial infarction, *Circulation* **127**, 213–223 (2013).
- 40 41. R. Katare, F. Riu, K. Mitchell, M. Gubernator, P. Campagnolo, Y. Cui, O. Fortunato, E.
41 Avolio, D. Cesselli, A. P. Beltrami, G. Angelini, C. Emanuelli, P. Madeddu, Transplantation of
42 human pericyte progenitor cells improves the repair of infarcted heart through activation of an
43 angiogenic program involving micro-RNA-132, *Circ. Res.* **109**, 894–906 (2011).
- 44 42. K. Wang, Z. Jiang, K. A. Webster, J. Chen, H. Hu, Y. Zhou, J. Zhao, L. Wang, Y. Wang, Z.
45 Zhong, C. Ni, Q. Li, C. Xiang, L. Zhang, R. Wu, W. Zhu, H. Yu, X. Hu, J. Wang, Enhanced
46 Cardioprotection by Human Endometrium Mesenchymal Stem Cells Driven by Exosomal
47 MicroRNA-21, *Stem Cells Transl. Med.* **6**, 209–222 (2017).

- 48 43. T. Ma, Y. Chen, Y. Chen, Q. Meng, J. Sun, L. Shao, Y. Yu, H. Huang, Y. Hu, Z. Yang, J.
49 Yang, Z. Shen, MicroRNA-132, delivered by mesenchymal stem cell-derived exosomes, promote
50 angiogenesis in myocardial infarction, *Stem Cells Int.* **2018** (2018).
- 51 44. M. M. Zaruba, W. M. Franz, Role of the SDF-1-CXCR4 axis in stem cell-based therapies for
52 ischemic cardiomyopathy, *Expert Opin. Biol. Ther.* **10**, 321–335 (2010).
- 53 45. S. Malek, E. Kaplan, J. F. Wang, Q. Ke, J. S. Rana, Y. Chen, B. G. Rahim, M. Li, Q. Huang,
54 Y. F. Xiao, F. W. A. Verheugt, J. P. Morgan, J. Y. Min, Successful implantation of intravenously
55 administered stem cells correlates with severity of inflammation in murine myocarditis, *Pflugers*
56 *Arch. Eur. J. Physiol.* **452**, 268–275 (2006).
- 57 46. A. Sica, A. Mantovani, Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas, *J. Clin. Invest.*
58 **122**, 787–795 (2012).
- 59 47. K. J. Lavine, S. Epelman, K. Uchida, K. J. Weber, C. G. Nichols, J. D. Schilling, D. M.
60 Ornitz, G. J. Randolph, D. L. Mann, Distinct macrophage lineages contribute to disparate patterns
61 of cardiac recovery and remodeling in the neonatal and adult heart, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
62 **111**, 16029–16034 (2014).
- 63 48. S. Ménoret, L. H. Ouisse, L. Tesson, F. Delbos, D. Garnier, S. Remy, C. Usal, J. P.
64 Concordet, C. Giovannangeli, V. Chenouard, L. Brusselle, E. Merieau, V. Nerrière-Daguin, F.
65 Duteille, F. Bellier-Waast, A. Fraichard, T. H. Nguyen, I. Anegon, Generation of
66 Immunodeficient Rats With Rag1 and Il2rg Gene Deletions and Human Tissue Grafting Models,
67 *Transplantation* **102**, 1271–1278 (2018).
- 68 49. L. Chen, J. Zhang, X. Hu, K. D. Philipson, S. M. Scharf, The Na⁺/Ca²⁺ exchanger-1
69 mediates left ventricular dysfunction in mice with chronic intermittent hypoxia, *J. Appl. Physiol.*
70 **109**, 1675–1685 (2010).

71
72
73
74

Acknowledgments

General: We thank Cindy Schleder and Samuel Fréhel (INRA/Oniris UMR 0703, Nantes, France) for their respective contribution to the qPCR assay and morphometry measures, Blandine Lieubeau (IECM, INRA, Oniris, UBL, F-44307, Nantes, France) for her help in designing cytometry experiments. Additionally, we thank the technical staff of the UTE IRS1-UN animal facility (Nantes, France) and Therassay core facility (Nantes, France) for providing the ECG recording platform and the ultra-sound scanner. We are grateful to Nathalie Gaborit (l'institut du thorax, INSERM, CNRS, Nantes, France) and Jean-Thomas Vilquin (UMRS 974 Sorbonne Université - INSERM - AIM, Paris, France) for helpful discussion and improving the manuscript. The authors also thank Chantal Thorin (NP3 unit, Nutrition, Physiopathologie et Pharmacologie, Oniris, Nantes, France) for assisting with our statistical analysis.

Funding: This work was supported by grant “AAP Pari scientifique 2016” from the Région Pays de la Loire and the Bioregate research/education/innovation program (project title: MuSCO; number: 34000650), LabCom SOURIRAT Project (ANR-14-LAB5-0008), “TEFOR” «Investissements d’Avenir» (ANRIINSB-0014) and Labex IGO Project «Investissements d’Avenir» (ANR-11-LABX-0016-01). It has also benefited from INRA (KR's team allocation) and the research unit's own funds (2016-2019), and from the Inserm annual allocation to l'institut du thorax (FC's team allocation). The academic thesis of AR was also financed by Bioregate program. **Author contributions:** AR performed the *in vivo* protocol, collected, assembled and interpreted all results, and participated to the preparation of the manuscript; GT performed the *in vivo* protocol and the echocardiography investigation, collected and interpreted the results, and participated to the written of the manuscript; TL performed the animal sacrificing, participated to the tissue sampling and provided histopathology/histomorphology expertise; IL isolated the hMuStem cell batches, prepared the cell suspensions for transplantation, and produced some of the immunohistochemistry experiments; ML participated to the tissue sampling, generated the

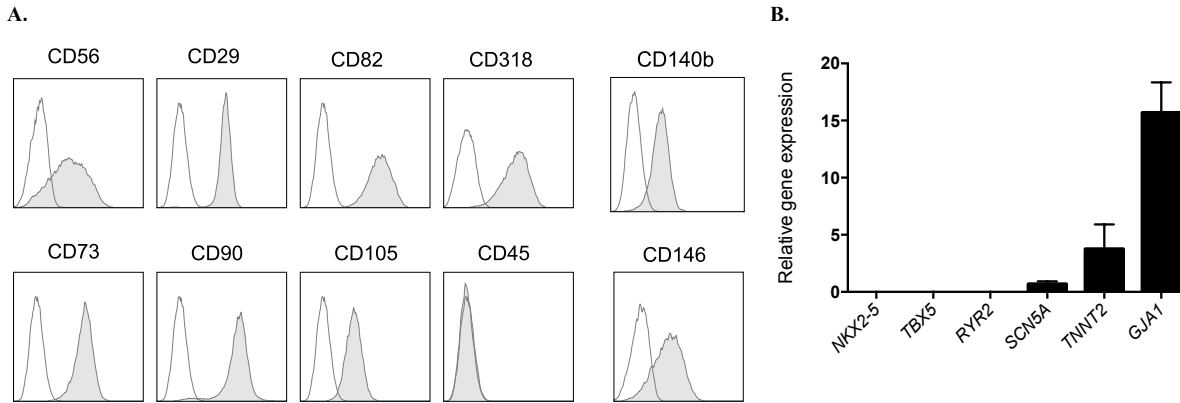
01 histological slides and performed the immunohistochemistry experiments; AH participated the *in*
02 *vivo* experiments, recorded and analyzed the ECGs, and took care of the animals; CB performed
03 the molecular biology experiments; RF provided expertise in confocal microscopy and
04 participated to histomorphometry analyses; LD provided bio-imaging expertise; SM and IA
05 generated the immunodeficient rat model and provided the immunodeficient rats required for the
06 study; FC, KR and LG designed the study, wrote the manuscript and coordinated the research and
07 strategy. All authors read and approved the final manuscript. **Competing interests:** The authors
08 declare that they have no competing interests.

09
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 **Figures and Tables**

44

Figure 1



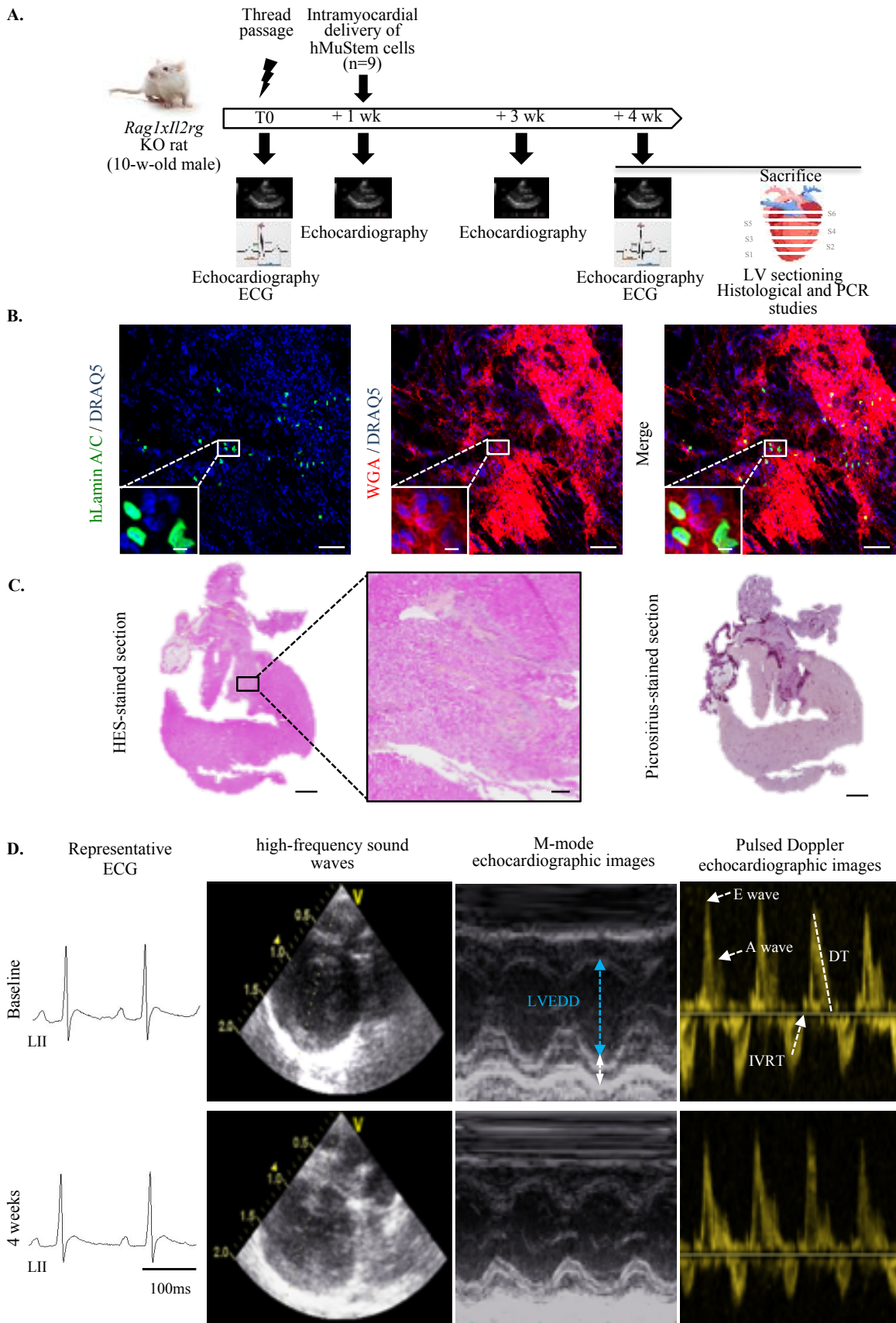
45

46

47 **Fig. 1. Cell lineage-specific phenotype of hMuStem cell population.**

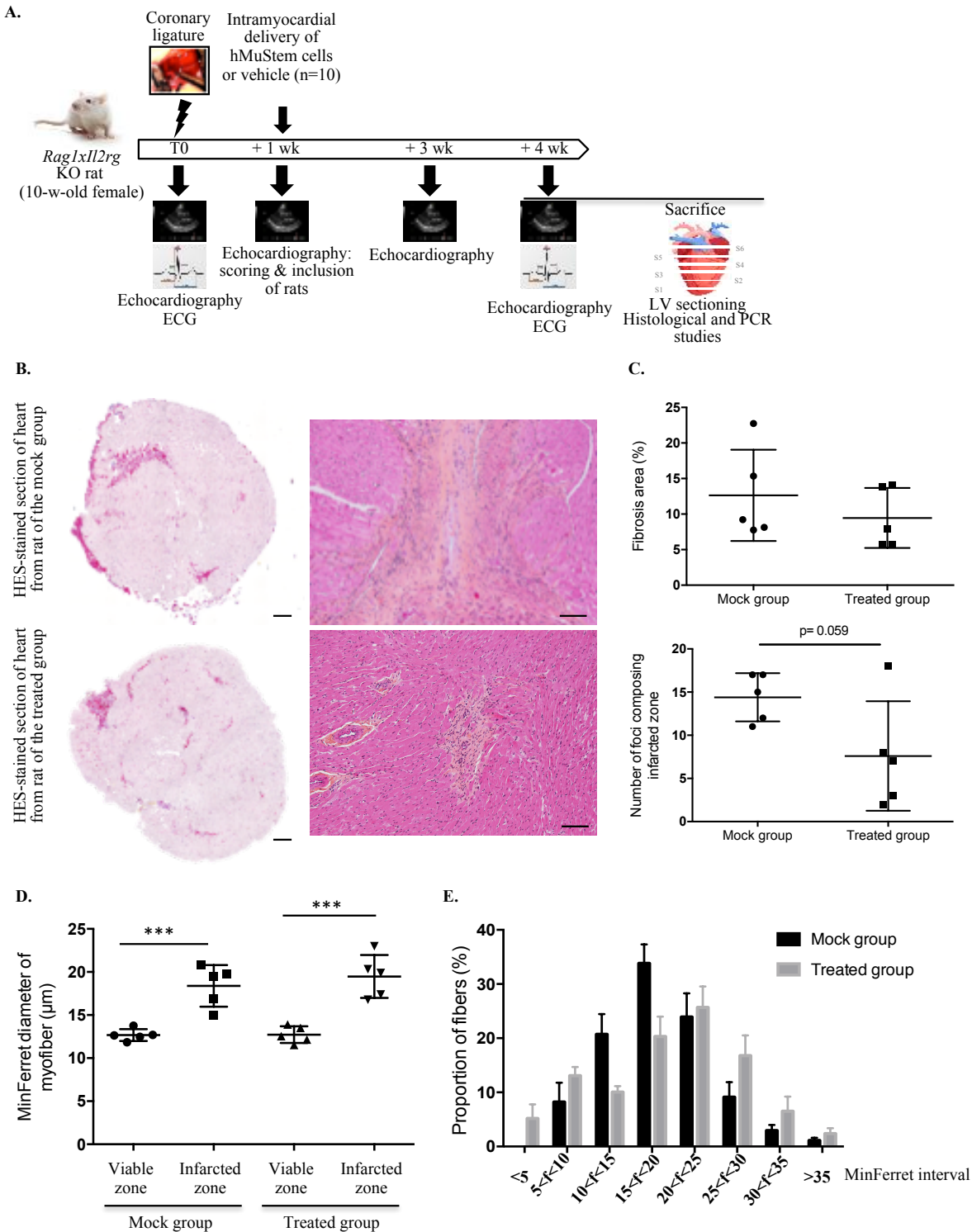
48 (A) Representative flow cytometry profiles of hMuStem cells (n = 4 independent batches)
 49 cultured in growth medium (passage 5). The expression of markers of myogenic/satellite cells
 50 (CD56, CD29, CD82 and CD318), mesenchymal stem cells (CD73, CD90 and CD105),
 51 hematopoietic stem cells (CD45) and perivascular cells (CD140b, CD146) were investigated.
 52 Isotype controls and specific signals are in white and gray, respectively. (B) Expression of
 53 transcripts specific to cardiac-lineage markers (*NKX2.5*, *TBX5*, *RYR2*, *SCN5A*, *TNNT2* and *GJA1*
 54 (*Cx-43*) on four MuStem cell batches. *HPRT1* was used as housekeeping gene.

Figure 2



57 **Fig. 2. Engraftment of skeletal hMuStem cells in heart of immunodeficient rats.**
58 **(A)** Schematic representation of the experimental design. **(B)** Representative Picrosirius- and
59 hematein-eosin-safron (HES)-stained cross-sections of the cardiac injection zone. **(C)** Frozen
60 cross-section of recipient heart were submitted to wheat germ agglutinin (WGA) and co-labeled
61 with specific human lamin A/C Ab. hMuStem cells appeared quite all located in the dense
62 connective tissue. Nuclei were counterstained using DRAQ5 (dark blue). Scale bar, 1 mm (B),
63 250 μm (insert, B), 100 μm (C) and 10 μm (insert, C). **(D)** Representative lead II ECG traces and
64 two-dimensional (2-D) echocardiography and pulsed Doppler images of rats injected with
65 hMuStem cells before (baseline) and 4 weeks after thread passage. M-mode: Time movement
66 mode; LVEDD: Left ventricle end diastolic diameter; E/A ratio: early diastolic (E)/late diastolic
67 (A) ratio, DT: deceleration time, IVRT: isovolumetric relaxation time.

Figure 3



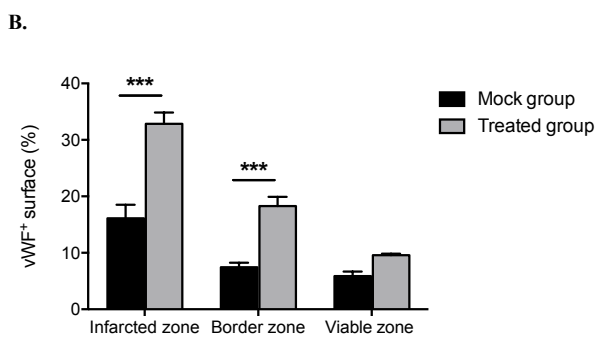
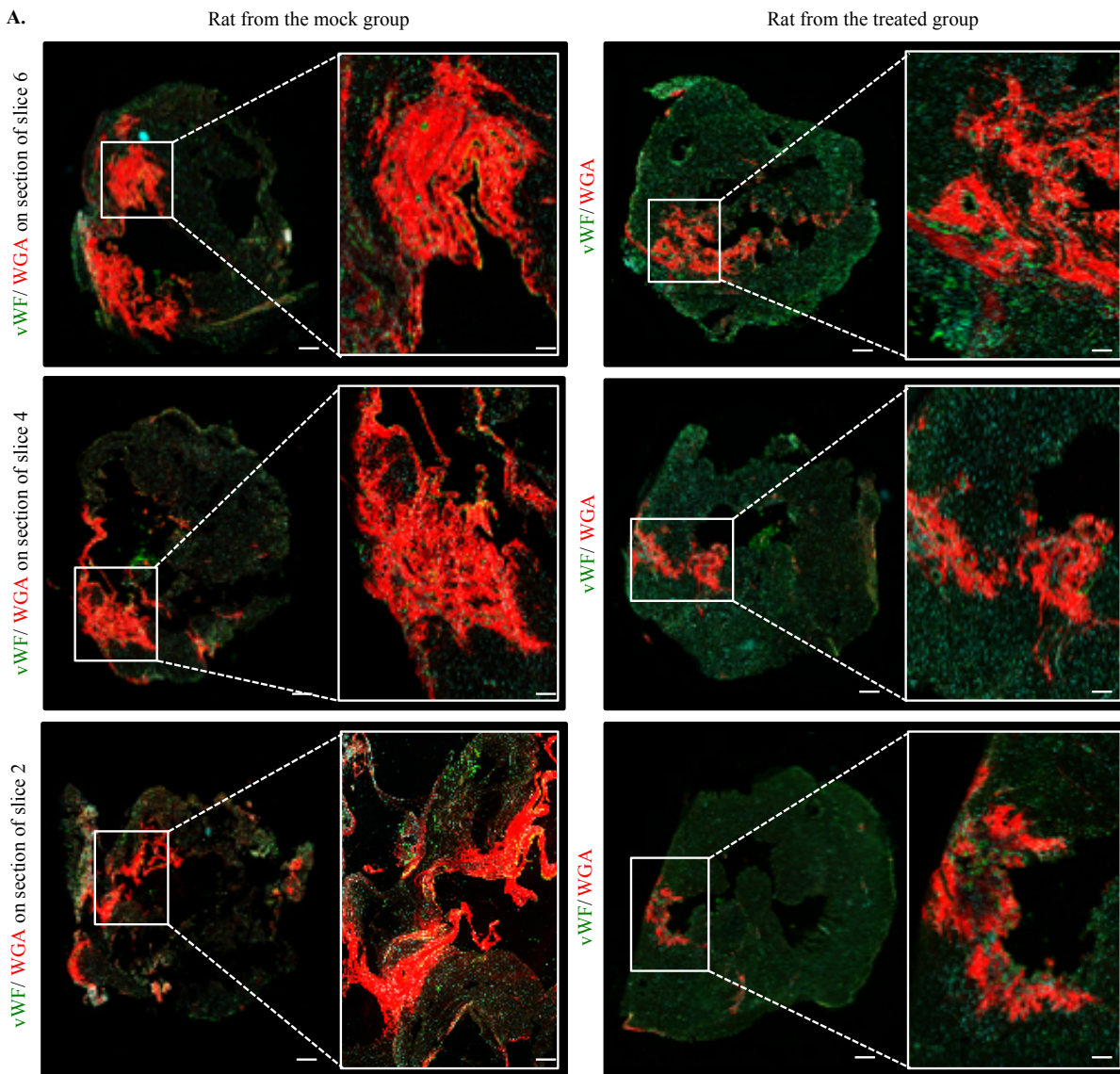
68
69
70
71
72

73 **Fig. 3. Myocardial transplantation of hMuStem cells limits the expansion of the fibrotic**
74 **compartment.**

75 **(A)** Schematic representation of the experimental design. **(B)** Representative hematein-eosin-
76 safron (HES)-stained cross-section of the whole heart from rats of the mock and treated groups
77 and magnification of the infarcted zone enabling to visualize the fibrotic, border and viable zones.
78 Scale bar, 1 mm and 100 μm (insert). **(C)** Quantification of the fibrotic tissue surface and the
79 number of foci composing infarcted zone observed in rats from the mock and treated groups. **(D)**
80 Quantification of the MinFerret diameter of myofiber that composed the infarcted and viable zones
81 on rats belonging to the mock and treated groups. **(E)** Distribution of muscle fibers according to
82 the minimal Feret diameter in the infarcted zone of rat from the mock and treated group.
83 Statistics: Mann-Whitney test and One-way ANOVA with Sidak post hoc test were applied for C
84 and D, respectively; $n = 5$ animals per group; $*p < 0.05$; $***p < 0.001$.

85
86
87

Figure 4

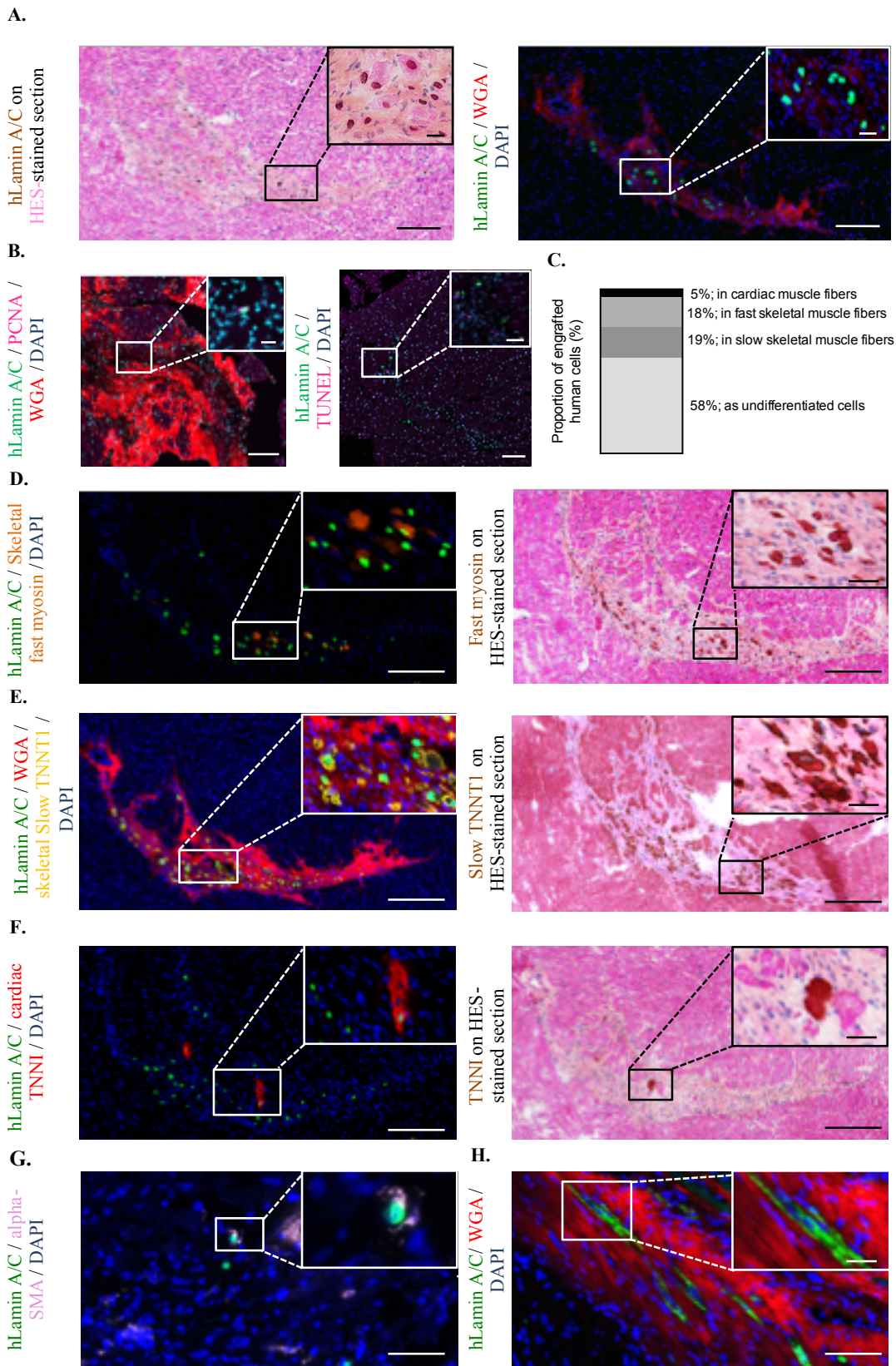


88
89
90
91
92
93

94 **Fig. 4. Myocardial transplantation of hMuStem cells enhances angiogenesis.**
95 **(A)** Representative cross-sections of recipient hearts (rats from the mock and treated groups
96 represented on the left and right column, respectively) following co-immunolabelings with
97 specific Abs against von Willebrand factor (vWF) and wheat germ agglutinin (WGA). Scale bar,
98 1 mm and 150 μm (insert). **(B)** Quantification of the vWF⁺ surface present on the infarct, border
99 and viable zones on rats from the mock and treated groups. Statistics: Two-way ANOVA with
00 Sidak post hoc test; $n = 5$ animals per group; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

01

Figure 5

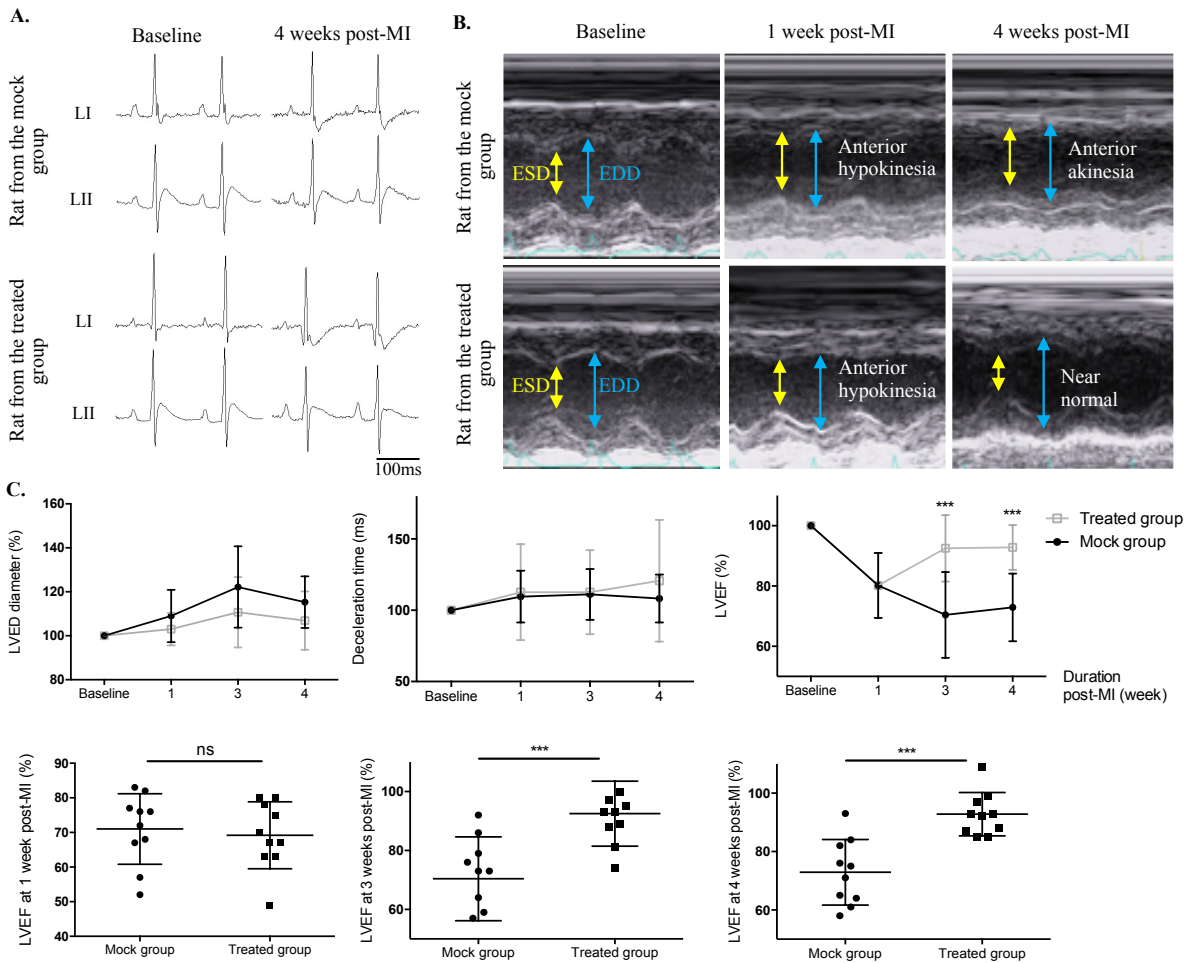


02
03
04

Fig. 5. hMuStem cells persist into infarcted tissue as viable cells and adopt distinct differentiation profile.

(A) To visualize the presence of hMuStem cells in the context of MI, sections were first labeled with specific human lamin A/C Ab and then counterstained with hematein-eosin-safron (HES). Second, cross-sections were submitted to fluorescent co-immunolabelings directed against lamin A/C and wheat germ agglutinin (WGA). **(B)** To investigate the fate of the transplanted hMuStem cells, lamin A/C immunolabeling was successively combined with those of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and the terminal dUPT nick end-labeling (TUNEL) immunolabeling. **(C)** Quantification of the phenotype of engrafted human cells using fluorescent co-immunolabelings against lamin A/C and either skeletal fast myosin (MHC) isoform **(D)**, skeletal troponin T1 (TNNT1) isoform **(E)** or cardiac troponin I (TNNI) isoform **(F)** were performed to determine the differentiation behavior of the transplanted hMuStem cells. In parallel, recipient heart muscle serial sections were immunolabeled with Abs directed against each of these human specific markers and stained with HES. **(G)** Co-immunolabelings against human lamin A/C and WGA were performed on longitudinal sections, revealing the presence of fibers inserted into conjunctive tissue, which were composed of several human nuclei. **(H)** To explore the ability of hMuStem cells to differentiate into myofibroblasts, Abs directed against lamin A/C and α -smooth muscle actin (α -SMA) were applied to same sections. Nuclei were counterstained with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI (blue). Scale bar, 200 μm (A, C-E), 25 μm (insert, A), 500 μm (left, B), 20 μm (insert: left, A; C-E), 200 μm (right, B), 50 μm (insert: right, B; G), 80 μm (F), 18 μm (insert, F) and 10 μm (insert, G).

Figure 6



28
29

30 **Fig. 6. hMuStem cells improve function of infarcted heart after myocardial transplantation.**

31 **(A)** Representative lead I and lead II ECGs of rats from the mock group and the treated group
 32 before (baseline) and 4 weeks post-MI. **(B, C)** Ultra-sound investigations were performed
 33 repeatedly 1, 3 and 4 weeks after MI by two-dimensional (2-D) echocardiography and pulsed
 34 Doppler Doppler (M-mode: Time movement mode; LVEDD: Left ventricle end diastolic
 35 diameter; LVEF: Left ventricle ejection fraction; DT: deceleration time). Statistics: Kruskal-
 36 Wallis test; n = 10 animals per group; *** $p < 0.001$.

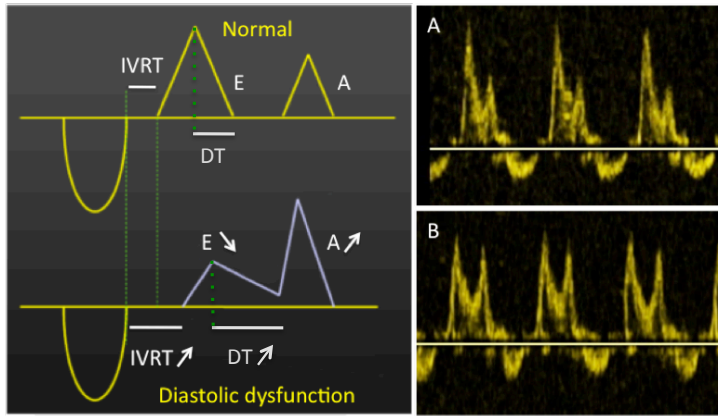
37

38
39

40
41
42

Supplementary Materials

Supplemental Figure 1



43
44

45 **Fig. S1. Study of the Doppler-derived early diastolic (E), late diastolic (A) and E/A ratio**
46 **assess diastolic dysfunction associated to evaluations of the IsoVolumetric Relaxation Time**
47 **(IVRT) and deceleration times (DT).** The E wave corresponds to the passive filling phase of the
48 left ventricle, while the A-wave corresponds to the active phase of filling after the atrial
49 contraction. In physiological condition, as the atrium contribution to ventricle filling is low, the
50 E/A ratio is greater than 1. However, if the ventricle presents a filling defect, called diastolic
51 dysfunction, the atrial activity increases in order to compensate the ventricle failure. Then, the
52 ratio E/A approaches 1. It is the same for the Isovolumetric relaxation time (IVRT) and the DT,
53 which represent the time required to the ventricle to fill. If these indicators rise, they will be
54 additional diastolic dysfunction indicators.

55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66

11167 **Table S1:** ECG parameters of each sham-operated rat receiving hMuStem cells before (baseline) and 3 weeks after myocardial transplantation (corresponding to 4 weeks
11168 after sham procedure): individual values.

Sham	Heart rate (bpm)		P wave (ms)		PR interval (ms)		QRS (ms)		QT interval (ms)	
	Baseline	4 weeks	Baseline	4 weeks	Baseline	4 weeks	Baseline	4 weeks	Baseline	4 weeks
1	418	298	20	19	46	41	21	21	86	82
2	416	368	20	22	46	52	24	25	80	84
3	406	379	20	21	48	49	22	23	77	61
4	411	364	20	19	45	44	21	25	73	74
5	438	368	19	20	50	52	20	22	73	79
6	286	401	15	21	51	49	17	23	80	80
7	411	428	22	15	51	47	19	21	87	70
8	409	414	23	20	54	53	17	17	89	81
9	400	420	20	18	47	43	19	21	78	84
Mean ± SD	399.4 ± 41.3	382.2 ± 37.6	19.9 ± 2.1	19.4 ± 1.9	48.7 ± 2.8	47.8 ± 4.1	20 ± 2.2	22 ± 2.3	80.3 ± 5.5	77.2 ± 7.2

11169
11170
11171
11172
11173
11174
11175
11176
11177
11178
11179
11180
11181
11182
11183

Table S2: Echocardiographic parameters of each sham-operated rat receiving hMuStem cells before (baseline) and 3 weeks after myocardial transplantation (corresponding to 4 weeks after sham procedure): individual values.

Sham	Heart rate (bpm)		Wall thickness (mm)		LV diameter (mm)		Deceleration time (ms)	
	Baseline	4 weeks	Baseline	4 weeks	Baseline	4 weeks	Baseline	4 weeks
1	332	351	1.6	1.3	7.44	7.36	44	35
2	223	360	1.51	1.57	8.87	8.06	47	35
3	347	348	1.73	1.79	6.93	7.44	36	37
4	381	366	1.66	2.13	7.45	8.1	39	36
5	290	376	1.4	2	6.25	6.25	37	36
6	356	361	1.8	1.69	6.02	7.45	44	74
7	366	363	1.92	1.69	7.29	8.44	41	46
8	342	370	1.73	1.67	7.48	6.78	33	49
9	343	427	1.3	1.71	7.23	7.01	31	49
Mean ± SD	336 ± 51	369 ± 23	1.63 ± 0.2	1.73 ± 0.24	7.22 ± 0.82	7.43 ± 0.69	39 ± 5	44 ± 13

Sham	IVRT (ms)		Ejection fraction (%)		LVESV (cm3)		LVEDV (cm3)	
	Baseline	4 weeks	Baseline	4 weeks	Baseline	4 weeks	Baseline	4 weeks
1	28	28	95	95	0.05	0.04	0.92	0.89
2	27	25	90	87	0.05	0.15	0.47	1.14
3	26	29	82	84	0.13	0.15	0.72	0.92
4	29	30	93	78	0.07	0.24	0.92	1.16
5	27	26	64	85	0.15	0.09	0.57	0.57
6	25	25	89	85	0.06	0.14	0.51	0.92
7	28	22	82	90	0.16	0.13	0.87	1.30
8	25	27	84	78	0.14	0.15	0.93	0.71
9	28	22	81	98	0.16	0.02	0.81	0.78
Mean ± SD	27 ± 1	26 ± 3	84 ± 9	87 ± 7	0.11 ± 0.05	0.12 ± 0.07	0.75 ± 0.19	0.93 ± 0.23

1184
1185

1186
1187
181

88 **Table S3.** Summary of the rat experiments

89

Group	Rats	MI	Frozen conditioning	Paraffin-embedded
Sham	1	No	Human cell quantification	/
	2	No	Human cell quantification	/
	3	No	Human cell quantification	/
	4	No	Human cell quantification	/
	5	No	S1, S3, S5: Phenotyping	S2, S4, S6: Fibrosis
	6	No	S1, S3, S5: Phenotyping	S2, S4, S6: Fibrosis
	7	No	S1, S3, S5: Phenotyping	S2, S4, S6: Fibrosis
	8	No	S1, S3, S5: Phenotyping	S2, S4, S6: Fibrosis
	9	No	S1, S3, S5: Phenotyping	S2, S4, S6: Fibrosis
Mock	10	Yes	Human cell quantification	/
	11	Yes	Human cell quantification	/
	12	Yes	Angiogenesis	/
	13	Yes	Angiogenesis	/
	14	Yes	Angiogenesis	/
	15	Yes	/	Fibrosis, anisocytosis
	16	Yes	/	Fibrosis, anisocytosis
	17	Yes	S1, S3, S5: Angiogenesis, PCNA, TUNEL	S2, S4, S6: Fibrosis, anisocytosis
	18	Yes	S1, S3, S5: Angiogenesis, PCNA, TUNEL	S2, S4, S6: Fibrosis, anisocytosis
19	Yes	S1, S3, S5: Angiogenesis, PCNA, TUNEL	S2, S4, S6: Fibrosis, anisocytosis	
Treated	20	Yes	Human cell quantification	/
	21	Yes	Human cell quantification	/
	22	Yes	Human cell quantification	/
	23	Yes	Human cell quantification, phenotyping, angiogenesis, PCNA, TUNEL	/
	24	Yes	Human cell quantification, phenotyping, angiogenesis, PCNA, TUNEL	/
	25	Yes	/	Fibrosis, anisocytosis
	26	Yes	/	Fibrosis, anisocytosis
	27	Yes	S1, S3, S5: Phenotyping, angiogenesis, PCNA, TUNEL	S2, S4, S6: Fibrosis, anisocytosis
	28	Yes	S1, S3, S5: Phenotyping, angiogenesis, PCNA, TUNEL	S2, S4, S6: Fibrosis, anisocytosis
29	Yes	S1, S3, S5: Phenotyping, angiogenesis, PCNA, TUNEL	S2, S4, S6: Fibrosis, anisocytosis	

90

91

92

93

94

95

96

v

1197 **Table S4:** ECG parameters of each rat injected with vehicle (mock group) or hMuStem cells (treated group) before (baseline) and 4 weeks after induction of myocardial
 1198 infarction (post-MI): individual values.

Mock group	Heart rate (bpm)		P wave (ms)		PR interval (ms)		QRS (ms)		QT interval (ms)	
	Baseline	4 weeks	Baseline	4 weeks	Baseline	4 weeks	Baseline	4 weeks	Baseline	4 weeks
1	338	403	17	21	51	49	20	18	74	60
2	425	444	19	19	45	42	18	22	71	78
3	380	375	21	20	48	50	19	23	81	83
4	458	428	15	23	38	49	19	18	72	76
5	469	365	17	19	46	51	21	22	75	78
6	405	332	22	15	44	43	18	21	96	81
7	465	349	20	25	48	52	19	25	75	94
8	468	434	16	17	42	46	19	17	78	84
9	459	441	17	18	42	43	18	18	70	75
10	422	373	17	17	44	43	20	21	77	74
Mean ± SD	428.9 ± 26.1	394.4 ± 41.4	18.1 ± 2.1	19.4 ± 3.2	44.8 ± 2.1	46.8 ± 3.8	19.1 ± 1.1	20.5 ± 2.6	76 ± 5.1	78 ± 6.8
Treated group	Baseline	4 weeks	Baseline	4 weeks	Baseline	4 weeks	Baseline	4 weeks	Baseline	4 weeks
1	412	390	19	14	45	43	21	18	71	64
2	385	382	15	19	37	47	19	21	73	90
3	328	408	21	20	48	49	20	21	78	79
4	375	355	22	19	51	47	19	19	77	73
5	425	355	22	37	53	54	18	21	79	69
6	360	344	22	16	43	44	23	29	72	70
7	389	350	14	18	44	52	21	25	85	70
8	405	345	23	15	44	51	19	23	90	92
9	441	354	18	28	43	47	18	20	75	90
10	447	432	20	23	43	45	22	27	82	88
Mean ± SD	395 ± 36.6	371.5 ± 28.7	19.7 ± 3.1	20.9 ± 6.6	45.1 ± 4.6	47.9 ± 3.4	19.9 ± 1.7	22.4 ± 3.4	79 ± 5.5	78.5 ± 10.1

1199
1200

Table S5: Echocardiographic parameters of each rat injected with vehicle (mock group) or hMuStem cells (treated group) before (baseline) and 4 weeks after induction of myocardial infarction (post-MI): individual values.

Mock group	Heart rate (bpm)		Wall thickness (mm)		LV diameter (mm)		Deceleration time (ms)		E/A ratio	
	Baseline	4 weeks	Baseline	4 weeks	Baseline	4 weeks	Baseline	4 weeks	Baseline	4 weeks
1	386	360	1.26	1.61	5.57	6.05	47.0	44.0	1.24	1.15
2	407	407	1.77	1.74	5.57	7.25	36.0	45.0	1.16	1.22
3	371	372	1.45	1.73	6.15	6.55	46.0	52.0	1.19	1.33
4	419	394	2.05	1.33	6.00	6.96	33.0	43.0	1.25	1.38
5	390	340	1.66	1.55	5.93	6.06	53.0	55.0	1.16	1.14
6	425	398	1.50	2.12	5.45	7.17	29.0	39.0	1.82	1.39
7	361	355	1.51	1.64	5.72	5.68	39.0	41.0	1.42	1.07
8	383	289	1.49	1.69	5.51	6.97	40.0	37.0	1.50	1.83
9	353	409	1.80	1.45	5.99	7.29	39.0	34.0	1.69	1.03
10	314	387	1.71	1.43	5.68	6.22	35.0	34.0	1.40	0.95
Mean ± SD	381 ± 32	371 ± 37	1.62 ± 0.22	1.63 ± 0.22	5.76 ± 0.24	6.62 ± 0.58	39.7 ± 7.2	42.4 ± 7.03	1.38 ± 0.23	1.25 ± 0.25
Treated group	Baseline	4 weeks	Baseline	4 weeks	Baseline	4 weeks	Baseline	4 weeks	Baseline	4 weeks
1	300	360	1.05	1.33	6.12	6.70	25	47	1.58	1.47
2	296	282	1.37	1.55	6.40	6.64	40	41	1.54	1.44
3	265	405	1.39	1.67	6.20	6.93	35	35	1.79	1.75
4	315	393	2.16	2.14	6.40	6.22	44	38	1.48	1.66
5	422	394	1.64	1.64	6.34	5.91	55	38	1.19	1.58
6	324	322	1.30	1.54	6.59	6.56	42	44	2.28	1.82
7	350	341	1.15	2.10	6.61	6.58	35	41	1.58	1.44
8	391	336	1.14	1.26	5.92	6.25	24	49	1.31	1.55
9	363	346	1.83	1.73	5.52	5.93	40	48	1.23	1.53
10	463	349	1.85	1.43	5.23	7.38	34	39	1.51	1.78
Mean ± SD	349 ± 62	353 ± 37	1.49 ± 0.37	1.64 ± 0.29	6.13 ± 0.45	6.51 ± 0.45	37.4 ± 9.09	42 ± 4.78	1.55 ± 0.31	1.6 ± 0.14

184
1201

Mock group	IVRT (ms)			Ejection fraction (%)			LVESV			LVEDV		
	Baseline	4 weeks	4 weeks	Baseline	4 weeks	4 weeks	Baseline	4 weeks	4 weeks	Baseline	4 weeks	4 weeks
1	26.0	26.0	66	88	0.05	0.19	0.41	0.55				
2	24.0	24.0	73	96	0.02	0.21	0.45	0.78				
3	24.0	25.0	82	88	0.05	0.08	0.42	0.43				
4	22.0	25.0	60	84	0.04	0.14	0.23	0.35				
5	28.0	28.0	81	97	0.02	0.10	0.49	0.52				
6	22.0	28.0	53	87	0.06	0.39	0.39	0.89				
7	23.0	28.0	75	92	0.04	0.11	0.44	0.43				
8	24.0	28.0	57	88	0.05	0.33	0.4	0.77				
9	25.0	26.0	45	78	0.11	0.47	0.50	0.87				
10	27.0	23.0	51	80	0.04	0.27	0.43	0.56				
Mean ± SD	24.5 ± 2.01	26.1 ± 1.85	64.3 ± 13.06	87.8 ± 6.16	0.05 ± 0.02	0.23 ± 0.13	0.42 ± 0.07	0.62 ± 0.20				
Treated group	Baseline	4 weeks	4 weeks	Baseline	4 weeks	4 weeks	Baseline	4 weeks	4 weeks	Baseline	4 weeks	4 weeks
1	33	29	72	85	0.08	0.16	0.57	0.57				
2	27	25	80	86	0.11	0.14	0.52	0.68				
3	30	23	75	86	0.07	0.19	0.49	0.74				
4	27	28	68	73	0.11	0.21	0.51	0.67				
5	25	25	91	92	0.03	0.04	0.35	0.47				
6	24	24	83	86	0.04	0.13	0.52	0.43				
7	19	23	87	80	0.14	0.08	0.66	0.65				
8	23	27	80	87	0.07	0.13	0.49	0.67				
9	24	24	81	92	0.03	0.09	0.40	0.49				
10	26	22	82	97	0.01	0.16	0.34	0.90				
Mean ± SD	25.8 ± 3.85	25.0 ± 2.31	79.9 ± 6.81	86.4 ± 6.65	0.07 ± 0.04	0.13 ± 0.05	0.49 ± 0.10	0.63 ± 0.14				

Table S6. List of antibodies used for hMuStem cell characterization by flow cytometry analysis.

Primary antibody	Company and reference	Corresponding isotype
CD29-PE	BD Biosciences, 555443	Mouse IgG1-PE
CD45-PE	BD Biosciences, 555483	Mouse IgG1-PE
CD56-PE	BD Biosciences, 555516	Mouse IgG1-PE
CD73-PE	BD Biosciences, 550257	Mouse IgG1-PE
CD82-PE	Biolegend, 342103	Mouse IgG1-PE
CD90-PE	BD Biosciences, 555596	Mouse IgG1-PE
CD105-PE	BD Biosciences, 560839	Mouse IgG1-PE
CD140b-PE	BD Biosciences, 558821	Mouse IgG2a-PE
CD146-PE-Cy7	BD Biosciences, 562135	Mouse IgG1-PE-Cy7
CD318-PE/Cy7	Biolegend, 324015	Mouse IgG2b-PE/Cy7
Mouse IgG1 control-PE	BD Biosciences, 555749	N/A
Mouse IgG2a control-PE	R&D Systems, IC003P	N/A
Mouse IgG1 control-PE/Cy7	BD Biosciences, 557872	N/A
Mouse IgG2b control-PE/Cy7	BD Biosciences, 560542	N/A

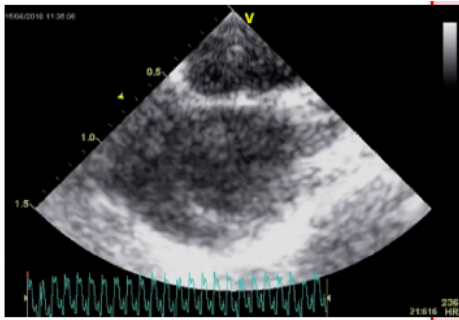
05
06
07
08
09
10
11
12
13
14
15
16
17
18

19 **Table S7.** List of primers used for cardiac-lineage phenotype of hMuStem cells by RT-qPCR
20 analysis.
21

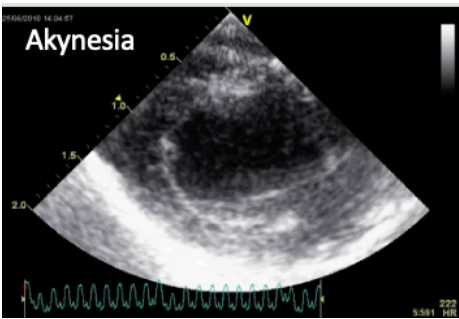
Gene symbol	Accession no.	Product no
<i>HPRT1</i>	NM_000194.2	HS02800695
<i>NKX2.5</i>	NM_004387	HS00231763
<i>TBX5</i>	NM_000192.3	HS00361155
<i>RYR2</i>	NM_001035.2	HS00181461
<i>SCN5A</i>	NM_000335.4	HS00165693
<i>TNNT2</i>	NM_000364.3	HS00943911
<i>GJA1 (Cx-43)</i>	NM_000165.4	HS00748445

22
23
24

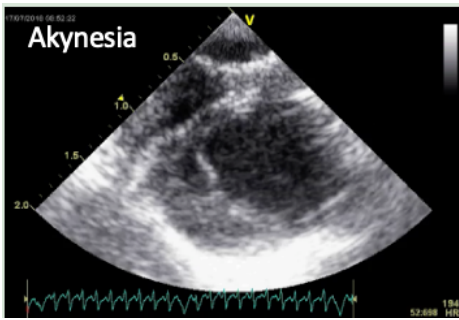
25 **Movie S1** (.avi format). Echocardiographic acquisition of baseline values of rats performed with
 26 parasternal incidence in "small axis" in the middle part of the LV.



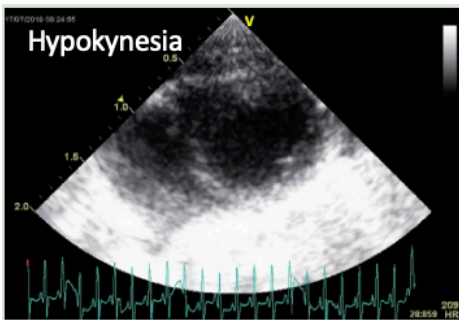
27
 28 **Movie S2** (.avi format). Increase in LV chamber dimensions following induction of the MI,
 29 leading to a systolic function decrease that was assessed by the ejection fraction, as visualized in
 30 both mock and treated groups.



31
 32 **Movie S3** (.avi format). Decrease of the systolic function and LV structural remodeling in the
 33 mock group, three weeks post-vehicle injection.



34
 35 **Movie S4** (.avi format). Preservation of the cardiac function in the treated group, three weeks
 36 post-cell injection.



37

Chapitre 2 : Caractérisation des vésicules extracellulaires produites par les cellules hMuStem

1. Positionnement

A l'origine, l'objectif principal de la thérapie cellulaire était d'apporter de nouvelles cellules viables à l'organe défectueux dans le but que celles-ci s'intègrent et rétablissent le fonctionnement normal de cet organe. Cependant, des études ont démontré des effets bénéfiques à la suite de la greffe cellulaire malgré, de manière surprenante, la mort prématurée de la plupart des cellules et leur non-persistance dans l'organe hôte (Bellamy et al. 2015; Gnecci et al. 2008). Parallèlement, des bénéfices fonctionnels ont été observés suite à l'administration de molécules ou de facteurs isolés (Lai et al. 2010). Toutes ces données suggèrent que l'effet paracrine est largement médié par le contenu biologique des VE et certaines équipes les envisagent comme alternative ou complément à la thérapie cellulaire (Matsuzaka et al. 2016). En effet, les VE sont des constituants du sécrétome des cellules qui ont longtemps été considérés comme de simples déchets, mais qui font depuis une dizaine d'années, l'objet de nombreuses études. Ainsi, des travaux ont rapporté l'efficacité thérapeutique de VE dérivées de cellules dans différents contextes pathologiques incluant les pathologies cardiaques telles que l'IDM ou l'IC (Kervadec et al. 2016).

Au vu de ces données et suite aux résultats obtenus consécutivement à l'injection des cellules hMuStem dans un contexte d'infarctus, il nous est apparu intéressant de purifier les VE produites par les cellules hMuStem afin de pouvoir analyser leur contenu.

- Cet axe s'est organisé en deux parties, à savoir la mise au point d'un protocole d'isolement des VE^{hMuStem} et une caractérisation de celles-ci.

2. Matériel et Méthodes

a) Culture des cellules hMuStem

Des cellules provenant de 4 lots générés à partir de muscle squelettique de patients distincts ont étéensemencées en milieu de prolifération M2Stem à 2500 cellules/cm² sur 4 flasques (F175 cm²) préalablement coatées avec du CellStart™ (Gibco, Fisher) (2h à 37°C). A 60% de

confluence, le milieu de culture a été remplacé par du milieu M2Stem dépourvu de VE obtenu par ultracentrifugation à 100 000 g à 4°C pendant minimum 12h). Les cultures ont ensuite été incubées 48h soit en normoxie (20% d'O₂, 5% de CO₂, 37°C) ou en hypoxie (1% d'O₂, 5% de CO₂, 37°C).

b) Isolement et caractérisation des vésicules extracellulaires

i. Préparation par ultracentrifugation

Pour isoler les VE, le milieu de culture a été récupéré après 48h de culture des cellules hMuStem passées en conditions normoxique ou hypoxique. Les VE ont été isolées selon un protocole de centrifugation différentielle adapté de Kowal et al. (2016). Deux premières centrifugations à 400g et 2000g de respectivement 10 et 20 min ont permis d'éliminer les cellules et débris cellulaires (Heraeus Megafuge 40, Thermo Scientific) suivi de 40 min à 10 000 g à 4°C. Afin d'éliminer les corps apoptotiques, ces centrifugations ont été suivies d'une étape de filtration (filtre de 0,22 µm, Millex-GP, Millipore). Le surnageant a ensuite été transféré dans des tubes pour ultracentrifugation sur rotor fixe 90Ti (Beckman Coulter Optima XE-90) de 70 minutes à 110 000 g à 4°C. Le surnageant de cette culture a été récupéré (nommé SEV) et stocké à 4°C. Le culot qui contient les VE a été resuspendu dans du PBS filtré à 0,1 µm et de nouveau ultracentrifugé à 70 minutes à 110 000 g à 4°C. Le culot récupéré contenant les VE d'intérêt a été repris dans 100 µL de PBS filtré. Les analyses qNano de quantification et d'imagerie en cryo-microscopie ont été faites immédiatement tandis que le reste des VE a été congelé à -80°C.

En parallèle de l'isolement, des culots cellulaires ont été réalisés à partir des cultures de cellules hMuStem pour lesquelles le surnageant a été récupéré. Ils ont ensuite été utilisés comme contrôle lors de la caractérisation du contenu protéique. Dans un 1^{er} temps, les cellules ont été rincées avec du PBS à 37°C avant d'être incubées 5 min avec une solution de TrypLE™ Select CTS™ (Gibco, Life technologies) dilué au tiers. Après une centrifugation à 400 g, les culots cellulaires ont été repris dans du PBS chaud et les suspensions cellulaires dénombrées. Des culots secs (fraction nommée CC) de 500 000 cellules et 1 million ont été réalisés et congelés à -80C.

Trois fractions (Figure 36) ont ainsi été générées : les culots secs (fraction CC) issus des culture de cellules hMuStem, les surnageants exempts de VE (SEV-) et les VE (fraction VE).

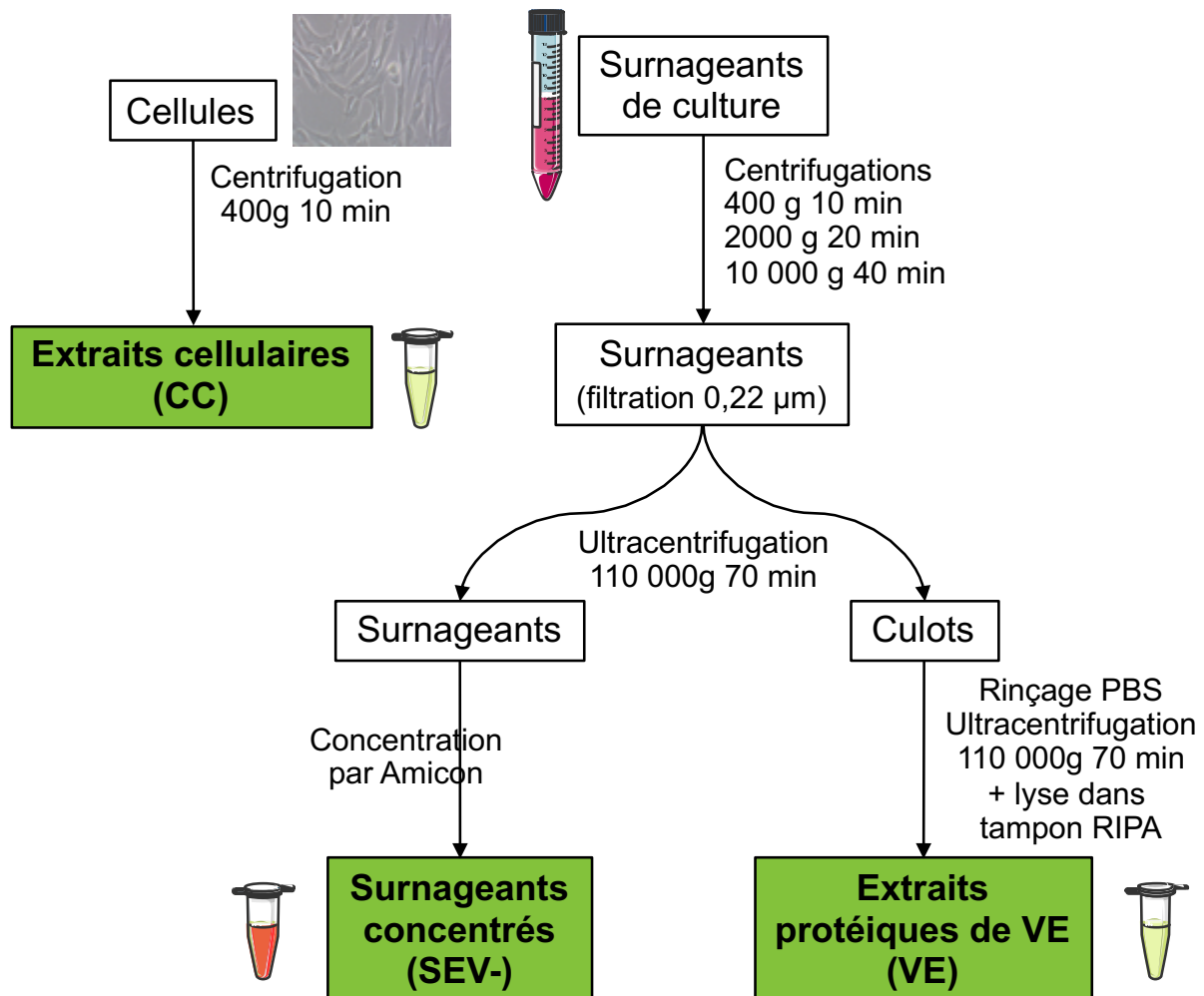


Figure 36 : Protocole d'isolement des VE issues des cellules hMuStem basé sur des centrifugations différentielles.

ii. Caractérisation par qNano

Afin de déterminer la concentration (nombre de particules par unité de volume) des particules (VE) récupérées après ultracentrifugation et obtenir une distribution précise de la taille, les VE ont été caractérisées par dosage au qNano (Izon Science). Cette technique utilise un procédé d'analyse basé sur la technologie TRPS (Tunable Resistive Pulse Sensing) (Figure 37). Par pression, les VE sont entraînées à travers un nano-pore et chaque particule en le traversant provoque une impulsion résistive (ou signal de blocage), qui est détectée et mesurée par le logiciel. Trois paramètres principaux sont mesurés :

- La fréquence de blocage qui permet de déterminer la concentration en particules
- L'amplitude de blocage qui est directement proportionnelle au volume de chaque particule
- La durée de blocage qui varie en fonction de la vitesse de la particule et qui va être utilisée pour déterminer la charge de surface

Chaque particule mesurée est comparée à un ensemble de particules d'étalonnage traçables (NIST) de tailles connues garantissant une précision et une répétabilité. Cette étape d'étalonnage permet de générer la distribution granulométrique réelle d'un ensemble de particules avec une précision très élevée.

La taille du nano-pore est choisie en fonction de la taille des VE de l'échantillon à analyser. Dans notre cas, trois nano-pores différents ont été utilisés : Np100, permettant d'analyser les VE dont la taille est comprise respectivement entre 50 et 330 nm, Np150, entre 70 et 420 nm et Np200, entre 85 et 500 nm.

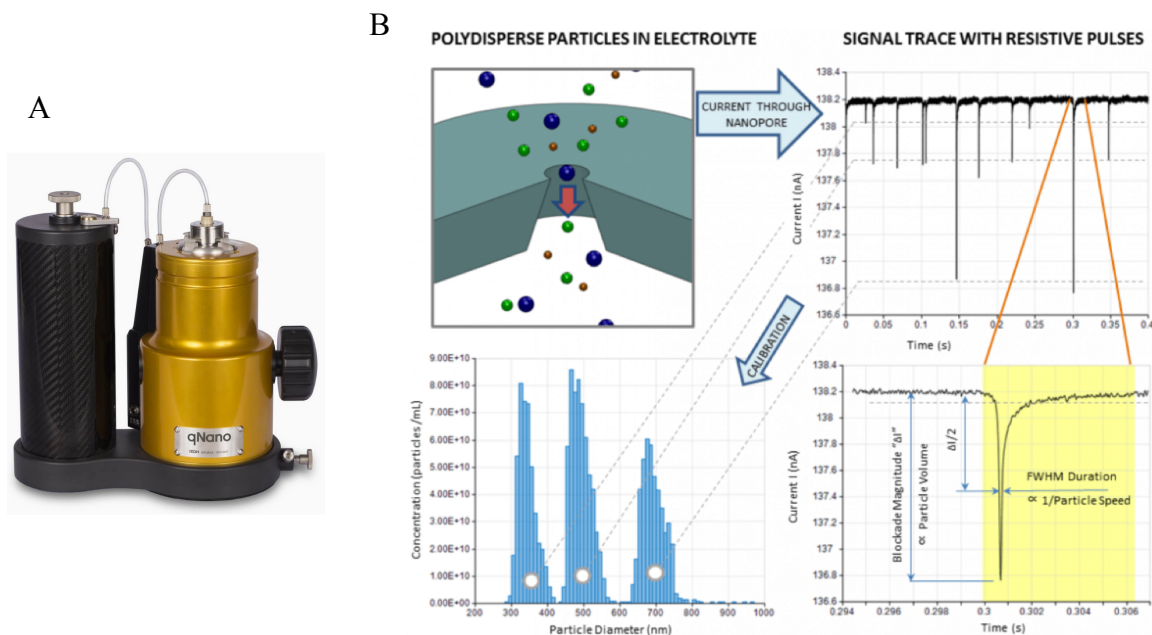


Figure 37 : A) Appareillage qNano qui va être relié à un ordinateur qui suite à une analyse des données va fournir les schémas suivants. B) Schémas explicatifs de l'analyse qNano. Les particules entrainées à travers le nanopore (illustration en haut à gauche) vont provoquer une impulsion résistive détectée par le logiciel (illustration en haut à droite) qui va alors analyser 3 paramètres principaux (illustration en bas à droite). Ces données vont être comparées à un ensemble de particules d'étalonnage de tailles connues (illustration en bas à gauche).

Dix μL de la préparation ont été dilués au quart dans du PBS Tween 20 (0,03%) afin de limiter les agrégats et une filtration à $0,45 \mu\text{m}$ a été réalisée à l'aide de microtubes contenant un filtre (Clearspin Filtered Microtubes, ClearLine, Dutscher). Toutes les solutions utilisées durant la manipulation sont filtrées à $0,1 \mu\text{m}$ (Millipore). Le passage des échantillons a été précédé d'une calibration à l'aide d'un « calibreur 200 nm » de nanoparticules à différentes pressions. Les échantillons ($30 \mu\text{L}$ final) ont été ensuite déposés et analysés à deux pressions différentes afin d'optimiser la précision des mesures. L'acquisition ne doit pas dépasser 10 minutes et un minimum de 500 particules est compté pour une validation de l'expérience. Deux autres paramètres doivent également être pris en compte pour produire une mesure précise : le bruit de fond ($< 10 \text{ pA}$) et l'augmentation proportionnelle du flux et de la pression.

iii. Caractérisation par cryo-microscopie électronique à transmission

Afin de compléter la caractérisation des VE en terme de forme, aspect et taille, la technique de cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-MET) a été utilisée. $4 \mu\text{L}$ d'échantillons additionnés de particules d'or (10 nm de diamètre) ont été déposés sur une grille en cuivre (C-flat™) recouverte d'une fine couche de carbone. Le tout a été plongé dans de l'éthane liquide à -180°C pour former de la glace vitreuse ($0,8$ à $1,2 \text{ s}$). La grille a ensuite été montée sur un porte objet (modèle 626, Gatan) permettant de maintenir la température et les échantillons ont été observés grâce à un microscope électronique 200 kV (Tecnai G2 T20 Sphera, FEI) équipé d'une caméra CDD (US4000, Gatan) (Figure 38). Cette technique permet la reconstruction d'images 3D non déformées grâce au logiciel TomoJ. Cette reconstruction permet ensuite d'obtenir la taille des particules et de visualiser les éléments structurels internes et externes à haute résolution.

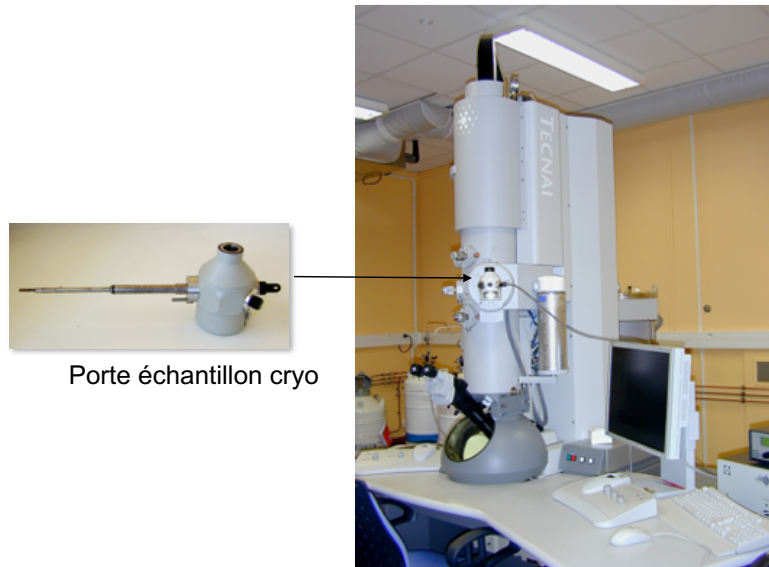


Figure 38 : Microscope électronique 200 kV et porte-échantillon. Expérience réalisée sur la plateforme Biosite à Rennes en collaboration avec Denis Chretien.

iv. Caractérisation par Western Blot

Extraction protéique et dosage

10 μ L de la suspension d'EV et de surnageant SEV- (10 μ L) ont été dilués au demi dans un tampon de lyse RIPA (NP40 1%, Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, glycérol 10%, EDTA 2 mM, un cocktail d'inhibiteur de protéases 0,5%, Benzonase 0,1%). De la même manière, 200 μ L de tampon de lyse RIPA ont été ajoutés à un culot sec d'un million de cellules hMuStem. La lyse protéique a été faite dans la glace pendant 30 minutes avec une homogénéisation toutes les 10 minutes. Les protéines totales extraites des cellules et des VE ont été dosées par de l'acide bicinchronique selon la technique de dosage de Lowry (Lowry et al., 1951). L'absorbance a ensuite été mesurée à 562 nm grâce au lecteur de plaques LT-4000 Microplate Reader (Labtech, East Sussex United Kingdom).

Western Blot

Les échantillons à déposer ont été préparés de manière à contenir 9 μ g de protéines. Les concentrations ont été équilibrées avec de l'eau distillée et du tampon de charge (NuPage LDS Sample Buffer 4X), en présence ou non d'agent réducteur (NuPage Reducing Agent 10X). Après 10 minutes à 70°C, les échantillons ont été déposés sur gel SDS-PAGE à gradient de polyacrylamide (Bis- Tris 4-12%, NuPage). La migration se fait en deux temps (30 minutes à 50

V puis 140 V jusqu'à la fin de migration) dans du tampon de migration (MOPS-SDS Running Buffer 20X, NuPage) et est suivie d'un transfert sur membrane de nitrocellulose (Protran BA83, Whatman) pendant 2 heures à 300 mA à 4°C dans du tampon de transfert (500 mL de tampon de migration, 300 mL d'eau distillée et 200 mL d'éthanol 96°). Après récupération des membranes, une coloration au rouge Ponceau est effectuée afin de visualiser les protéines totales. Les membranes ont ensuite été lavées avec du PBS puis placées 1 heure dans du tampon de saturation (Blocking Buffer Odyssey, Li-COR Biosciences) dilué au 1/2 dans du PBS. Les membranes ont ensuite été incubées avec un anticorps primaire (Tableau X) dilué dans du tampon de saturation (Blocking Buffer Odyssey, Li-COR Biosciences) au 1/2 dans du PBS-Tween 0,1% pendant la nuit à 4°C ou 4 heures à température ambiante sous agitation. Après 20 minutes de lavage dans du PBS-Tween 0,1%, les membranes ont été incubées 1 heure en présence de l'anticorps secondaire (Tableau X) à température ambiante, sous agitation et à l'obscurité. Après lavages dans du PBS-Tween 0,1%, la révélation est réalisée soit par ECL soit par fluorescence. Pour la révélation ECL, les membranes ont été incubées 10 minutes à l'obscurité avec un réactif composé de peroxyde et de luminol enhanced (ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific), alors qu'en fluorescence les membranes ont été révélées directement à 700 nm. Quel que soit le type de révélation utilisé, les membranes ont été lues par scanner (Imager Odyssey, Li-COR Biosciences).

Tableau X : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour la caractérisation des VE.

	Poids moléculaire (kDa)	Espèce	Dilution utilisée	Type de révélation	Référence
Ac primaire (condition réductrice)					
Calnexine	90	Souris	1/1000	Fluo	610523 BD Biosciences
CD81	28	Souris	1/200	ECL	Sc-7637
CD63	26	Souris	1/500	ECL	Biolegend
β-actine	42	lapin	1/1000	Fluo	Ab8227
Ac primaire (condition non réductrice)					
CD9	28	Souris	1/200	ECL	55370 BD Biosciences
Fibronectine	262	Lapin	1/1000	Fluo	Ab32419 Abcam
Ac secondaire					
Alexafluor 680		Lapin	1/10000	Fluo	A21109 Molecular Probes
Alexafluor 680		Souris	1/10000	Fluo	A21058 Molecular Probes
PER P-447		Souris	1/2000	ECL	Dako

v. *Imagerie des vésicules extracellulaires*

Dans l'optique de définir la fonctionnalité des VE dans des études *in vitro* ou *in vivo*, il est nécessaire de pouvoir marquer les vésicules afin de les visualiser. Nous avons donc souhaiter mettre au point un marquage des VE afin de pouvoir par la suite évaluer leur morphologie, les interactions VE-cellules ou ainsi que leur biodistribution dans un tissu. Ce travail a été réalisé en collaboration avec une étudiante de Master 2 Pauline Thomas.

Marquage des vésicules extracellulaires purifiées :

Les VE fraîchement isolées ont été marquées avec du Membright® couplé à de la Cyanine 3 ou de la Cyanine 5 (Figure 39). La solution mère de Membright® (100 µM) a été diluée au 5^{ème} dans du PBS filtré à 0,1 µm pour une concentration finale de 200 nM qui est ajoutée au culot resuspendu. Ce mélange a ensuite été incubé 30 minutes à température ambiante, à l'obscurité et sous rotation (350 RPM). Après incubation, la suspension a été ultracentrifugée à 110 000 g à 4°C 60 minutes. Des contrôles (Membright® dans PBS filtré) ont été réalisés en parallèle afin de vérifier que le colorant ne précipite pas. Les culots ont finalement été resuspendus dans 200 µL de PBS filtré.

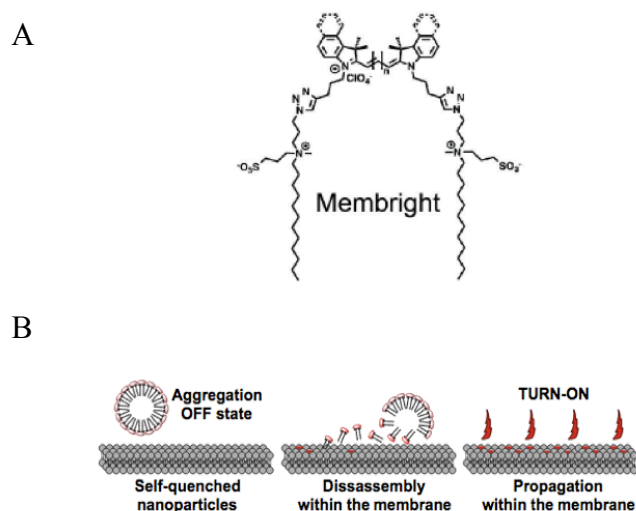


Figure 39 : Principe de fonctionnement du marquage au Membright (Collot et al. 2019).
A) Structure chimique du colorant Membright. B) Intégration à la membrane plasmique.

Microscopie confocale

Les VE marquées au Membright-Cyanine 3 (MB-Cy3) et Membright-Cyanine 5 (MB-Cy5) ont été visualisées *via* un microscope confocal LSM 780 Zeiss. L'observation a été réalisée sur des Labtek® 8 puits préalablement coatées avec de la Poly-L-Lysine 0,01% (Sigma-Aldrich). Après

un dépôt de 10 µL de la suspension dans chaque puit, les VE marquées au MB-Cy3 et au MB-Cy5 ont été respectivement observées à une excitation laser à de 561 et 633 nm. Cette technique, par sa limite de résolution, va nous permettre de visualiser les particules allant de 200 à 500 nm.

Microscopie super-résolution

Les VE marquées au MB-Cy5 ont été visualisées *via* un microscope N-STORM (Nikon). L'observation a été réalisée sur des lamelles de 18 mm d'épaisseur, préalablement nettoyées à l'éthanol et trempées dans un bain d'HCl 1M pendant 17 heures afin d'éliminer d'éventuelles particules/poussières fluorescentes. Les lamelles ont ensuite été coatées avec de la Poly-L-Lysine 0,01% (Sigma-Aldrich) pendant 5 minutes. Le tampon de montage (Abbelight®) a été réalisé juste avant l'imagerie selon les recommandations (Abbelight, France). Cent µL de tampon ont été déposés dans l'incurvation d'une lame en verre. Parallèlement, 10 µL de suspension de VE ont été déposés au centre des lamelles préalablement coatées et laissées au repos pendant 15 minutes. Le surplus a ensuite été aspiré et la lamelle a été déposée délicatement sur la lame de manière à ce que les VE adhèrent au contact de la goutte de tampon. Le montage a été scellé avec du Picodent Twinsil®22 (Picodent, Wipperfürth, Allemagne). La durée de vie du tampon étant d'environ 4 heures, l'échantillon a été observé dans la continuité. Cette technique, par sa limite de résolution, va nous permettre de visualiser les particules allant de 30 à 200 nm.

vi. Étude d'internalisation des vésicules marquées

Afin d'évaluer le potentiel d'internalisation des VE, une étude a été réalisée sur deux types cellulaires : les cellules hMuStem et des myoblastes humains qui ont étéensemencés dans une Labtek 8 puits préalablement coatée avec du CellStart™ à des densités respectives de 2 500 et 10 000 cellules/cm². Les cellules hMuStem ont été cultivées dans les mêmes conditions que précédemment décrites et les myoblastes humains dans un milieu HAM-F12 (F-12 Nut Mix + GlutaMAX™-I, Gibco, Life technologies) + 10% de sérum Humain (EFS) + 1% de PSF (Peni-Strepto-Amphotericin, Eurobio) + 0,125% de bFGF (Human FGF-2, premium grade, Miltenyi Biotec).

Après trois jours de culture, une solution de LysoTracker Green DND-26 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) a été préparée et ajoutée à une concentration finale de 50 nM pendant 30

minutes à 37°C et 5% de CO₂. Après incorporation du LysoTracker par les cellules, 10 µL de suspension de VE marquées au MB-Cy3 ont été ajoutés dans chaque puits et une acquisition a été lancée toutes les 4 minutes en mode Z-stack pendant 3 heures pour les cellules hMuStem et 9 heures pour les myoblastes humains. L'acquisition a été composée de deux Tracks avec un laser à 488 nm pour le LysoTracker et 561 nm pour les VE.

Suite à ce « Live Imaging », les cellules sont fixées avec du PFA 4% à 37°C pendant 30 minutes puis perméabilisées avec du Triton 0,2% (T9264, Sigma) pendant 20 minutes à 4°C. Un marquage de l'actine est réalisé avec de la Phalloïdine couplée à l'Alexa-488 (A12379, Life Technologies, Fischer Scientifique) diluée au 1/100^{ème} dans du PBS pendant 15 minutes, à 37°C et à l'obscurité. Pour finir, un contremarquage au DAPI (Invitrogen, Molecular Probes ; dilué au 1/1000^{ème} dans de l'eau déminéralisée) a été réalisé pendant 15 minutes, à température ambiante et à l'obscurité. Les cellules ont ensuite été recouvertes de PBS et visualisées au microscope confocal afin d'apprécier l'internalisation des VE.

3. Résultats expérimentaux obtenus

Dans l'optique de pouvoir appréhender les modalités d'action de la population hMuStem sur le cœur infarci en considérant les effets directs des cellules et ceux indirects apportés par les facteurs sécrétoires, un protocole de production et d'isolement de VE a été mis en place à partir des travaux effectués par l'équipe de Théry qui propose un protocole de centrifugations différentielles successives (Figure 36) (Kowal et al., 2016).

a) Production des VE^{hMuStem} en condition normoxique

Dans un 1^{er} temps, 4 productions de VE^{hMuStem} ont été réalisées en condition normoxique sur 4 lots différents de cellules hMuStem. Cela s'est traduit par l'obtention d'une production reproductible de 2 à 4.10¹⁰ VE/ml dans un volume final de 100 µl (Figure 40).

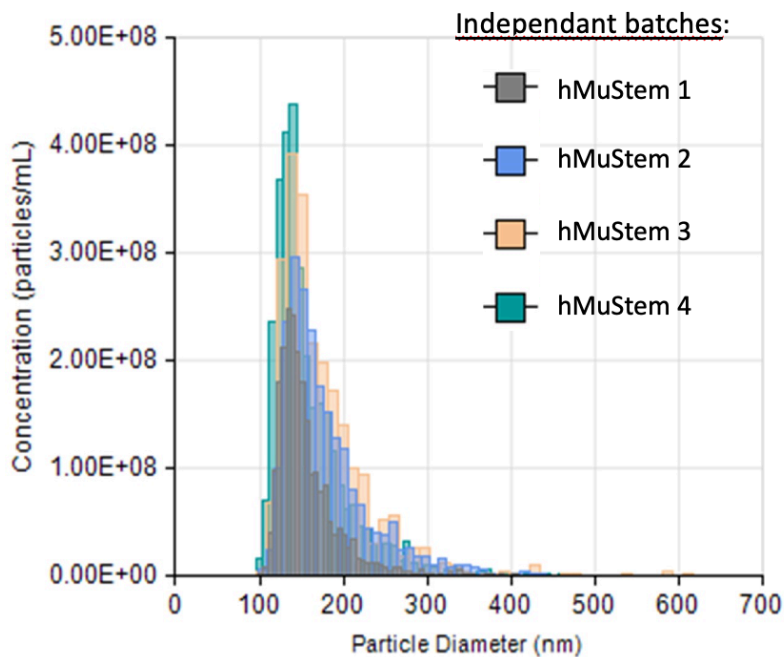


Figure 40 : Distribution de la population de VE obtenue en condition normoxique. Expérience réalisée au qNano avec un nanopore 200 sur quatre lots indépendants de $VE^{hMuStem}$.

Les 4 productions de VE sont comparables et se définissent par une taille moyenne de 140 nm et ont été obtenues grâce à un nanopore 200. Ces données ont été obtenues au qNano dans le cadre d'une collaboration avec l'USC IECM (L. de Beaupaire et S. Bösch, Nantes).

Parallèlement, une analyse en cryo-tomo-électromicroscopie (cryo-TEM), réalisée en collaboration avec la plate-forme Biosit (D. Chrétien, Rennes), a permis de visualiser en 3D les VE et de déterminer une taille moyenne de 80 nm (Figure 41). Les échantillons se composent très majoritairement de vésicules uniques (95% des vésicules observées).

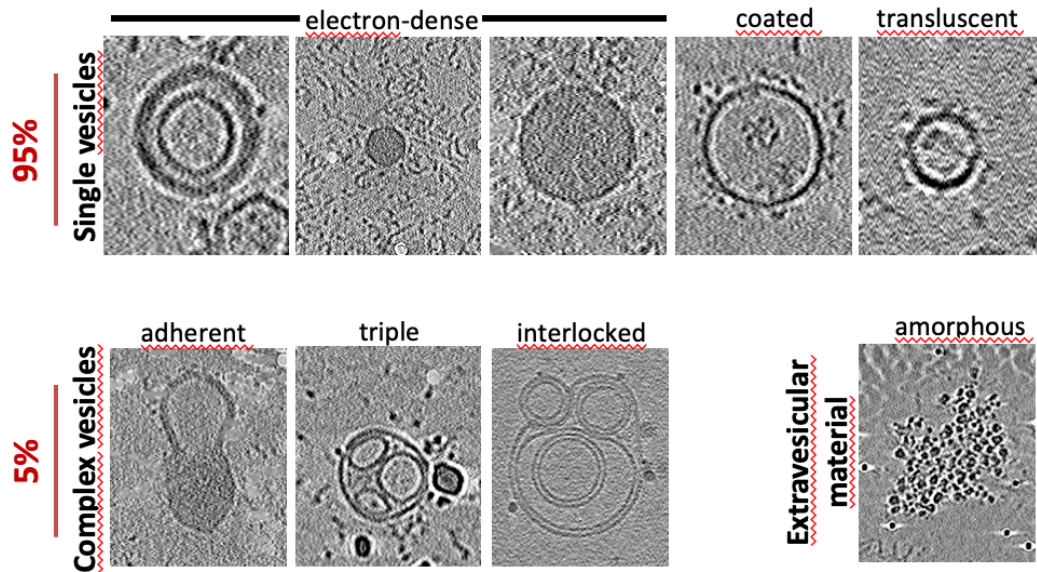


Figure 41 : Illustrations des différents types de vésicules observées en cryo-TEM.

Cette différence de taille obtenue entre les deux techniques s’explique par l’utilisation du nanopore 200 au qNano qui va prendre en compte les VE comprises dans un intervalle de taille entre 85 et 500 nm.

Cette technique de microscopie a également permis de mettre en évidence la présence de structures multivésiculaires correspondant à 5% des VE totales et de matériel extracellulaire (Figure 41). La résolution de cette approche, nous permet de visualiser les différentes membranes internes et externes et le contenu vésiculaire dans certaines conditions.

Parallèlement, une caractérisation phénotypique des VE^{hMuStem} a été initiée nous permettant de mettre en évidence par western blot la présence de marqueurs typiques des VE (et notamment des exosomes) comme la fibronectine, CD9, CD63 et CD81 ainsi que l’absence de marqueur caractéristique d’une contamination cellulaire, en l’occurrence ici la calnexine et la β -actine (Figure 42).

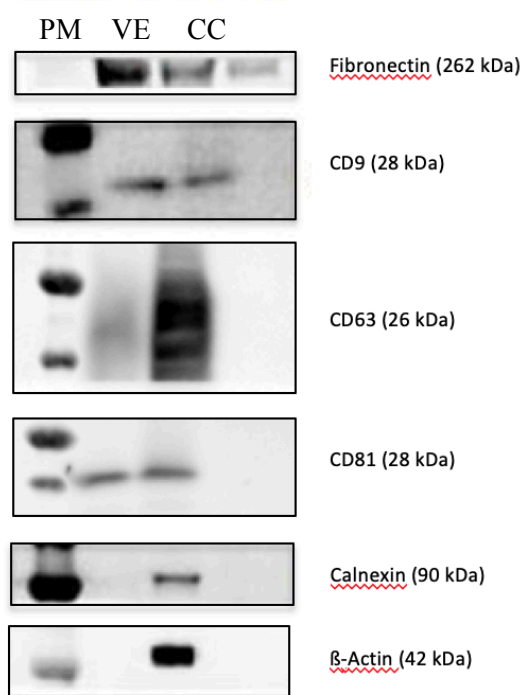


Figure 42 : Caractérisation phénotypique des VE par WB.

VE : Vésicules extracellulaires. CC : Culot cellulaire réalisé à partir des cellules hMuStem qui ont permis la production de VE. SEV- : Milieu récupéré suite à la première ultracentrifugation et déplété en VE.

b) Production des VE^{hMuStem} en condition hypoxique

Récemment, des études ont souligné que l'établissement de conditions de culture cellulaire spécifiques telles que l'hypoxie permettait de stimuler la sécrétion vésiculaire, conduisant à une augmentation du rendement en VE et à une potentialisation de leurs effets *in vivo* sur le remodelage tissulaire (Balbi et al. 2017; Sicco et al. 2017). Des travaux menés sur des cultures de cardiomyocytes en conditions hypoxiques ont montré un relargage de plus petites vésicules (exosomes) avec une expression plus abondante de TNF- α (Yu et al. 2012). Il a également été démontré une augmentation de l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* suite à l'injection de VE obtenues à partir de CSM conditionnées en hypoxie (Zhang et al. 2012).

Dans ce cadre, des isollements de VE ont été réalisés à partir de cultures de cellules hMuStem placées 48h en hypoxie (VE^{hMuStem} Hypo) ou en normoxie (VE^{hMuStem} Normo).

Les analyses au qNano ont mis en évidence une concentration de $3,15 \cdot 10^{11}$ VE/ml suite à la stimulation, soit environ dix fois plus qu'en condition normoxique ($3,9 \cdot 10^{10}$ VE/ml), révélant un impact positif du conditionnement hypoxique sur la quantité de VE produites (Figure 43).

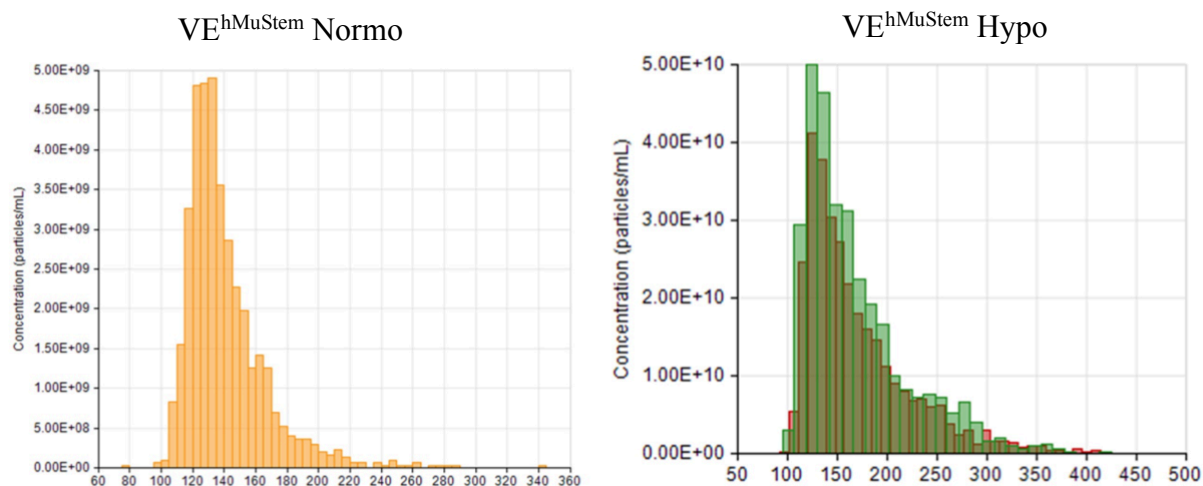


Figure 43 : Distribution et concentration en particules des VE obtenues au qNano après conditionnement normoxique et hypoxique des cellules.

Afin de compléter l'impact du conditionnement hypoxique sur les VE sécrétées, une analyse en cryo-microscopie a été réalisée sur un ensemble de 238 VE. Celle-ci a mis en évidence la présence de particules de plus petite taille avec un diamètre moyen de 51,4 nm (mode de 38 nm) contre 80 nm en condition normoxique. Ces données suggèrent un enrichissement en petites VE consécutivement au conditionnement hypoxique. Cependant, de larges vésicules (> 100 nm) ont, de façon exceptionnelle, également été observées (Figure 44).

Finalement, une analyse phénotypique par western blot a été réalisée et n'a pas montré de modification d'expression des principaux marqueurs spécifiques des VE.

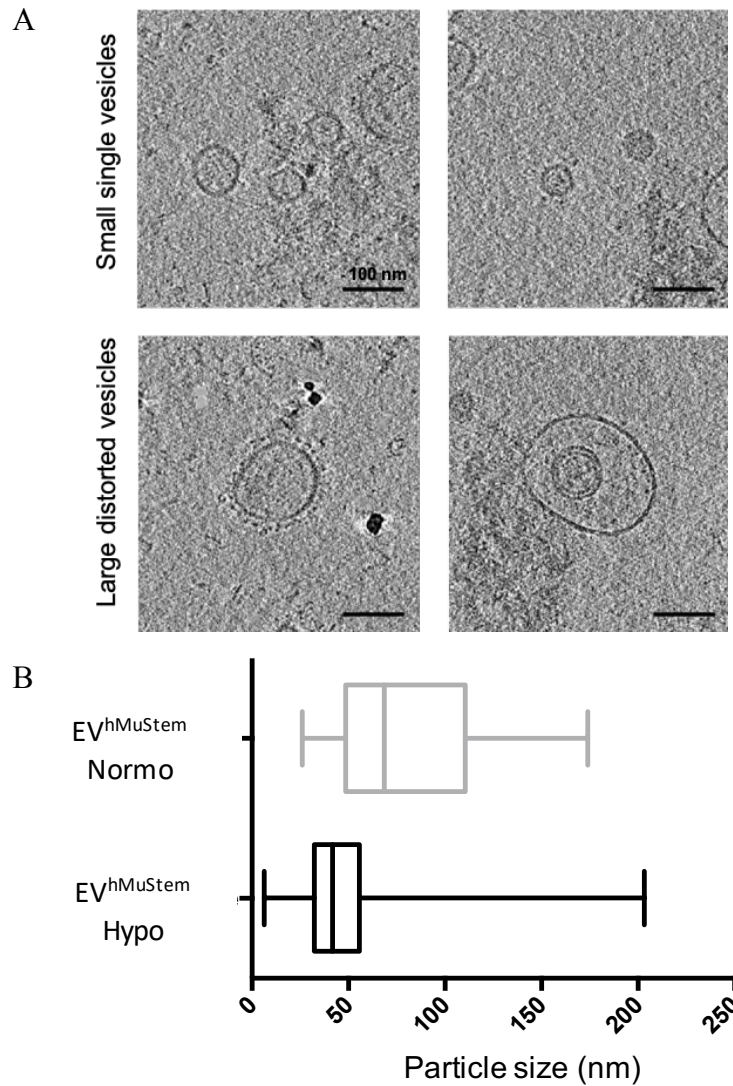


Figure 44 : A) Illustrations représentatives des VE^{hMuStem} Hypo en cryo-TEM. Barre d'échelle : 100 nm. B) Analyse comparative de la taille des vésicules obtenues selon le conditionnement.

c) Observation des VE^{hMuStem} en microscopie confocale et super-résolution

Dans l'optique de définir la fonctionnalité des VE dans des études *in vitro* ou *in vivo*, il est nécessaire de pouvoir les marquer afin de les visualiser. Dans ce but, nous avons cherché à mettre au point un marquage des VE par des techniques de microscopie à haute résolution afin de pouvoir par la suite évaluer leur morphologie, les interactions qu'elles génèrent avec les cellules ou même leur biodistribution dans un tissu.

Un nouveau colorant, le MemBright®, a été développé et mis sur le marché en 2019 (Collot et al. 2019). Il regroupe une famille de six sondes à membrane plasmique, activées par

fluorescence à base de Cyanine (3 à 7,5). Il permet une coloration homogène et sélective des bicouches lipidiques et est compatible avec l'imagerie de cellules vivantes. Son utilisation nous a permis d'obtenir des images des VE^{hMuStem} en microscopie confocale spectrale (Figure 45).

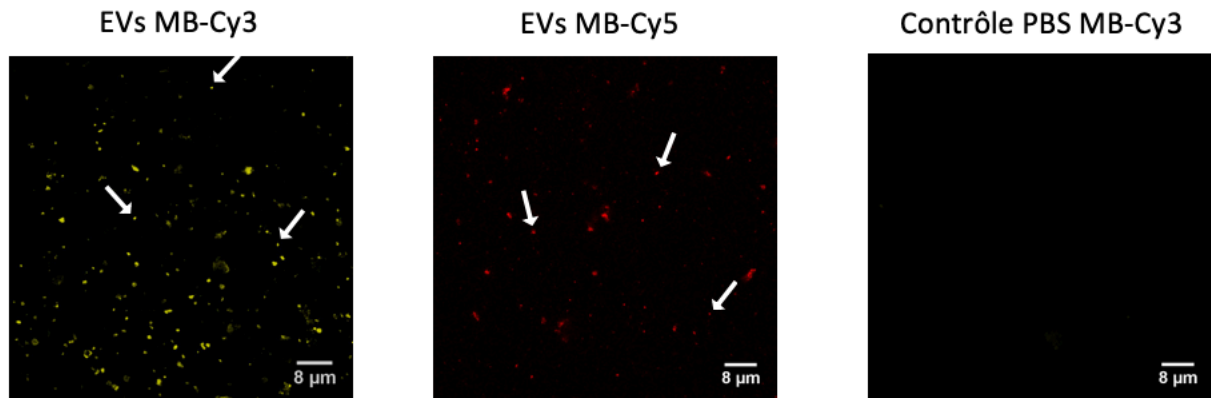


Figure 45 : Visualisation en microscopie confocale spectrale de VE marquées MemBright couplé à la Cyanine 3 ou 5. Les flèches vont indiquer des éléments de petites tailles. Barre d'échelle : 8 µm.

Le marquage au MB-Cy3 a permis d'observer des structures de grande taille (en moyenne 2 µm de diamètre) mais également des agrégats de tailles intermédiaires. Les VE ont également été marquées avec ce même colorant couplé à un fluorochrome différent à savoir le MB-Cy5. On observe sur ces acquisitions, des structures ayant une taille moyenne de 550 nm. Un contrôle PBS + MB-Cy5 nous a permis de confirmer le fait que le MemBright® ne précipite pas et que le signal observé est bien spécifique des VE.

Afin de pouvoir imager les VE de petites tailles (< 300 nm), nous avons mis au point un marquage associé à la technologie dSTORM. Cette technologie permet d'affiner la sensibilité et d'obtenir des images plus résolues des VE marquées avec du MB-Cy560. Suite à une reconstruction, on met en évidence la présence de VE en grand nombre possédant une taille comprise entre 20 et 200 nm. Quelques grosses vésicules sont également visibles (env. 500 nm). Du PBS filtré à 0,1µm nous sert alors de contrôle (Figure 46).

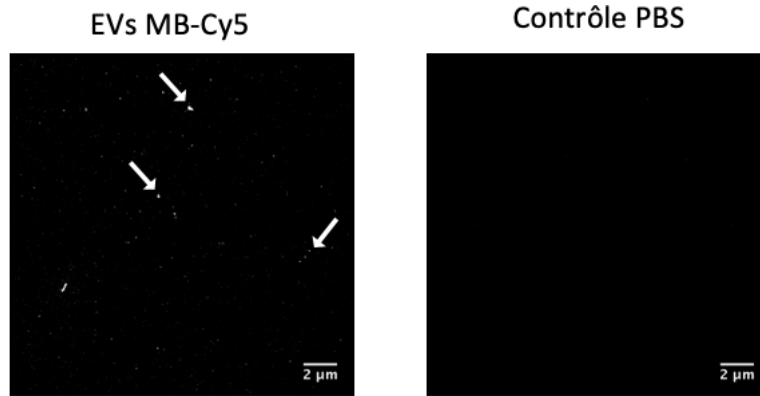


Figure 46 : VE imagées en super résolution au microscope dSTORM. Barre d'échelle : 2 μm .

La combinaison de l'utilisation du Membright adapté aux VE et de la microscopie à haute résolution que représente le dSTORM constitue une approche exploratoire intéressante pour investiguer in vitro les interactions et influences réciproques des VE sur les cellules environnantes.

d) Etude d'internalisation des VE^{hMuStem} par les myoblastes et les cellules hMuStem

Dans ce contexte, une étude préliminaire d'internalisation des VE a été lancée avec un suivi par microscopie confocale spectrale. Cette étude, réalisée en live imaging, et menée sur deux types cellulaires cibles que sont les cellules hMuStem et les myoblastes humains a permis de visualiser de façon dynamique l'entrée des VE en train de pénétrer dans les cellules hMuStem (Figure 47A). De la même manière, l'internalisation des VE dans les myoblastes a été observée.

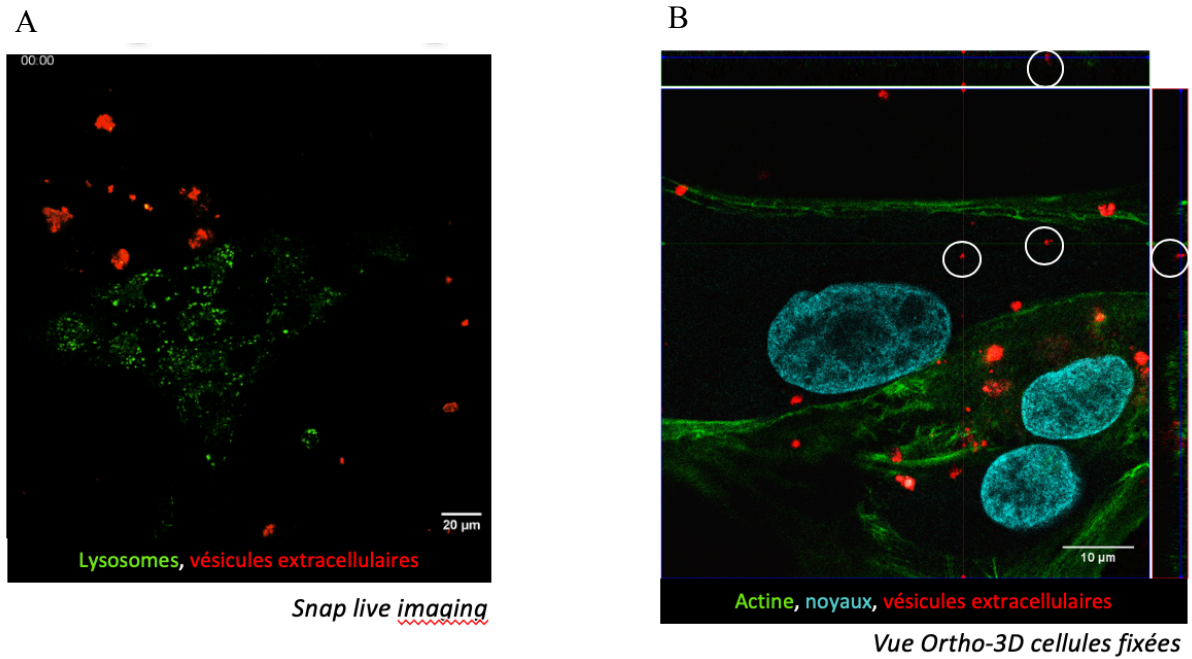


Figure 47 : A) Instantané du live imaging de l'internalisation des VE par des cellules hMuStem. B) Visualisation de VE internalisées dans des cellules fixées. Barre d'échelle : 20 μm (A) et 10 μm (B).

Afin de compléter cette étude, les cellules hMuStem et les myoblastes ont été fixées après respectivement 7 et 16 heures d'incubation et marquées dans le but de confirmer la présence de VE internalisées. Plusieurs VE marquées sont bien visibles à l'intérieur de la cellule hMuStem (ici entourées par un cercle blanc) (Figure 47B). Comme précédemment, des résultats similaires ont été observés sur des myoblastes.

Ces résultats tendent à indiquer l'existence d'une capacité d'internalisation des VE selon un mode paracrine (par des cellules hôtes) et autocrine (par les cellules productrices).

DISCUSSION

Afin d'envisager la possibilité de positionner la population de cellules MuStem dérivées du muscle squelettique humain comme candidat thérapeutique dans le domaine des maladies cardiovasculaires, j'ai eu pour objectif durant ma thèse de tester la faisabilité et l'impact de leur transplantation intramyocardique dans un modèle préclinique d'IDM. Lors d'études précliniques antérieures, la capacité des cellules MuStem à survivre dans des tissus très endommagés tels que le muscle squelettique dystrophique ou cryolésé avait été établie (Lorant et al. 2018; Rouger et al. 2011). Il avait été également mis en évidence des bénéfices cliniques et tissulaires significatifs et persistants dans le modèle canin dystrophique cliniquement pertinent.

Dans la 1^{ère} étude réalisée au cours de ma thèse, j'ai fourni des données inédites sur le potentiel de réparation de cette population de CSA dans un contexte d'IDM. Les résultats suggèrent que ces cellules pourraient potentiellement être utilisées en médecine régénératrice pour les pathologies cardiaques. En effet, j'ai démontré avec succès que leur administration dans la zone bordante de l'infarctus est associée à leur persistance dans le cœur infarci, une atténuation du remodelage tissulaire défavorable du VG et à une amélioration de la fonction cardiaque dans les semaines suivantes. Les zones infarctées et surtout la fibrose globale ont été réduites chez les rats ayant reçu l'injection de cellules hMuStem comparativement au groupe témoin. L'angiogenèse et la néo-myogenèse se sont avérées être les principaux facteurs de préservation de l'architecture du myocarde ventriculaire gauche.

1. Capacité des cellules hMuStem à s'implanter dans le tissu myocardique

Jusqu'à maintenant, les différentes études réalisées avec des cellules souches ont mis en évidence de très faible taux de greffes cellulaires à long terme dans le tissu cardiaque, quel que soit la cellule candidate, sa quantité et son mode d'administration. En effet, plus de 90% des cellules injectées disparaissent dans les 1^{ers} jours suivant l'injection et une quantité inférieure à 2% des cellules peuvent encore être retrouvées 4 semaines après la transplantation (Hong et al. 2013; Zeng et al. 2007). Plus précisément, en phase aiguë d'IDM, seulement 10% des CSC (Hong et al. 2013) et moins de 10% des CSM (Tang et al. 2005) ont été retrouvées dans le myocarde 24 heures après injection intramyocardique chez la souris et

seulement 2 à 5% de BMMNC quelques heures après infusion intracoronaire chez l'Homme (Hofmann et al. 2005). Dans le même ordre d'idées, seulement environ 1% des CSM allogéniques transplantées ont survécu au jour 2 après injection intramyocardique dans un modèle d'IDM chez le rat pour ensuite disparaître au jour 7 (Westrich et al. 2010). Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres candidats d'origine musculaire tels que les myoblastes (Menasché 2004; Wang et al. 2017). Cette mortalité cellulaire a été attribuée à une mauvaise vascularisation de la zone injectée, à l'inflammation accompagnée de stress oxydatif, du relargage de cytokines cytotoxiques et à l'apoptose due à un défaut d'interaction cellule/MEC dans les semaines suivant l'injection (Kanda and Davis 2017).

Dans la présente étude, alors que moins de trois millions de cellules hMuStem ont été injectées au niveau de la zone bordante, plusieurs dizaines de milliers de cellules ont été retrouvées chez chaque rat transplanté trois semaines après transplantation, révélant un taux de rétention d'au moins 5%. Bien que ce taux reste modeste, les cellules hMuStem se distinguent nettement des autres candidats tels que les CSM caractérisées par une viabilité proche de zéro dans les conditions ischémiques, les cellules mourant peu après l'implantation ou une semaine après l'injection (Toma et al. 2002). Ceci suggère une moindre sensibilité des cellules hMuStem à l'hypoxie et au stress oxydatif.

Cependant, les résultats doivent être interprétés avec prudence. En effet, il existe de grandes hétérogénéités entre les études en termes de quantités de cellules injectées, de voie d'administration ou de moment d'injection, ce qui rend difficile la comparaison directe entre les différents candidats en terme d'implantation et de bénéfices cliniques. En effet, comme mis en évidence par (Sanganalmath and Bolli 2013), des études antérieures ont été réalisées sur différentes espèces et différents modèles d'IDM ou d'IC, induits par ligature, cryo-lésions ou pharmacologiquement, chaque modèle recréant des phases différentes de l'atteinte cardiaque humaine, avec des moments d'injection des cellules candidates allant de 1 heure à 5 semaines suivant l'induction de l'infarctus. Le contexte tissulaire est alors totalement différent, ce qui a une forte incidence sur l'implantation cellulaire.

Par ailleurs, le nombre de cellules injectées pourrait avoir un impact sur le taux d'implantation et le bénéfice clinique, or, ce nombre varie selon les études. Si l'on ne s'intéresse qu'aux travaux réalisées chez le rat avec des injections intramyocardiques, de 40 000 à plus de 5

millions de cellules ont été transplantées (Sanganalmath and Bolli 2013). En comparaison, dans notre étude, moins de trois millions de cellules ont été injectées et un bénéfice est déjà observé. Toutefois, il est important de garder à l'esprit que dans les rares études précliniques et cliniques réalisées comparant différentes doses cellulaires (Menasché et al. 2008), la plus forte dose injectée ne conduisait pas toujours à l'effet bénéfique le plus important (Hashimoto, Olson, and Bassel-Duby 2018).

Contrairement aux CDC (Rota et al. 2008), les cellules hMuStem possèdent un large pouvoir prolifératif tout en conservant une forte homogénéité phénotypique (Saury et al. 2018). Leur amplification *ex vivo* ne va donc pas être une étape limitante à leur utilisation en clinique. En effet, souvent considérée comme une étape substantielle, l'amplification *ex vivo* est nécessaire pour la majorité des applications cliniques au regard des quantités extraites par rapport aux doses thérapeutiques nécessaires.

Un autre paramètre important à prendre en compte lorsque l'on parle de rétention et de survie cellulaire est le mode d'injection utilisé. En effet, il a été mis en évidence que les injections intramyocardiques qui présentent l'avantage d'offrir une visualisation directe des zones nécrosées peuvent perturber l'architecture des tissus et créer des amas cellulaires conduisant à un manque d'oxygénation des cellules transplantées et à leur mort cellulaire. De plus, les injections multiples vont conduire à une distribution non homogène des cellules implantées dans le tissu (Dib et al. 2005; Menasché et al. 2008). Malgré ces limites inhérentes au mode d'injection, nous avons pu mettre en évidence la présence de cellules implantées sur les 2/3 inférieurs du cœur, suggérant une capacité de migration des cellules hMuStem. Cette aptitude à la migration contraste fortement avec les observations faites suite à l'injection intramyocardique de myoblastes ou de CSM : ces cellules étaient, en effet, retrouvées dans le tracé de l'aiguille (Katarzyna 2017).

Cependant, bien que cette technique présente de nombreuses limites, aucune voie d'administration idéale n'existe à l'heure actuelle. Plus généralement, comme discuté précédemment, de nombreuses améliorations en termes de choix des cellules greffées, de leur nombre et de leur méthode d'implantation doivent être apportées afin que la thérapie cellulaire puisse être appliquée de façon optimale en clinique dans le champ des pathologies cardiaques.

2. Mécanismes cellulaires impliqués dans la réparation cardiaque

A ce jour, de nombreuses études ont pour objectif d'élucider les mécanismes d'action impliqués dans les bénéfices consécutifs à la thérapie cellulaire. Cependant, les mécanismes de réparation cardiaque à médiation cellulaire sont complexes. Dans notre étude, l'administration des cellules MuStem humaines a conduit à une atténuation du remodelage tissulaire défavorable du VG et à une amélioration de la fonction cardiaque dans les semaines suivantes. Sur la base des mécanismes d'action décrits dans la littérature et des données que j'ai obtenues, différentes hypothèses peuvent être formulées quant aux mécanismes cellulaires impliqués dans la réparation cardiaque consécutive à l'injection des cellules hMuStem (Figure 48).

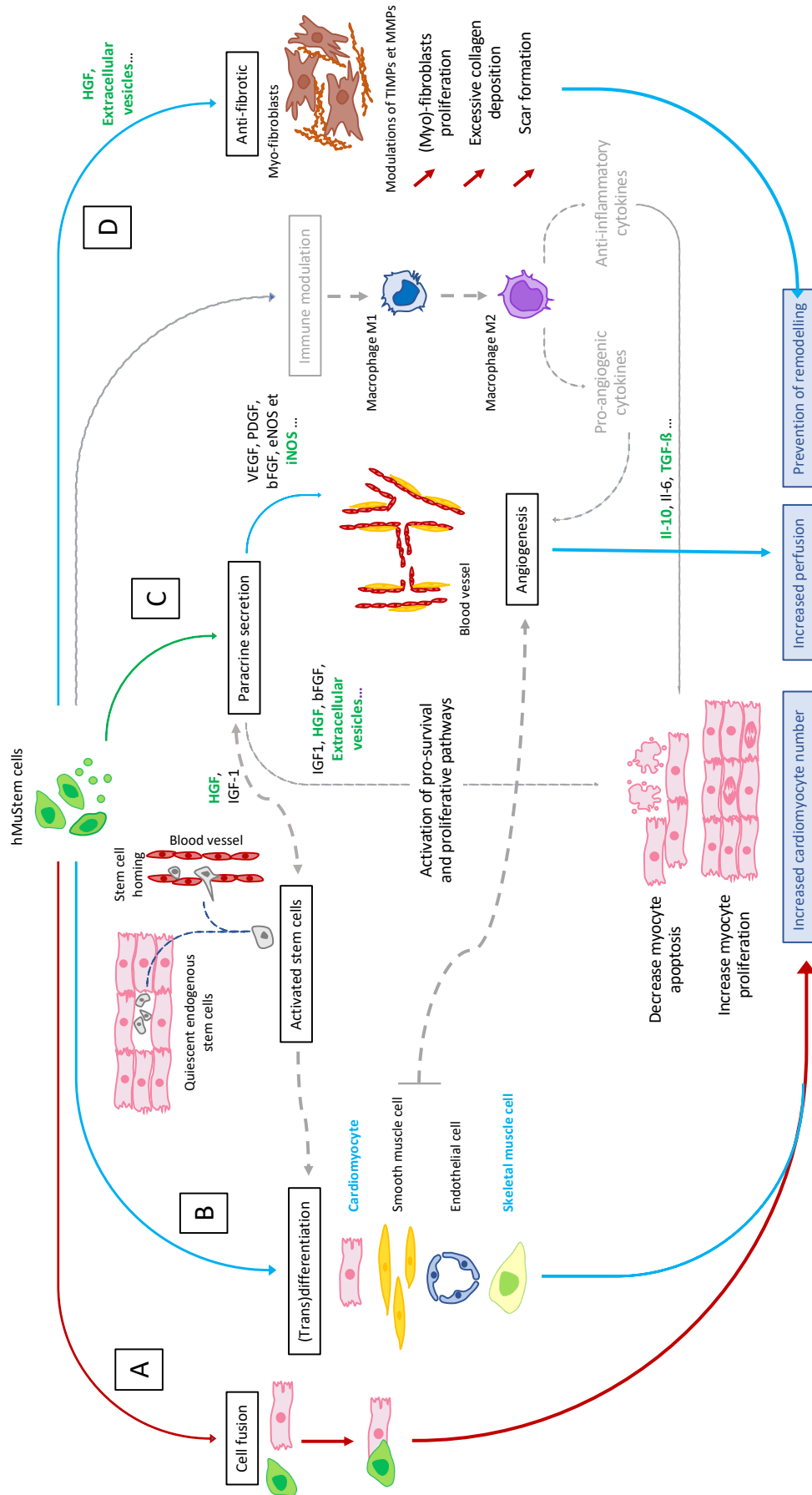


Figure 48 : Mécanismes impliqués dans la réparation tissulaire suite à une injection de cellules hMuStem.

Les éléments en rouge mettent en évidence les mécanismes démontrés *in vivo* comme n- intervenant pas dans la réparation myocardique. Les éléments en bleu : éléments démontrés *in vivo* comme impliqués dans la réparation myocardique. Éléments en gris : hypothèses de la littérature. Éléments en vert : éléments démontrés *in vitro*.

Les hypothèses initiales décrites dans la littérature suggéraient que les CS injectées réparaient le tissu hôte par remplacement direct des tissus par différenciation ou fusion cellulaire (Yoon et al. 2005) (A et B). Dans notre étude, nous avons montré que la moitié des cellules MuStem implantées dans la région infarctée contribuaient à générer principalement des fibres squelettiques, ce qui appuie leur spécification dans leur tissu d'origine. Quelques fibres, beaucoup moins fréquentes, présentaient un phénotype cardiaque. Cette constatation concorde avec les travaux menés par Zhang et al. (2015), qui ont démontré une contribution limitée des CSM de la moelle osseuse en cellules musculaires cardiaques à la suite de leur transplantation dans un modèle aigu d'IDM chez la souris, avec moins de 0,1% de cellules greffées exprimant des marqueurs cardiaques spécifiques (Zhang et al. 2015). De nombreuses autres études ont corroboré cette notion (Noiseux et al. 2006; Sauer, Hescheler, and Wartenberg 2002).

Cependant, la présence de fibres musculaires exprimant le marqueur cardiaque humain TNNI révèle un potentiel intrinsèque des cellules souches hMuStem à s'engager dans la lignée cardiomyogénique. Cette observation renforce la définition des cellules souches oligopotentes déjà décrite sur la base de leur capacité à générer *in vitro* des cellules myogéniques, adipogéniques et ostéogéniques (Lorant et al. 2018; Saury et al. 2018). Dans une étude comparative, Bartunek et ses collaborateurs (2013) ont montré que les BM-MSC stimulées par un cocktail de cytokines cardiopoïétiques avant l'administration endomyocardique dans un contexte d'IDM entraînait une augmentation de la FEVG de 7 % comparativement à 0,2 % pour les cellules sans stimulation (Bartunek et al. 2013). Compte tenu de cette observation et du potentiel des cellules souches hMuStem à se différencier en cellules cardiaques, il nous est apparu intéressant d'étudier plus avant les conséquences de leur préconditionnement *in vitro* avant transplantation. Dans ce but, différentes cytokines et cocktails moléculaires cardiogéniques ont été appliqués sur les cellules hMuStem en culture 2D. Cependant, bien qu'une perte de marqueurs myogéniques aient été démontrée, aucun engagement dans la lignée cardiaque n'a été mis en évidence. Ces résultats mettent en avant l'importance de l'environnement 3D et des facteurs environnementaux dans l'étude du comportement cellulaire et la limite des cultures 2D utilisées de nos jours.

Il est important de noter que, contrairement à ce qui a été décrit avec les MDSC murins après leur implantation dans l'IDM aigu chez la souris (Oshima et al. 2005), nous n'avons jamais

observé de fibres présentant un phénotype hybride musculaire squelettique et cardiaque. En effet, un autre mécanisme présenté dans la littérature pouvant conduire à une augmentation du nombre de cardiomyocytes est le phénomène de fusion (Alvarez-Dolado et al. 2003) (A). Dans notre étude, ce phénomène n'est pas impliqué dans la réparation cardiaque.

L'arythmogénèse est un risque majeur consécutif à la mise en place d'une thérapie cardiaque à base de CS. Plusieurs cas graves d'arythmies ventriculaires, dont la tachycardie, la bradycardie et la bigéminisme, ont été décrits après l'administration de MDSC murines dans un modèle d'IDM chronique (Sekiya et al. 2013). Des résultats similaires ont été rapportés après la transplantation de cardiomyocytes dérivés de CSE humaines dans des modèles primates non humains d'IDM avec une détection d'arythmies ventriculaires significatives (Chong et al. 2014c). Fait intéressant, bien que l'implantation des cellules hMuStem et leur maintien aient été confirmés, aucune arythmie ou altération des propriétés électriques cardiaques (fréquence cardiaque, conduction cardiaque et repolarisation ventriculaire) n'a été observée en plus de celles produites par l'infarctus. Ici, le faible nombre de cardiomyocytes nouvellement formés explique probablement au moins en partie pourquoi une absence d'arythmie a été constatée. Une autre explication réside dans le fait que des cardiomyocytes provenant de cellules donneuses ont été implantées dans la matrice conjonctive, ce qui n'a pas permis un contact direct avec les cardiomyocytes hôtes et n'a donc pas perturbé leurs propriétés électriques.

Une différenciation en d'autres types cellulaires est également possible, comme le montre les travaux de (Bolli et al. 2013a), ou les CSC transplantées vont donner naissance à des cellules vasculaires ou musculaires lisses. Dans notre cas, de façon ponctuelle, des cellules ont présenté un marquage myofibroblastique, mais un engagement dans d'autres lignées n'a pas été exploré.

En résumé, une différenciation des cellules transplantées dans la lignée cardiaque peut se produire mais la question clé est l'ampleur de ce phénomène par rapport aux bénéfices fonctionnels. Dans la plupart des études rapportées à ce jour, les améliorations de la fonction cardiaque semblent disproportionnées par rapport au nombre relativement faible de cellules nouvellement formées. Dans le cas présent, le bénéfice fonctionnel, en raison du nombre très

limité de fibres TNNI⁺ humaines détectées dans le myocarde de l'hôte greffé, ne peut être attribué à l'acquisition d'un phénotype cardiaque par les cellules hMuStem. Nos résultats sont en accord avec ceux d'Oshima et al. (2005) qui rapportent également un effet fonctionnel positif malgré une faible incidence d'acquisition de phénotypes cardiaques des cellules implantées.

Dans notre étude, un peu plus de la moitié des noyaux injectés a été trouvée à l'extérieur des fibres squelettiques ou cardiaques ainsi que des myofibroblastes et sont situés dans la matrice de collagène 3 semaines après une transplantation intramyocardique. Cela indique qu'une fraction importante des cellules hMuStem qui a survécu dans les tissus infarctés ne s'est pas différenciée, mais a plutôt adopté un emplacement interstitiel. Il est intéressant de noter que nous avons déjà décrit un tel comportement des cellules hMuStem injectées dans les muscles squelettiques cryolésés de souris immunodéficientes, donnant naissance à des cellules interstitielles après administration (Lorant et al. 2018). De façon similaire, l'équipe de Quevedo et al. ont déterminé que 76% des CSM se trouvaient dans le compartiment interstitiel plusieurs semaines après leur injection transendocardique dans un modèle d'IDM chez le porc (Quevedo et al. 2009). Le rôle de ces cellules plus petites et indifférenciées nécessite une étude plus approfondie, mais plusieurs études spéculent qu'elles peuvent former un réservoir pour l'homéostasie tissulaire, la reconstitution d'une niche ou la production de facteurs paracrines (Mazhari and Hare 2007). Des travaux futurs seront nécessaires pour évaluer pleinement la nature de ces cellules et déterminer si elles maintiennent des caractéristiques de CS immatures.

L'incapacité à expliquer les effets bénéfiques des CS transplantées sur la base de leur différenciation en cardiomyocytes a conduit à l'hypothèse « paracrine » de réparation myocardique induite par la libération de signaux (cytokines, chemokines, facteurs de croissance, VE...) dans les tissus environnants. Ces facteurs libérés favoriseraient un certain nombre de processus de restauration, y compris l'activation des CSC endogènes, la néovascularisation, l'inhibition de l'apoptose et des modifications favorables à la MEC (Gnecchi et al. 2008) (C et D).

Nous avons montré que la transplantation intramyocardique des cellules hMuStem favorisait fortement l'angiogenèse de l'hôte en augmentant la densité capillaire dans les zones centrale et périphérique de l'infarctus. Cette angiogenèse, qui a probablement contribué directement

au rétablissement structurel et fonctionnel, a été observée par Chen et al. (2013) qui ont décrit une augmentation de la densité microvasculaire dans la région infarctée et dans les zones péri-infarctées après la transplantation de péricytes humains chez des souris immunodéprimées présentant un IDM aigu (Chen et al. 2013b).

Dans les lésions cardiaques, l'angiogenèse a été décrite comme étant induite par le facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF), qui agit sur différentes voies de signalisation pour stimuler la différenciation des cellules endothéliales vasculaires (Koch and Claesson-welsh 2012). De plus, il a été mis en évidence qu'une sécrétion des isoformes endothéliales et inducibles de l'oxyde nitrique synthase (eNOS et iNOS) au niveau de la lésion favorisait la prolifération des cellules endothéliales (Jujo et al. 2008). Or des travaux réalisés au laboratoire sur le phénotype des cellules hMuStem ont montré qu'elles expriment toutes iNOS, ce qui les distingue des CSMs qui sont négatives pour cette enzyme. Ce résultat a été corroboré à la démonstration *in vitro* de production de NO, laquelle est par ailleurs augmentée en condition inflammatoire. La néovascularisation résultante pourrait améliorer l'approvisionnement sanguin des cellules encore viables dans la zone infarctée conduisant à une amélioration de la fonction (C).

Une réduction marquée du tissu infarcté dans les zones de la cicatrice a été démontrée 3 semaines après l'administration intramyocardique des cellules hMuStem. Le mécanisme sous-jacent à cet effet n'a pas été déterminé précisément ici. Cependant, une hypothèse raisonnable pourrait être un effet de la sécrétion de facteurs paracrines par les CSA favorisant la survie des cellules hôtes et inhibant la prolifération fibroblastique. Ceci est corroboré par de nombreuses études établissant l'existence d'une propriété anti-fibrotique paracrine, en particulier pour les CSM avec lesquelles les cellules hMuStem partagent une certaine proximité de lignage. Par exemple, les activités anti-apoptotiques et anti-fibrotiques ont été attribuées au facteur de croissance des hépatocytes (HGF) qui est fortement sécrété par les CSM en culture dont la transplantation dans un modèle murin de cardiomyopathie dilatée a considérablement atténué le développement de la fibrose du myocarde (Nagaya et al. 2005). Il a également été démontré que les CDC transplantés sécrètent de l'HGF qui contribue à la réduction de la fibrose (Gallo et al. 2014; Sala and Crepaldi 2011). Or ce marqueur est également fortement sécrété *in vitro* par les cellules hMuStem (D). D'autres facteurs de croissance pourraient contribuer à l'effet positif des cellules hMuStem. Markel et al. ont

montré que les CSM sous-exprimant le VEGF ont des capacités cardioprotectrices nettement inférieures (Markel et al. 2008). De plus, la protection contre la mort d'un CM après un IDM a été signalée à la suite d'une surexpression du facteur de croissance 1 analogue à l'insuline (IGF-1), qui, favorise l'angiogenèse (Li et al. 1997; Nagaya et al. 2005) et prévient la fibrose (Yoshida et al. 2010). Des expériences supplémentaires visant à étudier d'autres cytokines ou miARN véhiculés par les VE et sécrétés par les cellules hMuStem pourraient contribuer de manière significative à notre compréhension de leur mode d'action.

Enfin, plusieurs études ont révélé que l'injection d'exosomes dérivés de CSM réduisait la taille de l'infarctus et l'apoptose tout en favorisant la fonction cardiaque dans un modèle d'IDM (Teng et al. 2015) ou d'ischémie-reperfusion (Arslan et al. 2013) chez le rat. Pour une meilleure compréhension des mécanismes à l'origine de l'effet des cellules hMuStem sur la fibrose et plus généralement sur les tissus cardiaques endommagés, il pourrait être utile d'étudier *in vitro* et *in vivo* le sécrétome des cellules hMuStem.

3. Vésicules extracellulaires sécrétées par les cellules hMuStem

Bien que des bénéfices fonctionnels aient été observés suite à l'utilisation de molécules ou de facteurs isolés (Lai et al. 2010), de nombreux arguments suggèrent que l'effet paracrine des CS est largement induit par le contenu biologique des VE. Ainsi, de nombreuses études ont rapporté l'efficacité thérapeutique de VE dérivées de cellules dans l'IC et l'IDM (Kervadec et al. 2016). Afin de caractériser l'influence réciproque des cellules hMuStem et de leurs VE sur le cœur infarci, nous avons mis en place au laboratoire un protocole d'isolement des VE^{hMuStem} après conditionnement hypoxique basé sur des centrifugations différentielles successives. Il avait été précédemment mis en évidence que l'hypoxie stimulait la sécrétion vésiculaire (Sicco et al. 2017) et conduisait à une potentialisation des effets *in vivo* des VE sur le remodelage tissulaire (King, Michael, and Gleadle 2012). Une fois le protocole mis en place et la caractérisation primaire réalisée, il serait intéressant d'étudier leur contenu mais également leur impact biologique. En effet, afin d'évaluer leur capacité thérapeutique *in vitro* avant une application *in vivo* et d'évaluer les potentiels mécanismes d'action mis en jeu, des tests sur la prolifération, la migration et l'angiogenèse seront réalisés.

Cependant, l'étude des VE reste un axe de recherche récent et l'état des connaissances sur le compartiment vésiculaire évolue très rapidement actuellement conduisant à des modifications techniques et conceptuelles. Ainsi, aucune approche ne permet une purification complète et toutes les méthodes de caractérisation disponibles présentent des avantages et des limites. A ce jour, un des défis majeurs est d'isoler les sous-types vésiculaires afin de déterminer le réel potentiel thérapeutique de chaque sous fraction. La méthode de référence reste l'ultracentrifugation qui permet une séparation basée sur la taille et le poids des VE. La taille des différents sous-types vésiculaires se chevauchant, cette technique ne permet pas d'obtenir des sous-fractions de VE pures. Afin d'éliminer les protéines du milieu qui peuvent être isolées en même temps que les VE, des étapes de purification peuvent être ajoutées ou complètement remplacer l'ultracentrifugation. Parmi ces techniques, on retrouve la séparation par gradient de sucrose, l'immuno-précipitation ou la chromatographie d'exclusion de taille (Böing et al. 2014; Durcin et al. 2017; Kowal et al. 2016; Théry et al. 2006). Cependant, ces techniques peuvent enrichir en un sous-type vésiculaire par rapport aux autres. Actuellement, il semblerait que la technique par chromatographie soit la plus efficace en terme de pureté sans affecter le contenu vésiculaire (Nordin et al. 2015). De plus, elle pourrait être utilisée afin d'isoler les VE à large échelle ce qui aurait une réelle pertinence pour une utilisation clinique. La technique d'isolement des VE a donc une importance primordiale car elle peut affecter leur efficacité en impactant sur le contenu moléculaire. Il en est de même pour le conditionnement réalisé.

4. Limites de l'étude

Suite à un IDM, la prise en charge clinique consiste à reperfusion le patient dès que possible après l'apparition des symptômes. Dans cette situation, le modèle expérimental le plus pertinent est celui de la reperfusion ischémique. Cependant, lorsque le délai clinique est trop long ou que l'obstruction coronarienne rend impossible le passage d'un cathéter, l'angioplastie devient impossible. Ces cas cliniques pourraient nécessiter l'injection de cellules pour tenter de régénérer les zones lésées du muscle cardiaque ou de préserver sa fonction. Notre modèle de ligature permanente avec un court délai de 4 semaines après IDM est dans ce cas tout à fait pertinent.

Une 2nde limite de notre étude est la taille réduite des infarctus dans notre modèle. En effet, malgré l'utilisation systématique de ce protocole en laboratoire et les travaux préparatoires pour un placement optimal de la ligature sur le réseau coronarien, la diminution moyenne de la FEVG n'a jamais dépassé 30%. La faiblesse des valeurs enregistrées est sûrement liée à la réponse inflammatoire réduite voire nulle dans ce modèle de rat. En effet, l'utilisation de rats immunodéficients est une autre limite de notre étude pour bien comprendre le comportement des cellules hMuStem et leur action sur les tissus cardiaques endommagés dans le contexte de l'IDM. En effet, ce modèle ne permet pas de prendre en compte la composante immunologique essentielle à la survie, au recrutement et au fonctionnement des cellules donneuses par leurs interactions avec les cellules inflammatoires (Perin et al. 2012; Zaruba and Franz 2010). Or, ceci est important pour le remodelage cardiaque, particulièrement en ce qui concerne le rôle de soutien critique des monocytes et/ou des macrophages pour la cardiogenèse et la réparation des tissus (DeBerge et al. 2017; Heidt et al. 2014; Lavine et al. 2014). Par exemple, c'est la dégradation précoce de la matrice par les MMP qui va permettre l'infiltration des cellules inflammatoires et des macrophages. Dans des modèles d'infarctus sur des souris invalidées pour le gène du plasminogène-alpha, impliqué dans l'activation des MMP, il n'est pas observé de migration des cellules inflammatoires dans la zone infarctée, conduisant à la persistance d'une zone nécrotique plusieurs semaines après l'infarctus (Creemers et al. 2000). Des résultats similaires dans notre modèle ont été observés jusqu'à 3 semaines après l'infarctus. De plus, des travaux réalisés au sein du laboratoire, ont mis en évidence les propriétés immunomodulatrices des cellules hMuStem et notamment leur capacité à induire une conversion des macrophages de type M1 vers un phénotype anti-inflammatoire M2 (Charrier et al. données non publiées), qui va jouer un rôle important dans la médiation de la réparation tissulaire.

Enfin, l'une des limites de notre étude réside dans le fait qu'elle ne permet pas de déterminer si l'effet bénéfique observé sur le remodelage ventriculaire gauche et la fonction cardiaque reflète une pertinence clinique, puisque notre observation a été faite 4 semaines après l'induction de l'IDM. Il serait nécessaire d'effectuer une analyse à long terme pour déterminer comment les rats transplantés réagissent après la phase de compensation et s'ils développent progressivement une IC, comme attendu chez les animaux non traités.

En conclusion, le protocole de greffe de cellules souches hMuStem développé dans notre étude dans un contexte d'IDM a révélé la capacité de cette population de CS dérivées du muscle squelettique à s'implanter dans le cœur infarci où elle atténue fortement le remodelage tissulaire défavorable, en limitant significativement le développement de la zone fibrotique, et améliore les performances du ventricule gauche sans induire autrement des anomalies du rythme. Basées sur cette préservation de la fonction cardiaque, ces nouvelles découvertes ouvrent la voie à une extension potentielle du domaine d'applications cliniques des cellules souches hMuStem à celui des pathologies cardiaques.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel-Latif, Ahmed, Ewa K. Zuba-Surma, Jamie Case, Sumit Tiwari, Greg Hunt, Smita Ranjan, Robert J. Vincent, Edward F. Srouf, Roberto Bolli, and Buddhadeb Dawn. 2008. "TGF-B1 Enhances Cardiomyogenic Differentiation of Skeletal Muscle-Derived Adult Primitive Cells." *Basic Research in Cardiology* 103(6):514–24.
- Ahmed, Rafeeq P. H., Husnain K. Haider, Stephanie Buccini, Longhu Li, Shujia Jiang, and Muhammad Ashraf. 2011. "Reprogramming of Skeletal Myoblasts for Induction of Pluripotency for Tumor-Free Cardiomyogenesis in the Infarcted Heart." *Circulation Research* 109(1):60–70.
- Akita, Takako, Toyooki Murohara, Hisao Ikeda, Ken ichiro Sasaki, Toshifumi Shimada, Kimiyasu Egami, and Tsutomu Imaizumi. 2003. "Hypoxic Preconditioning Augments Efficacy of Human Endothelial Progenitor Cells for Therapeutic Neovascularization." *Laboratory Investigation* 83(1):65–73.
- Alvarez-Dolado, Manuel, Ricardo Pardal, Jose M. Garcia-Verdugo, John R. Fike, Hyun O. Lee, Klaus Pfeffer, Carlos Lois, Sean J. Morrison, and Arturo Alvarez-Bullia. 2003. "Fusion of Bone-Marrow-Derived Cells with Purkinje Neurons, Cardiomyocytes and Hepatocytes." *Nature* 425(6961):968-973.
- Alvarez-Erviti, Lydia, Yiqi Seow, HaiFang Yin, Corinne Betts, Samira Lakhali, and Matthew J. A. Wood. 2011. "Delivery of siRNA to the Mouse Brain by Systemic Injection of Targeted Exosomes." *Nature Biotechnology* 29(4):341–45.
- Alvarez, M. Lucrecia, Mahdieh Khosroheidari, Rupesh Kanchi Ravi, and Johanna K. Distefano. 2012. "Comparison of Protein, MicroRNA, and mRNA Yields Using Different Methods of Urinary Exosome Isolation for the Discovery of Kidney Disease Biomarkers." *Kidney International* 82(9):1024–32.
- Ambrose, John and Manmeet Singh. 2015. "Pathophysiology of Coronary Artery Disease Leading to Acute Coronary Syndromes." *F1000Prime Reports* 7.
- Andrews, P. W., M. M. Matin, A. R. Bahrami, I. Damjanov, P. Gokhale, and J. S. Draper. 2005. "Embryonic Stem (ES) Cells and Embryonal Carcinoma (EC) Cells: Opposite Sides of the Same Coin." *Biochemical Society Transactions* 33(6):1526–30.
- Ang, Keng Leong, Derek Chin, Francisco Leyva, Paul Foley, Chandrashekhar Kubal, Shajil Chalil, Lakshmi Srinivasan, Lizelle Bernhardt, Suzanne Stevens, Lincoln T. Shenje, and Manuel Galiñanes. 2008. "Randomized, Controlled Trial of Intramuscular or Intracoronary Injection of Autologous Bone Marrow Cells into Scarred Myocardium during CABG versus CABG Alone." *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* 5(10):663–70.
- Angert, David, Remus M. Berretta, Hajime Kubo, Hongyu Zhang, Xiongwen Chen, Wei Wang, Barbara Ogorek, Mary Barbe, and Steven R. Houser. 2011. "Repair of the Injured Adult Heart Involves New Myocytes Potentially Derived from Resident Cardiac Stem Cells." *Circulation Research* 108(10):1226–37.
- Arenaccio, Claudia, Chiara Chiozzini, Flavia Ferrantelli, Patrizia Leone, Eleonora Olivetta, and Maurizio Federico. 2018. "Exosomes in Therapy: Engineering, Pharmacokinetics and Future Applications." *Current Drug Targets* 20(1):87–95.
- Arroyo, Jason D., John R. Chevillet, Evan M. Kroh, Ingrid K. Ruf, Colin C. Pritchard, Donald F. Gibson, Patrick S. Mitchell, Christopher F. Bennett, Era L. Pogossova-Agadjanyan, Derek L. Stirewalt, Jonathan F. Tait, and Muneesh Tewari. 2011. "Argonaute2 Complexes Carry a Population of Circulating MicroRNAs Independent

- of Vesicles in Human Plasma." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(12):5003–8.
- Arslan, Fatih, Ruenn Chai Lai, Mirjam B. Smeets, Lars Akeroyd, Andre Choo, Eissa N. E. Aguor, Leo Timmers, Harold V. van Rijen, Pieter A. Doevendans, Gerard Pasterkamp, Sai Kiang Lim, and Dominique P. de Kleijn. 2013. "Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Increase ATP Levels, Decrease Oxidative Stress and Activate PI3K/Akt Pathway to Enhance Myocardial Viability and Prevent Adverse Remodeling after Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury." *Stem Cell Research* 10(3):301–12.
- Askari, Arman T., Samuel Unzek, Zoran B. Popovic, Corey K. Goldman, Farhad Forudi, Matthew Kiedrowski, Aleksandr Rovner, Stephen G. Ellis, James D. Thomas, Paul E. DiCorleto, Eric J. Topol, and Marc S. Penn. 2003. "Effect of Stromal-Cell-Derived Factor 1 on Stem-Cell Homing and Tissue Regeneration in Ischaemic Cardiomyopathy." *Lancet* 362(9385):697–703.
- Assmus, Birgit, Andreas Rolf, Sandra Erbs, Albrecht Elsässer, Werner Haberbosch, Rainer Hambrecht, Harald Tillmanns, Jiangtao Yu, Roberto Corti, Detlef G. Mathey, Christian W. Hamm, Tim Süselbeck, Torsten Tonn, Stefanie Dimmeler, Thorsten Dill, Andreas M. Zeiher, and Volker Schächinger. 2010. "Clinical Outcome 2 Years after Intracoronary Administration of Bone Marrow-Derived Progenitor Cells in Acute Myocardial Infarction." *Circulation: Heart Failure* 3(1):89–96.
- Assmus, Birgit, Dirk H. Walter, Florian H. Seeger, David M. Leistner, Julia Steiner, Ina Ziegler, Andreas Lutz, Walaa Khaled, Jens Klotsche, Torsten Tonn, Stefanie Dimmeler, and Andreas M. Zeiher. 2013. "Effect of Shock Wave-Facilitated Intracoronary Cell Therapy on LVEF in Patients with Chronic Heart Failure: The CELLWAVE Randomized Clinical Trial." *JAMA - Journal of the American Medical Association* 309(15):1622–31.
- Atai, Nadia A., Leonora Balaj, Henk Van Veen, Xandra O. Breakefield, Peter A. Jarzyna, Cornelis J. F. Van Noorden, Johan Skog, and Casey A. Maguire. 2013. "Heparin Blocks Transfer of Extracellular Vesicles between Donor and Recipient Cells." *Journal of Neuro-Oncology* 115(3):343–51.
- Atoui, Rony, Dominique Shum-Tim, and Ray C. J. Chiu. 2008. "Myocardial Regenerative Therapy: Immunologic Basis for the Potential 'Universal Donor Cells.'" *Annals of Thoracic Surgery* 86(1):327–34.
- Aurora, Arin B., Ahmed I. Mahmoud, Xiang Luo, Brett A. Johnson, Eva Van Rooij, Satoshi Matsuzaki, Kenneth M. Humphries, Joseph A. Hill, Rhonda Bassel-Duby, Hesham A. Sadek, and Eric N. Olson. 2012. "MicroRNA-214 Protects the Mouse Heart from Ischemic Injury by Controlling Ca²⁺ Overload and Cell Death." *Journal of Clinical Investigation* 122(4):1222–32.
- Ayers, Lisa, Malcolm Kohler, Paul Harrison, Ian Sargent, Rebecca Dragovic, Marianne Schaap, Rienk Nieuwland, Susan A. Brooks, and Berne Ferry. 2011. "Measurement of Circulating Cell-Derived Microparticles by Flow Cytometry: Sources of Variability within the Assay." *Thrombosis Research* 127(4):370–77.
- Baietti, Maria Francesca, Zhe Zhang, Eva Mortier, Aurélie Melchior, Gisèle Degeest, Annelies Geeraerts, Ylva Ivarsson, Fabienne Depoortere, Christien Coomans, Elke Vermeiren, Pascale Zimmermann, and Guido David. 2012. "Syndecan-Syntenin-ALIX Regulates the Biogenesis of Exosomes." *Nature Cell Biology* 14(7):677–85.
- Baj-Krzyworzeka, Monika, Rafał Szatanek, Kazimierz Węglarczyk, Jarosław Baran, Barbara Urbanowicz, Piotr Brański, Mariusz Z. Ratajczak, and Marek Zembala. 2006. "Tumour-Derived Microvesicles Carry Several

- Surface Determinants and MRNA of Tumour Cells and Transfer Some of These Determinants to Monocytes." *Cancer Immunology, Immunotherapy* 55(7):808–18.
- Bajaj, Retesh, Ajay K. Jain, and Charles Knight. 2018. "Definitions of Acute Coronary Syndromes." *Medicine (United Kingdom)* 46(9):528–32.
- Balbi, Carolina, Martina Piccoli, Lucio Barile, Andrea Papait, Andrea Armirotti, Elisa Principi, Daniele Reverberi, Luisa Pascucci, Pamela Becherini, Luigi Varesio, Massimo Moggi, Domenico Coviello, Tiziano Bandiera, Michela Pozzobon, Ranieri Cancedda, and Sveva Bollini. 2017. "First Characterization of Human Amniotic Fluid Stem Cell Extracellular Vesicles as a Powerful Paracrine Tool Endowed with Regenerative Potential." *Stem Cells Translational Medicine* 6(5):1340–55.
- Balsam, Leora B., Amy J. Wagers, Julie L. Christensen, Theo Kofidis, Irving L. Weissmann, and Robert C. Robbins. 2004. "Haematopoietic Stem Cells Adopt Mature Haematopoietic Fates in Ischaemic Myocardium." *Nature* 428(6983):668–73.
- Bang, Claudia, Sandor Batkai, Seema Dangwal, Shashi Kumar Gupta, Ariana Foinquinos, Angelika Holzmann, Annette Just, Janet Remke, Karina Zimmer, Andre Zeug, Evgeni Ponimaskin, Andreas Schmiedl, Xiaoke Yin, Manuel Mayr, Rashi Halder, Andre Fischer, Stefan Engelhardt, Yuanyuan Wei, Andreas Schober, Jan Fiedler, and Thomas Thum. 2014. "Cardiac Fibroblast-Derived MicroRNA Passenger Strand-Enriched Exosomes Mediate Cardiomyocyte Hypertrophy." *Journal of Clinical Investigation* 124(5):2136–46.
- Bartel, David P. 2009. "MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions." *Cell* 136(2):215–33.
- Bartunek, Jozef, Atta Behfar, Dariouch Dolatabadi, Marc Vanderheyden, Miodrag Ostojic, Jo Dens, Badih El Nakadi, Marko Banovic, Branko Beleslin, Mathias Vrolix, Victor Legrand, Christian Vrints, Jean Louis Vanoverschelde, Ruben Crespo-Diaz, Christian Homsy, Michal Tendera, Scott Waldman, William Wijns, and Andre Terzic. 2013. "Cardiopoietic Stem Cell Therapy in Heart Failure: The C-CURE (Cardiopoietic Stem Cell Therapy in Heart FailURE) Multicenter Randomized Trial with Lineage-Specified Biologics." *Journal of the American College of Cardiology* 61(23):2329–38.
- Bartunek, Jozef, Jeffrey D. Croissant, William Wijns, Stephanie Gofflot, Aurore de Lavareille, Marc Vanderheyden, Yulia Kaluzhny, Naïma Mazouz, Philippe Willemsen, Martin Penicka, Myrielle Mathieu, Christian Homsy, Bernard De Bruyne, Kathleen McEntee, Ike W. Lee, and Guy R. Heyndrickx. 2007. "Pretreatment of Adult Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells with Cardiomyogenic Growth Factors and Repair of the Chronically Infarcted Myocardium." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 292(2):H1095–1104.
- Bartunek, Jozef, Beth Davison, Warren Sherman, Thomas Povsic, Timothy D. Henry, Bernard Gersh, Marco Metra, Gerasimos Filippatos, Roger Hajjar, Atta Behfar, Christian Homsy, Gad Cotter, William Wijns, Michal Tendera, and Andre Terzic. 2016. "Congestive Heart Failure Cardiopoietic Regenerative Therapy (CHART-1) Trial Design." *European Journal of Heart Failure* 18(2):160–68.
- Bayes-Genis, Antoni, Carolina Soler-Botija, Jordi Farré, Pilar Sepúlveda, Angel Raya, Santiago Roura, Cristina Prat-Vidal, Carolina Gálvez-Montón, José Anastasio Montero, Dirk Büscher, and Juan Carlos Izpisua Belmonte. 2010. "Human Progenitor Cells Derived from Cardiac Adipose Tissue Ameliorate Myocardial Infarction in Rodents." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 49(5):771–80.

- Beeres, Saskia L. M. A., Jeroen J. Bax, Petra Dibbets-Schneider, Marcel P. M. Stokkel, Willem E. Fibbe, Ernst E. van der Wall, Martin J. Schalij, and Douwe E. Atsma. 2007. "Intramyocardial Injection of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells in Patients With Chronic Myocardial Infarction and Severe Left Ventricular Dysfunction." *American Journal of Cardiology* 100(7):1094–98.
- Bel, Alain, Emmanuel Messas, Onnik Agbulut, Patrice Richard, Jane Lyse Samuel, Patrick Bruneval, Albert A. Hagège, and Philippe Menasché. 2003. "Transplantation of Autologous Fresh Bone Marrow into Infarcted Myocardium: A Word of Caution." *Circulation* 108(10 SUPPL.).
- Bellamy, Valérie, Valérie Vanneau, Alain Bel, Hany Nemetalla, Solène Emmanuelle Boitard, Yohan Farouz, Pierre Joanne, Marie Cécile Perier, Estelle Robidel, Chantal Mandet, Albert Hagège, Patrick Bruneval, Jérôme Larghero, Onnik Agbulut, and Philippe Menasché. 2015. "Long-Term Functional Benefits of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiac Progenitors Embedded into a Fibrin Scaffold." *Journal of Heart and Lung Transplantation* 34(9):1198–1207.
- Bellin, Gloria, Chiara Gardin, Letizia Ferroni, Juan Chachques, Massimo Rogante, Dinko Mitrečić, Roberto Ferrari, and Barbara Zavan. 2019. "Exosome in Cardiovascular Diseases: A Complex World Full of Hope." *Cells* 8(2):166.
- Beltrami, Antonio P., Laura Barlucchi, Daniele Torella, Mathue Baker, Federica Limana, Stefano Chimenti, Hideko Kasahara, Marcello Rota, Ezio Musso, Konrad Urbanek, Annarosa Leri, Jan Kajstura, Bernardo Nadal-Ginard, and Piero Anversa. 2003. "Adult Cardiac Stem Cells Are Multipotent and Support Myocardial Regeneration." *Cell* Vol. 114: 763-776
- Beltrami, Carlo Alberto, Nicoletta Finato, Maurizio Rocco, Giorgio A. Feruglio, Cesare Puricelli, Elena Cigola, Federico Quaini, Edmund H. Sonnenblick, Giorgio Olivetti, and Piero Anversa. 1994. "Structural Basis of End-Stage Failure in Ischemic Cardiomyopathy in Humans." *Circulation* Vol. 89:151-163.
- Beltrami, Cristina, Marie Besnier, Saran Shantikumar, Andrew I. U. Shearn, Cha Rajakaruna, Abas Laftah, Fausto Sessa, Gaia Spinetti, Enrico Petretto, Gianni D. Angelini, and Costanza Emanuelli. 2017. "Human Pericardial Fluid Contains Exosomes Enriched with Cardiovascular-Expressed MicroRNAs and Promotes Therapeutic Angiogenesis." *Molecular Therapy* 25(3):679–93.
- Berckmans, René J., Auguste Sturk, Laurens M. Van Tienen, Marianne C. L. Schaap, and Rienk Nieuwland. 2011. "Cell-Derived Vesicles Exposing Coagulant Tissue Factor in Saliva." *Blood* 117(11):3172–80.
- Bergsmedh, Anna, Anna Szeles, Marie Henriksson, Anders Bratt, M. Judah Folkman, Anna Lena Spetz, and Lars Holmgren. 2001. "Horizontal Transfer of Oncogenes by Uptake of Apoptotic Bodies." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(11):6407–11.
- Van Berlo, Jop H., Onur Kanisicak, Marjorie Maillet, Ronald J. Vagnozzi, Jason Karch, Suh Chin J. Lin, Ryan C. Middleton, Eduardo Marbán, and Jeffery D. Molkentin. 2014. "C-Kit + Cells Minimally Contribute Cardiomyocytes to the Heart." *Nature* 509(7500):337–41.
- Bersell, Kevin, Shima Arab, Bernhard Haring, and Bernhard Kühn. 2009. "Neuregulin1/ErbB4 Signaling Induces Cardiomyocyte Proliferation and Repair of Heart Injury." *Cell* 138(2):257–70.
- Biagini, Elena, Marco Valgimigli, Pieter C. Smits, Don Poldermans, Arend F. L. Schinkel, Vittoria Rizzello, Emile E. M. Onderwater-, Manolis Bountiukos, and Patrick W. Serruys. 2006. "Stress and Tissue Doppler

- Echocardiographic Evidence of Effectiveness of Myoblast Transplantation in Patients with Ischaemic Heart Failure." *European Journal of Heart Failure* 8(6):641–48.
- Le Blanc, K. and O. Ringdén. 2007. "Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells and Clinical Experience." *Journal of Internal Medicine* 262(5):509–25.
- Blin, Guillaume, David Nury, Sonia Stefanovic, Tui Neri, Oriane Guillevic, Benjamin Brinon, Valérie Bellamy, Catherine Rücker-Martin, Pascal Barbry, Alain Bel, Patrick Bruneval, Chad Cowan, Julia Pouly, Shoukhrat Mitalipov, Elodie Gouadon, Patrice Binder, Albert Hagège, Michel Desnos, Jean François Renaud, Philippe Menasché, and Michel Pucéat. 2010. "A Purified Population of Multipotent Cardiovascular Progenitors Derived from Primate Pluripotent Stem Cells Engrafts in Postmyocardial Infarcted Nonhuman Primates." *Journal of Clinical Investigation* 120(4):1125–39.
- Boilard, Eric, Peter A. Nigrovic, Katherine Larabee, Gerald F. M. Watts, Jonathan S. Coblyn, Michael E. Weinblatt, Elena M. Massarotti, Eileen Remold-O'Donnell, Richard W. Farndale, Jerry Ware, and David M. Lee. 2010. "Platelets Amplify Inflammation in Arthritis via Collagen-Dependent Microparticle Production." *Science* 327(5965):580–83.
- Böing, Anita N., Edwin van der Pol, Anita E. Grootemaat, Frank A. W. Coumans, Auguste Sturk, and Rienk Nieuwland. 2014. "Single-Step Isolation of Extracellular Vesicles by Size-Exclusion Chromatography." *Journal of Extracellular Vesicles* 3(1).
- Bolli, Roberto, Xian Liang Tang, Santosh K. Sanganalmath, Ornella Rimoldi, Federico Mosna, Ahmed Abdel-Latif, Hani Jneid, Marcello Rota, Annarosa Leri, and Jan Kajstura. 2013a. "Intracoronary Delivery of Autologous Cardiac Stem Cells Improves Cardiac Function in a Porcine Model of Chronic Ischemic Cardiomyopathy." *Circulation* 128(2):122–31.
- Bolli, Roberto, Xian Liang Tang, Santosh K. Sanganalmath, Ornella Rimoldi, Federico Mosna, Ahmed Abdel-Latif, Hani Jneid, Marcello Rota, Annarosa Leri, and Jan Kajstura. 2013b. "Intracoronary Delivery of Autologous Cardiac Stem Cells Improves Cardiac Function in a Porcine Model of Chronic Ischemic Cardiomyopathy." *Circulation* 128(2):122–31.
- Bonaros, Nikolaos, Rauend Rauf, Dominik Wolf, Eva Margreiter, Alexandar Tzankov, Bernhard Schlechta, Alfred Kocher, Harald Ott, Thomas Schachner, Steffen Hering, Johannes Bonatti, and Guenther Laufer. 2006. "Combined Transplantation of Skeletal Myoblasts and Angiopoietic Progenitor Cells Reduces Infarct Size and Apoptosis and Improves Cardiac Function in Chronic Ischemic Heart Failure." *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 132(6):1321.
- Bongiovanni, Dario, Beatrice Bassetti, Elisa Gambini, Giuseppe Gaipa, Giacomo Frati, Felice Achilli, Paolo Scacciarella, Corrado Carbucichio, and Giulio Pompilio. 2014. "The CD133 + Cell as Advanced Medicinal Product for Myocardial and Limb Ischemia ." *Stem Cells and Development* 23(20):2403–21.
- Bongso, Ariff and Chui Yee Fong. 2013. "The Therapeutic Potential, Challenges and Future Clinical Directions of Stem Cells from the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord." *Stem Cell Reviews and Reports* 9(2):226–40.
- Botta Rosanna, Erhe Gao, Giorgio Stassi, Desirée Bonci, Elvira Pelosi, Donna Zwas, Mariella Patti, Lucrezia Colonna, Marta Baiocchi, Simona Coppola, Xin Ma, Gianluigi Condorelli, and Cesare Peschle. 2004. "Heart

- Infarct in NOD-SCID Mice: Therapeutic Vasculogenesis by Transplantation of Human CD34 + Cells and Low Dose CD34 + KDR + Cells ." *The FASEB Journal* 18(12):1392–94.
- Boudoulas, Konstantinos Dean, Filippou Triposciadis, Paraschos Geleris, and Harisios Boudoulas. 2016. "Coronary Atherosclerosis: Pathophysiologic Basis for Diagnosis and Management." *Progress in Cardiovascular Diseases* 58(6):676–92.
- Braza, Mounia S., Mandy M. T. van Leent, Marnix Lameijer, Brenda L. Sanchez-Gaytan, Rob J. W. Arts, Carlos Pérez-Medina, Patricia Conde, Mercedes R. Garcia, Maria Gonzalez-Perez, Manisha Brahmachary, Francois Fay, Ewelina Kluza, Susanne Kossatz, Regine J. Dress, Fadi Salem, Alexander Rialdi, Thomas Reiner, Peter Boros, Gustav J. Strijkers, Claudia C. Calcagno, Florent Ginhoux, Ivan Marazzi, Esther Lutgens, Gerry A. F. Nicolaes, Christian Weber, Filip K. Swirski, Matthias Nahrendorf, Edward A. Fisher, Raphaël Duivenvoorden, Zahi A. Fayad, Mihai G. Netea, Willem J. M. Mulder, and Jordi Ochando. 2018. "Inhibiting Inflammation with Myeloid Cell-Specific Nanobiologics Promotes Organ Transplant Acceptance." *Immunity* 49(5):819-828.
- Buckingham, Margaret, Didier Montarras, Ottoline Leyser, and Olivier Pourquié. 2008. "Skeletal Muscle Stem Cells This Review Comes from a Themed Issue on Pattern Formation and Developmental Mechanisms Edited By." *Current Opinion in Genetics & Development* 18:330–36.
- Cai, Chuanxi, Lei Teng, Duc Vu, Jia Qiang He, Yiru Guo, Qianghong Li, Xian Liang Tang, Gregg Rokosh, Aruni Bhatnagar, and Roberto Bolli. 2012. "The Heme Oxygenase 1 Inducer (CoPP) Protects Human Cardiac Stem Cells against Apoptosis through Activation of the Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK)/NRF2 Signaling Pathway and Cytokine Release." *Journal of Biological Chemistry* 287(40):33720–32.
- Cai, Liying, Brian H. Johnstone, Todd G. Cook, Jian Tan, Michael C. Fishbein, Peng-Sheng Chen, and Keith L. March. 2009. "IFATS Collection: Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells Induce Angiogenesis and Nerve Sprouting Following Myocardial Infarction, in Conjunction with Potent Preservation of Cardiac Function." *Stem Cells* 27(1):230–37.
- Caplan, Arnold I. 2017. "Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name!" *Stem Cells Translational Medicine* 6(6):1445–51.
- Caporali, Andrea, Vladislav Miscianinov, Jaimy Saif, and Costanza Emanuelli. 2016. "MicroRNA Transport in Cardiovascular Complication of Diabetes." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1861(12):2111–20.
- Carmona, Guillaume, Emmanouil Chavakis, Ulrike Koehl, Andreas M. Zeiher, and Stefanie Dimmeler. 2008. "Activation of Epcac Stimulates Integrin-Dependent Homing of Progenitor Cells." *Blood* 111(5):2640–46.
- Carpentier, Alain, Christian Latrémouille, Bernard Cholley, David M. Smadja, Jean Christian Roussel, Elodie Boissier, Jean Noël Trochu, Jean Pierre Gueffet, Michèle Treillot, Philippe Bizouarn, Denis Méléard, Marie Fazia Boughenou, Olivier Ponzio, Marc Grimmé, Antoine Capel, Piet Jansen, Albert Hagège, Michel Desnos, Jean Noël Fabiani, and Daniel Dureau. 2015. "First Clinical Use of a Bioprosthetic Total Artificial Heart: Report of Two Cases." *The Lancet* 386(10003):1556–63.
- Castro, Liesa, Birgit Geertz, Marina Reinsch, Bülent Aksehirlioglu, Arne Hansen, Thomas Eschenhagen, Hermann Reichenspurner, Florian Weinberger, and Simon Pecha. 2019. "Implantation of HiPSC-Derived Cardiac-

- Muscle Patches after Myocardial Injury in a Guinea Pig Model." *Journal of Visualized Experiments : JoVE* (145).
- Chachques, Juan C, Christophe Acar, Jesus Herreros, Jorge C. Trainini, Felipe Prosper, Nicola D'attellis, Jean-Noel Fabiani, and Alain F. Carpentier. 2004. "Cellular Cardiomyoplasty: Clinical Application." *Ann Thorac Surg* 77:1121–51.
- Chachques, Juan C., Fabricio Duarte, Barbara Cattadori, Abdel Shafy, Nermine Lila, Gilles Chatellier, Jean Noel Fabiani, and Alain F. Carpentier. 2004. "Angiogenic Growth Factors and/or Cellular Therapy for Myocardial Regeneration: A Comparative Study." *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 128(2):245–53.
- Chaput, Nathalie and Clotilde Théry. 2011. "Exosomes: Immune Properties and Potential Clinical Implementations." *Seminars in Immunopathology* 33(5):419–40.
- Chavakis, Emmanouil, Andreas Hain, Maria Vinci, Guillaume Carmona, Marco E. Bianchi, Peter Vajkoczy, Andreas M. Zeiher, Triantafyllos Chavakis, and Stefanie Dimmeler. 2007. "High-Mobility Group Box 1 Activates Integrin-Dependent Homing of Endothelial Progenitor Cells." *Circulation Research* 100(2):204–12.
- Chavakis, Emmanouil, Masamichi Koyanagi, and Stefanie Dimmeler. 2010. "Enhancing the Outcome of Cell Therapy for Cardiac Repair: Progress from Bench to Bedside and Back." *Circulation* 121(2):325–35.
- Chen, Chien Wen, Masaho Okada, Jonathan D. Proto, Xueqin Gao, Naosumi Sekiya, Sarah A. Beckman, Mirko Corselli, Mihaela Crisan, Arman Saparov, Kimimasa Tobita, Bruno Peault, and Johnny Huard. 2013. "Human Pericytes for Ischemic Heart Repair." *Stem Cells* 31(2):305–16.
- Chen, Jinghai, Zhan Peng Huang, Hee Young Seok, Jian Ding, Masaharu Kataoka, Zheng Zhang, Xiaoyun Hu, Gang Wang, Zhiqiang Lin, Si Wang, Willam T. Pu, Ronglih Liao, and Da Zhi Wang. 2013. "Mir-17-92 Cluster Is Required for and Sufficient to Induce Cardiomyocyte Proliferation in Postnatal and Adult Hearts." *Circulation Research* 112(12):1557–66.
- Chen, Lijuan, Yingjie Wang, Yaohua Pan, Lan Zhang, Chengxing Shen, Gangjian Qin, Muhammad Ashraf, Neal Weintraub, Genshan Ma, and Yaoliang Tang. 2013a. "Cardiac Progenitor-Derived Exosomes Protect Ischemic Myocardium from Acute Ischemia/Reperfusion Injury." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 431(3):566–71.
- Chen, Tian Sheng, Fatih Arslan, Yijun Yin, Soon Sim Tan, Ruenn Chai Lai, Andre Boon Hwa Choo, Jayanthi Padmanabhan, Chuen Neng Lee, Dominique P. V de Kleijn, and Sai Kiang Lim. 2011. "Enabling a Robust Scalable Manufacturing Process for Therapeutic Exosomes through Oncogenic Immortalization of Human ESC-Derived MSCs." *Journal of Translational Medicine* 9:47.
- Chen, Xi, Lizhu Zhang, Tong Su, Heng Li, Qiang Huang, Dan Wu, Chengjian Yang, and Zhijun Han. 2015. "Kinetics of Plasma MicroRNA-499 Expression in Acute Myocardial Infarction." *Journal of Thoracic Disease* 7(5):890–96.
- Cheng, Chao, Qiang Wang, Wenjie You, Manhua Chen, and Jiahong Xia. 2014. "MiRNAs as Biomarkers of Myocardial Infarction: A Meta-Analysis." *PLoS ONE* 9(2):e88566.
- Cheng, Ke, Ahmed Ibrahim, M. Taylor Hensley, Deliang Shen, Baiming Sun, Ryan Middleton, Weixin Liu, Rachel R. Smith, and Eduardo Marbán. 2014. "Relative Roles of CD90 and C-Kit to the Regenerative Efficacy of Cardiosphere-Derived Cells in Humans and in a Mouse Model of Myocardial Infarction." *Journal of the*

American Heart Association 3(5).

- Cheng, Yunhui, Xiaobin Wang, Jian Yang, Xiaoxia Duan, Yi Yao, Xiaoling Shi, Zhuang Chen, Zhongcai Fan, Xiaojun Liu, Shanshan Qin, Xiaojun Tang, and Chunxiang Zhang. 2012. "A Translational Study of Urine miRNAs in Acute Myocardial Infarction." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 53(5):668–76.
- Cheruvanky, Anita, Hua Zhou, Trairak Pisitkun, Jeffrey B. Kopp, Mark A. Knepper, Peter S. T. Yuen, and Robert A. Star. 2007. "Rapid Isolation of Urinary Exosomal Biomarkers Using a Nanomembrane Ultrafiltration Concentrator." *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 292(5):F1657-61.
- Chimenti, Isotta, Rachel Ruckdeschel Smith, Tao Sheng Li, Gary Gerstenblith, Elisa Messina, Alessandro Giacomello, and Eduardo Marbán. 2010. "Relative Roles of Direct Regeneration versus Paracrine Effects of Human Cardiosphere-Derived Cells Transplanted into Infarcted Mice." *Circulation Research* 106(5):971–80.
- Chistiakov, Dimitry A., Alexander N. Orekhov, and Yuri V. Bobryshev. 2016. "Cardiac Extracellular Vesicles in Normal and Infarcted Heart." *International Journal of Molecular Sciences* 17(1):1–18.
- Chong, James J. H., Xiulan Yang, Creighton W. Don, Elina Minami, Yen Wen Liu, Jill J. Weyers, William M. Mahoney, Benjamin Van Biber, Savannah M. Cook, Nathan J. Palpant, Jay A. Gantz, James A. Fugate, Veronica Muskheli, G. Michael Gough, Keith W. Vogel, Cliff A. Astley, Charlotte E. Hotchkiss, Audrey Baldessari, Lil Pabon, Hans Reinecke, Edward A. Gill, Veronica Nelson, Hans Peter Kiem, Michael A. Laflamme, and Charles E. Murry. 2014a. "Human Embryonic-Stem-Cell-Derived Cardiomyocytes Regenerate Non-Human Primate Hearts." *Nature* 510(7504):273–77.
- Christianson, Helena C., Katrin J. Svensson, Toin H. Van Kuppevelt, Jin Ping Li, and Mattias Belting. 2013. "Cancer Cell Exosomes Depend on Cell-Surface Heparan Sulfate Proteoglycans for Their Internalization and Functional Activity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(43):17380–85.
- Chugh, Atul R., Garth Beache, John H. Loughran, Nathan Mewton, Julius B. Elmore, Jan Kajstura, Patroklos Pappas, Antone Tatoes, Marcus F. Stoddard, Joao A. C. Lima, Mark S. Slaughter, Piero Anversa, and Roberto Bolli. 2001. "Administration of Cardiac Stem Cells in Patients with Ischemic Cardiomyopathy (the SCIPIO Trial): Surgical Aspects and Interim Analysis of Myocardial Function and Viability by Magnetic Resonance." *Circulation* 126:1099-1109.
- Chung, Eugene S., Leslie Miller, Amit N. Patel, Russell David Anderson, Farrell O. Mendelsohn, Jay Traverse, Kevin H. Silver, Julia Shin, Gregory Ewald, Mary Jane Farr, Saif Anwaruddin, Francis Plat, Scott J. Fisher, Alexander T. Auwerter, Joseph M. Pastore, Rahul Aras, and Marc S. Penn. 2015. "Changes in Ventricular Remodelling and Clinical Status during the Year Following a Single Administration of Stromal Cell-Derived Factor-1 Non-Viral Gene Therapy in Chronic Ischaemic Heart Failure Patients: The STOP-HF Randomized Phase II Trial." *European Heart Journal* 36(33):2228–38.
- Claudia Bearzi, Marcello Rota, Toru Hosoda, Jochen Tillmanns, Angelo Nascimbene, Antonella De Angelis, Saori Yasuzawa-Amano, Irina Trofimova, Robert W. Siggins, Nicole LeCapitaine, Stefano Cascapera, Antonio P. Beltrami, David A. D'Alessandro, Elias Zias, Federico Quaini, Konrad Urbanek, Robert E. Michler, Roberto Bolli, Jan Kajstura, Annarosa Leri, and Piero Anversa 2007. "Human Cardiac Stem Cell" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(35):14068-14073.

- Clifford, David M., Sheila A. Fisher, Susan J. Brunskill, Carolyn Doree, Anthony Mathur, Suzanne Watt, and Enca Martin-Rendon. 2012. "Stem Cell Treatment for Acute Myocardial Infarction." in *Cochrane database of systematic reviews (Online)*. Vol. 2
- Collot, Mayeul, Pichandi Ashokkumar, Halina Anton, Emmanuel Boutant, Orestis Faklaris, Thierry Galli, Yves Mély, Lydia Danglot, and Andrey S. Klymchenko. 2019. "MemBright: A Family of Fluorescent Membrane Probes for Advanced Cellular Imaging and Neuroscience." *Cell Chemical Biology* 26(4):600-614.
- Colombo, Marina, Catarina Moita, Guillaume Van Niel, Joanna Kowal, James Vigneron, Philippe Benaroch, Nicolas Manel, Luis F. Moita, Clotilde Théry, and Graça Raposo. 2013. "Analysis of ESCRT Functions in Exosome Biogenesis, Composition and Secretion Highlights the Heterogeneity of Extracellular Vesicles." *Journal of Cell Science* 126(24):5553-65.
- Colombo, Marina, Graça Raposo, and Clotilde Théry. 2014. "Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 30(1):255-89.
- Corsten, Maarten F., Robert Dennert, Sylvia Jochems, Tatiana Kuznetsova, Yvan Devaux, Leon Hofstra, Daniel R. Wagner, Jan A. Staessen, Stephane Heymans, and Blanche Schroen. 2010. "Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 Reflect Myocardial Damage in Cardiovascular Disease." *Circulation: Cardiovascular Genetics* 3(6):499-506.
- Coumans, Frank A. W., Alain R. Brisson, Edit I. Buzas, Françoise Dignat-George, Esther E. E. Drees, Samir El-Andaloussi, Costanza Emanuelli, Aleksandra Gasecka, An Hendrix, Andrew F. Hill, Romaric Lacroix, Yi Lee, Ton G. Van Leeuwen, Nigel Mackman, Imre Mäger, John P. Nolan, Edwin Van Der Pol, D. Michiel Pegtel, Susmita Sahoo, Pia R. M. Siljander, Guus Sturk, Olivier De Wever, and Rienk Nieuwland. 2017. "Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles." *Circulation Research* 120(10):1632-48.
- Creemers, Esther, Jack Cleutjens, Jos Smits, Stephane Heymans, Lieve Moons, Désiré Collen, Mat Daemen, and Peter Carmeliet. 2000. "Disruption of the Plasminogen Gene in Mice Abolishes Wound Healing after Myocardial Infarction." *American Journal of pathology* 156(6):1865-1873.
- Crisostomo, Paul R., Yue Wang, Troy A. Markel, Meijing Wang, Tim Lahm, and Daniel R. Meldrum. 2008. "Human Mesenchymal Stem Cells Stimulated by TNF- α , LPS, or Hypoxia Produce Growth Factors by an NF κ B- but Not JNK-Dependent Mechanism." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 294(3):C675-82.
- Cunningham, Justine J., Thomas M. Ulbright, Martin F. Pera, and Leendert H. J. Looijenga. 2012. "Lessons from Human Teratomas to Guide Development of Safe Stem Cell Therapies." *Nature Biotechnology* 30(9):849-57.
- D'Uva, Gabriele, Alla Aharonov, Mattia Lauriola, David Kain, Yfat Yahalom-Ronen, Silvia Carvalho, Karen Weisinger, Elad Bassat, Dana Rajchman, Oren Yifa, Marina Lysenko, Tal Konfino, Julius Hegesh, Ori Brenner, Michal Neeman, Yosef Yarden, Jonathan Leor, Rachel Sarig, Richard P. Harvey, and Eldad Tzahor. 2015. "ERBB2 Triggers Mammalian Heart Regeneration by Promoting Cardiomyocyte Dedifferentiation and Proliferation." *Nature Cell Biology* 17(5):627-38.
- Dai, Wangde, Sharon L. Hale, Bradley J. Martin, Jin Qiang Kuang, Joan S. Dow, Loren E. Wold, and Robert A. Kloner. 2005. "Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Postinfarcted Rat Myocardium: Short-

- and Long-Term Effects." *Circulation* 112(2):214–23.
- Damhoff, Thomas C. and Martin R. Huecker. 2018. "Myocardial Infarction, Serum Markers." StatPearls Publishing.
- Davidson, Sean M., Jaime A. Riquelme, Kaloyan Takov, Jose M. Vicencio, Claire Boi-Doku, Vanessa Khoo, Christian Doreth, Dina Radenkovic, Sergio Lavandero, and Derek M. Yellon. 2018. "Cardioprotection Mediated by Exosomes Is Impaired in the Setting of Type II Diabetes but Can Be Rescued by the Use of Non-Diabetic Exosomes in Vitro." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 22(1):141–51.
- Davidson, Sean M., Kaloyan Takov, and Derek M. Yellon. 2017. "Exosomes and Cardiovascular Protection." *Cardiovascular Drugs and Therapy* 31(1):77–86.
- Davis, M. E., P. C. H. Hsieh, T. Takahashi, Q. Song, S. Zhang, R. D. Kamm, A. J. Grodzinsky, P. Anversa, and R. T. Lee. 2006. "Local Myocardial Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) Delivery with Biotinylated Peptide Nanofibers Improves Cell Therapy for Myocardial Infarction." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(21):8155-8160.
- Davis, Michael E., Patrick C. H. Hsieh, Alan J. Grodzinsky, and Richard T. Lee. 2005. "Custom Design of the Cardiac Microenvironment with Biomaterials." *Circulation Research* 97(1):8–15.
- Dawn, B., A. B. Stein, K. Urbanek, M. Rota, B. Whang, R. Rastaldo, D. Torella, X. L. Tang, A. Rezazadeh, J. Kajstura, A. Leri, G. Hunt, J. Varma, S. D. Prabhu, P. Anversa, and R. Bolli. 2005. "Cardiac Stem Cells Delivered Intravascularly Traverse the Vessel Barrier, Regenerate Infarcted Myocardium, and Improve Cardiac Function." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(10):3766-3771.
- DeBerge, Matthew, Xin Yi Yeap, Shirley Dehn, Shuang Zhang, Lubov Grigoryeva, Sol Misener, Daniel Procissi, Xin Zhou, Daniel C. Lee, William A. Muller, Xunrong Luo, Carla Rothlin, Ira Tabas, and Edward B. Thorp. 2017. "MerTK Cleavage on Resident Cardiac Macrophages Compromises Repair after Myocardial Ischemia Reperfusion Injury." *Circulation Research* 121(8):930–40.
- Debl, K., B. Djavidani, S. Buchner, C. Lipke, W. Nitz, S. Feuerbach, G. Riegger, and Andreas Luchner. 2006. "Delayed Hyperenhancement in Magnetic Resonance Imaging of Left Ventricular Hypertrophy Caused by Aortic Stenosis and Hypertrophic Cardiomyopathy: Visualisation of Focal Fibrosis." *Heart* 92(10):1447–51.
- DeGeorge, Brent R., Marc Rosenberg, Volker Eckstein, Erhe Gao, Nicole Herzog, Hugo A. Katus, Walter J. Koch, Norbert Frey, and Patrick Most. 2008. "BMP-2 and FGF-2 Synergistically Facilitate Adoption of a Cardiac Phenotype in Somatic Bone Marrow c-Kit+/Sca-1+ Stem Cells." *Clinical and Translational Science* 1(2):116–25.
- Devaux, Y., M. Mueller, P. Haaf, E. Goretti, R. Twerenbold, J. Zangrando, M. Vausort, T. Reichlin, K. Wildi, B. Moehring, D. R. Wagner, and C. Mueller. 2015. "Diagnostic and Prognostic Value of Circulating MicroRNAs in Patients with Acute Chest Pain." *Journal of Internal Medicine* 277(2):260–71.
- Devries, William C., Jeffrey L. Anderson, Lyle D. Joyce, Fred L. Anderson, Elizabeth H. Hammond, Robert K. Jarvik, and Willem J. Kolff. 1984. "Clinical Use of the Total Artificial Heart." *New England Journal of Medicine* 310(5):273–78.
- Dib, Nabil, Jonathan Dinsmore, Zaki Lababidi, Bee White, Susan Moravec, Ann Campbell, Amy Rosenbaum, Katayoun Seyedmadani, Wael A. Jaber, Craig S. Rizenhour, and Edward Diethrich. 2009. "One-Year Follow-Up of Feasibility and Safety of the First U.S., Randomized, Controlled Study Using 3-Dimensional Guided

- Catheter-Based Delivery of Autologous Skeletal Myoblasts for Ischemic Cardiomyopathy (CAuSMIC Study)." *JAAC: Cardiovascular Interventions* 2(1):9-16.
- Dib, Nabil, Robert E. Michler, Francis D. Pagani, Susan Wright, Dean J. Kereiakes, Rose Lengerich, Philip Binkley, Diane Buchele, Inder Anand, Cory Swingen, Marcelo F. Di Carli, James D. Thomas, Wael A. Jaber, Shaun R. Opie, Ann Campbell, Patrick McCarthy, Michael Yeager, Vasken Dilsizian, Bartley P. Griffith, Ronald Korn, Steven K. Kreuger, Marwan Ghazoul, W. Robb MacLellan, Gregg Fonarow, Howard J. Eisen, Jonathan Dinsmore, and Edward Diethrich. 2005. "Safety and Feasibility of Autologous Myoblast Transplantation in Patients with Ischemic Cardiomyopathy: Four-Year Follow-Up." *Circulation* 112(12):1748–55.
- Dixit, Parul and Rajesh Katara. 2015. "Challenges in Identifying the Best Source of Stem Cells for Cardiac Regeneration Therapy." *Stem Cell Research and Therapy* 6(1):26.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. C. Marini, D. S. Krause, R. J. Deans, A. Keating, D. J. Prockop, and E. M. Horwitz. 2006. "Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement." *Cytotherapy* 8(4):315–17.
- Duckers, Henricus J., Jaco Houtgraaf, Christoph Hehrlein, Joachim Schofer, Johannes Waltenberger, Anthony Gershlick, Jozef Bartunek, Christoph Nienaber, Carlos Macaya, Nicholas Peters, Peter Smits, Thomasz Siminiak, Walter Van Mieghem, Victor Legrand, and Patrick W. Serruys. 2011. "Final Results of a Phase IIa, Randomised, Open-Label Trial to Evaluate the Percutaneous Intramyocardial Transplantation of Autologous Skeletal Myoblasts in Congestive Heart Failure Patients: The SEISMIC Trial." *EuroIntervention* 6(7):805-812.
- Durcin, Maëva, Audrey Fleury, Emiliane Taillebois, Grégory Hilairet, Zuzana Krupova, Céline Henry, Sandrine Truchet, Martin Trötz Müller, Harald Köfeler, Guillaume Mabileau, Olivier Hue, Ramarason Andriantsitohaina, Patrice Martin, and Soazig Le Lay. 2017. "Characterisation of Adipocyte-Derived Extracellular Vesicle Subtypes Identifies Distinct Protein and Lipid Signatures for Large and Small Extracellular Vesicles." *Journal of Extracellular Vesicles* 6(1):1305677.
- Ellison, Georgina M., Valentina Galuppo, Carla Vicinanza, Iolanda Aquila, Cheryl D. Waring, Angelo Leone, Ciro Indolfi, and Daniele Torella. 2010. "Cardiac Stem and Progenitor Cell Identification: Different Markers for the Same Cell?" *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)* 2:641–52.
- Emanuelli, Costanza, Andrew I. U. Shearn, Gianni D. Angelini, and Susmita Sahoo. 2015. "Exosomes and Exosomal MiRNAs in Cardiovascular Protection and Repair." *Vascular Pharmacology* 71:24–30.
- Emanuelli, Costanza, Andrew I. U. Shearn, Abas Laftah, Francesca Fiorentino, Barnaby C. Reeves, Cristina Beltrami, Andrew Mumford, Aled Clayton, Mark Gurney, Saran Shantikumar, and Gianni D. Angelini. 2016. "Coronary Artery-Bypass-Graft Surgery Increases the Plasma Concentration of Exosomes Carrying a Cargo of Cardiac MicroRNAs: An Example of Exosome Trafficking out of the Human Heart with Potential for Cardiac Biomarker Discovery" edited by G. Qin. *PLoS ONE* 11(4):e0154274.
- Eschenhagen, Thomas, Roberto Bolli, Thomas Braun, Loren J. Field, Bernd K. Fleischmann, Jonas Frisén, Mauro Giacca, Joshua M. Hare, Steven Houser, Richard T. Lee, Eduardo Marbán, James F. Martin, Jeffery D. Molkenkin, Charles E. Murry, Paul R. Riley, Pilar Ruiz-Lozano, Hesham A. Sadek, Mark A. Sussman, and Joseph A. Hill. 2017. "Cardiomyocyte Regeneration: A Consensus Statement." *Circulation* 136(7):680–86.

- Escola, Jean Michel, Monique J. Kleijmeer, Willem Stoorvogel, Janice M. Griffith, Osamu Yoshie, and Hans J. Geuze. 1998. "Selective Enrichment of Tetraspan Proteins on the Internal Vesicles of Multivesicular Endosomes and on Exosomes Secreted by Human B-Lymphocytes." *Journal of Biological Chemistry* 273(32):20121–27.
- Eulalio, Ana, Miguel Mano, Matteo Dal Ferro, Lorena Zentilin, Gianfranco Sinagra, Serena Zacchigna, and Mauro Giacca. 2012. "Functional Screening Identifies MiRNAs Inducing Cardiac Regeneration." *Nature* 492(7429):376–81.
- Evans, M. J. and M. H. Kaufman. 1981. "Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos." *Nature* 292(5819):154–56.
- Farahmand, Patrick, Teresa Y. Y. Lai, Richard D. Weisel, Shafie Fazel, Terrence Yau, Philippe Menasche, and Ren Ke Li. 2008. "Skeletal Myoblasts Preserve Remote Matrix Architecture and Global Function When Implanted Early or Late after Coronary Ligation into Infarcted or Remote Myocardium." *Circulation* 118.
- Fedak, Paul W. M., Subodh Verma, Richard D. Weisel, and Ren Ke Li. 2005. "Cardiac Remodeling and Failure: From Molecules to Man (Part I)." *Cardiovascular Pathology* 14(1):1–11.
- Fernandes, Sarah, Jean Christophe Amirault, Gilles Lande, Jean Michel Nguyen, Virginie Forest, Olivier Bignolais, Guillaume Lamirault, Didier Heudes, Jean Luc Orsonneau, Marie Françoise Heymann, Flavien Charpentier, and Patricia Lemarchand. 2006. "Autologous Myoblast Transplantation after Myocardial Infarction Increases the Inducibility of Ventricular Arrhythmias." *Cardiovascular Research* 69(2):348–58.
- Fischbach, Michael A., Jeffrey A. Bluestone, and Wendell A. Lim. 2013. "Cell-Based Therapeutics: The next Pillar of Medicine." *Science Translational Medicine* 5(179).
- Fischer, Kimberlee M., Christopher T. Cottage, Weitao Wu, Shabana Din, Natalie A. Gude, Daniele Avitabile, Pearl Quijada, Brett L. Collins, Jenna Fransioli, and Mark A. Sussman. 2009. "Enhancement of Myocardial Regeneration through Genetic Engineering of Cardiac Progenitor Cells Expressing Pim-1 Kinase." *Circulation* 120(21):2077–87.
- Fitzner, Dirk, Mareike Schnaars, Denise Van Rossum, Gurumoorthy Krishnamoorthy, Payam Dibaj, Mostafa Bakhti, Tommy Regen, Uwe Karsten Hanisch, and Mikael Simons. 2011. "Selective Transfer of Exosomes from Oligodendrocytes to Microglia by Macropinocytosis." *Journal of Cell Science* 124(3):447–58.
- Foglio, Eleonora, Giovanni Puddighinu, Pasquale Fasanaro, Daniela D'Arcangelo, Giulietta A. Perrone, David Mocini, Ciro Campanella, Luigi Coppola, Mariantonia Logozzi, Tommaso Azzarito, Francesca Marzoli, Stefano Fais, Luisa Pieroni, Valeria Marzano, Antonia Germani, Maurizio C. Capogrossi, Matteo A. Russo, and Federica Limana. 2015. "Exosomal Clusterin, Identified in the Pericardial Fluid, Improves Myocardial Performance Following MI through Epicardial Activation, Enhanced Arteriogenesis and Reduced Apoptosis." *International Journal of Cardiology* 197:333–47.
- Fraser, John K., Isabella Wulur, Zeni Alfonso, and Marc H. Hedrick. 2006. "Fat Tissue: An Underappreciated Source of Stem Cells for Biotechnology." *Trends in Biotechnology* 24(4):150–54.
- Freyman, Toby, Glenn Polin, Hashim Osman, Jody Crary, Min Min Lu, Lan Cheng, Maria Palasis, and Robert L. Wilensky. 2006. "A Quantitative, Randomized Study Evaluating Three Methods of Mesenchymal Stem Cell Delivery Following Myocardial Infarction." *European Heart Journal* 27(9):1114–22.

- Fukushima, Satsuki, Steven R. Copen, Joon Lee, Kenichi Yamahara, Leanne E. Felkin, Cesare M. N. Terracciano, Paul J. R. Barton, Magdi H. Yacoub, and Ken Suzuki. 2008. "Choice of Cell-Delivery Route for Skeletal Myoblast Transplantation for Treating Post-Infarction Chronic Heart Failure in Rat." *PLoS ONE* 3(8).
- Funakoshi, Kodai, Mozhddeh Bagheri, Ming Zhou, Ryoji Suzuki, Hiroshi Abe, and Hideo Akashi. 2017. "Highly Sensitive and Specific Alu-Based Quantification of Human Cells among Rodent Cells." *Scientific Reports* 7(1).
- Gaertner, Roger, Damien Logeart, Jean-Baptiste Michel, and Jean-Jacques Mercadier. 2004. "Remodelage Précoce Du Ventricule Gauche Après Un Accident Coronarien Aigu." *Medecine/sciences* 20:643.
- Gallet, Romain, James Dawkins, Jackelyn Valle, Eli Simsolo, Geoffrey De Couto, Ryan Middleton, Eleni Tseliou, Daniel Luthringer, Michelle Kreke, Rachel R. Smith, Linda Marbán, Bijan Ghaleh, and Eduardo Marbán. 2017. "Exosomes Secreted by Cardiosphere-Derived Cells Reduce Scarring, Attenuate Adverse Remodelling, and Improve Function in Acute and Chronic Porcine Myocardial Infarction." *European Heart Journal* 38(3):201–11.
- Gallo, Simona, Valentina Sala, Stefano Gatti, and Tiziana Crepaldi. 2014. "HGF/Met Axis in Heart Function and Cardioprotection." *Biomedicines* 2(4):247–62.
- Gao, Lian R., Yu Chen, Ning K. Zhang, Xi L. Yang, Hui L. Liu, Zhi G. Wang, Xiao Y. Yan, Yu Wang, Zhi M. Zhu, Tian C. Li, Li H. Wang, Hai Y. Chen, Yun D. Chen, Chao L. Huang, Peng Qu, Chen Yao, Bin Wang, Guang H. Chen, Zhong M. Wang, Zhao Y. Xu, Jing Bai, Di Lu, Yan H. Shen, Feng Guo, Mu Y. Liu, Yong Yang, Yan C. Ding, Ye Yang, Hai T. Tian, Qing A. Ding, Li N. Li, Xin C. Yang, and Xiang Hu. 2015. "Intracoronary Infusion of Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells in Acute Myocardial Infarction: Double-Blind, Randomized Controlled Trial." *BMC Medicine* 13(1).
- Gao, Lian Ru, Ning K. Zhang, Qing A. Ding, Hai Y. Chen, Xiang Hu, Shu Jiang, Tian C. Li, Yu Chen, Zhi G. Wang, Yang Ye, and Zhi Ming Zhu. 2013. "Common Expression of Stemness Molecular Markers and Early Cardiac Transcription Factors in Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells and Embryonic Stem Cells." *Cell Transplantation* 22(10):1883–1900.
- Gao, Runlin, Jian Zhang, Liuquan Cheng, Xuesi Wu, Wei Dong, Xinchun Yang, Tianchang Li, Xifu Liu, Yabei Xu, Xinyan Li, and Mingdong Zhou. 2010. "A Phase II, Randomized, Double-Blind, Multicenter, Based on Standard Therapy, Placebo-Controlled Study of the Efficacy and Safety of Recombinant Human Neuregulin-1 in Patients with Chronic Heart Failure." *Journal of the American College of Cardiology* 55(18):1907–14.
- Garbayo, Elisa, Juan José Gavira, Manuel Garcia De Yebenes, Beatriz Pelacho, Gloria Abizanda, Hugo Lana, María José Blanco-Prieto, and Felipe Prosper. 2016. "Catheter-Based Intramyocardial Injection of FGF1 or NRG1-Loaded MPs Improves Cardiac Function in a Preclinical Model of Ischemia-Reperfusion." *Scientific Reports* 6.
- Garcia, Nahuel A., Javier Moncayo-Arandi, Pilar Sepulveda, and Antonio Diez-Juan. 2016. "Cardiomyocyte Exosomes Regulate Glycolytic Flux in Endothelium by Direct Transfer of GLUT Transporters and Glycolytic Enzymes." *Cardiovascular Research* 109(3):397–408.
- Gassmann, Martin, Franca Casagrande, Donata Orloli, Horst Simon, Cary Lai, Rüdiger Kleint, and Greg Lemke. 1995. "Aberrant Neural and Cardiac Development in Mice Lacking the ErbB4 Neuregulin Receptor." *Nature* 378(6555):390–94.

- Gavira, Juan J., Jesús Herreros, Ana Perez, María José Garcia-Velloso, Joaquín Barba, Francisco Martin-Herrero, Consuelo Cañizo, Ana Martin-Arnau, Josep M. Martí-Climent, Milagros Hernández, Natalia López-Holgado, José María González-Santos, Cándido Martín-Luengo, Eduardo Alegria, and Felipe Prósper. 2006. "Autologous Skeletal Myoblast Transplantation in Patients with Nonacute Myocardial Infarction: 1-Year Follow-Up." *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 131(4):799–804.
- Gavira, Juan José, Emilio Nasarre, Gloria Abizanda, Maitane Pérez-Ilzarbe, Alba De Martino-Rodriguez, José A. García De Jalón, Manuel Mazo, Alfonso Maclas, Ignacio García-Bolao, Beatriz Pelacho, Diego Martínez-Caro, and Felipe Prósper. 2010. "Repeated Implantation of Skeletal Myoblast in a Swine Model of Chronic Myocardial Infarction." *European Heart Journal* 31(8):1013–21.
- Gavira, Juan José, Maitane Perez-Ilzarbe, Gloria Abizanda, Alba García-Rodríguez, Josune Orbe, José Antonio Páramo, Miriam Belzunce, Gregorio Rábago, Joaquín Barba, Jesús Herreros, Angel Panizo, José A. Garcí. de Jalón, Diego Martínez-Caro, and Felipe Prósper. 2006. "A Comparison between Percutaneous and Surgical Transplantation of Autologous Skeletal Myoblasts in a Swine Model of Chronic Myocardial Infarction." *Cardiovascular Research* 71(4):744–53.
- Ge, Junbo, Y. Li, J. Qian, J. Shi, Q. Wang, Y. Niu, B. Fan, X. Liu, S. Zhang, A. Sun, and Y. Zou. 2006. "Efficacy of Emergent Transcatheter Transplantation of Stem Cells for Treatment of Acute Myocardial Infarction (TCT-STAMI)." *Heart* 92(12):1764–67.
- Genneback, Nina, Urban Hellman, Linus Malm, Göran Larsson, Gunnar Ronquist, Anders Waldenström, and Stellan Mörner. 2013. "Growth Factor Stimulation of Cardiomyocytes Induces Changes in the Transcriptional Contents of Secreted Exosomes." *Journal of Extracellular Vesicles* 2(1):20167.
- George, Jon C., Jonathan Goldberg, Matthew Joseph, Nasreen Abdulhameed, Joshua Crist, Hiranmoy Das, and Vincent J. Pompili. 2008. "Transvenous Intramyocardial Cellular Delivery Increases Retention in Comparison to Intracoronary Delivery in a Porcine Model of Acute Myocardial Infarction." *Journal of Interventional Cardiology* 21(5):424–31.
- Ghanem, Alexander, Caroline Steingen, Florian Brenig, Fabienne Funcke, Zhi Yong Bai, Christopher Hall, Chien Ting Chin, Georg Nickenig, Wilhelm Bloch, and Klaus Tiemann. 2009. "Focused Ultrasound-Induced Stimulation of Microbubbles Augments Site-Targeted Engraftment of Mesenchymal Stem Cells after Acute Myocardial Infarction." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 47(3):411–18.
- Ghostine, Saïd, Claire Carrion, Luiz César, Guarita Souza, Pascal Richard, Jean-thomas Vilquin, Bruno Pouzet, Ketty Schwartz, Philippe Menasché, Albert Alain Hagege, Patrick Bruneval, and Albert Alain Hage. 2002. "Long-Term Efficacy of Myoblast Transplantation On." *Circulation* 106:131-6.
- Gidlöf, Olof, Patrik Andersson, Jesper Van Der Pals, Matthias Götberg, and David Erlinge. 2011. "Cardiospecific MicroRNA Plasma Levels Correlate with Troponin and Cardiac Function in Patients with ST Elevation Myocardial Infarction, Are Selectively Dependent on Renal Elimination, and Can Be Detected in Urine Samples." *Cardiology* 118(4):217–26.
- Gilbert, Richard E. and Henry Krum. 2015. "Heart Failure in Diabetes: Effects of Anti-Hyperglycaemic Drug Therapy." *Lancet* 385:2107-2117.
- Glembotski, Christopher C. 2017. "Expanding the Paracrine Hypothesis of Stem Cell-Mediated Repair in the

- Heart: When the Unconventional Becomes Conventional." *Circulation Research* 120(5):772–74.
- Gnecchi, Massimiliano, Huamei He, Olin D. Liang, Luis G. Melo, Fulvio Morello, Hui Mu, Nicolas Noiseux, Lunan Zhang, Richard E. Pratt, Jeanne S. Ingwall, and Victor J. Dzau. 2005. "Paracrine Action Accounts for Marked Protection of Ischemic Heart by Akt-Modified Mesenchymal Stem Cells." *Nature Medicine* 11(4):367–68.
- Gnecchi, Massimiliano, Huamei He, Nicolas Noiseux, Olin D. Liang, Lunan Zhang, Fulvio Morello, Hui Mu, Luis G. Melo, Richard E. Pratt, Joanne S. Ingwall, and Victor J. Dzau. 2006. "Evidence Supporting Paracrine Hypothesis for Akt-Modified Mesenchymal Stem Cell-Mediated Cardiac Protection and Functional Improvement." *The FASEB Journal* 20(6):661–69.
- Gnecchi, Massimiliano, Zhiping Zhang, Aiguo Ni, and Victor J. Dzau. 2008. "Paracrine Mechanisms in Adult Stem Cell Signaling and Therapy." *Circulation Research* 103(11):1204–19.
- Gonzalez-King, Hernán, Nahuel A. García, Imelda Ontoria-Oviedo, María Ciria, José Anastasio Montero, and Pilar Sepúlveda. 2017. "Hypoxia Inducible Factor-1 α Potentiates Jagged 1-Mediated Angiogenesis by Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes." *Stem Cells* 35(7):1747–59.
- Goodell, Margaret A., Katja Brose, Glenn Paradis, A. Stewart Conner, and Richard C. Mulligan. 1996. "Isolation and Functional Properties of Murine Hematopoietic Stem Cells That Are Replicating In Vivo." *Journal of experimental medicine* 183:1797-1806.
- Greenberg, Barry, Alex Yaroshinsky, Krisztina M. Zsebo, Javed Butler, G. Michael Felker, Adriaan A. Voors, Jeffrey J. Rudy, Kim Wagner, and Roger J. Hajjar. 2014. "Design of a Phase 2b Trial of Intracoronary Administration of AAV1/SERCA2a in Patients With Advanced Heart Failure. The CUPID 2 Trial (Calcium Up-Regulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease Phase 2b)." *JACC: Heart Failure* 2(1):84–92.
- Gupta, Sanjiv and A. A. Knowlton. 2007. "HSP60 Trafficking in Adult Cardiac Myocytes: Role of the Exosomal Pathway." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 292(6):3052–56.
- Gupta, Shashi K., Claudia Bang, and Thomas Thum. 2010. "Circulating MicroRNAs as Biomarkers and Potential Paracrine Mediators of Cardiovascular Disease." *Circulation: Cardiovascular Genetics* 3(5):484–88.
- Hagège, Albert A., Jean Pierre Marolleau, Jean Thomas Vilquin, Armelle Alhérière, Séverine Peyrard, Denis Duboc, Eric Abergel, Emmanuel Messas, Elie Mousseaux, Ketty Schwartz, Michel Desnos, and Philippe Menasché. 2006. "Skeletal Myoblast Transplantation in Ischemic Heart Failure: Long-Term Follow-up of the First Phase I Cohort of Patients." *Circulation* 114.
- Hansson, Emil M., Mark E. Lindsay, and Kenneth R. Chien. 2009. "Regeneration Next: Toward Heart Stem Cell Therapeutics." *Cell Stem Cell* 5(4):364–77.
- Hare, Joshua M., Jay H. Traverse, Timothy D. Henry, Nabil Dib, Robert K. Strumpf, Steven P. Schulman, Gary Gerstenblith, Anthony N. DeMaria, Ali E. Denktas, Roger S. Gammon, James B. Hermiller, Mark A. Reisman, Gary L. Schaer, and Warren Sherman. 2009. "A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Dose-Escalation Study of Intravenous Adult Human Mesenchymal Stem Cells (Prochymal) After Acute Myocardial Infarction." *Journal of the American College of Cardiology* 54(24):2277–86.
- Hashimoto, Hisayuki, Eric N. Olson, and Rhonda Bassel-Duby. 2018. "Therapeutic Approaches for Cardiac Regeneration and Repair." *Nature Reviews Cardiology* 15(10):585–600.

- Hatzistergos, Konstantinos E., Henry Quevedo, Behzad N. Oskouei, Qinghua Hu, Gary S. Feigenbaum, Irene S. Margitich, Ramesh Mazhari, Andrew J. Boyle, Juan P. Zambrano, Jose E. Rodriguez, Raul Dulce, Pradip M. Pattany, David Valdes, Concepcion Revilla, Alan W. Heldman, Ian McNiece, and Joshua M. Hare. 2010. "Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Stimulate Cardiac Stem Cell Proliferation and Differentiation." *Circulation Research* 107(7):913–22.
- Haubner, Bernhard J., Johanna Schneider, Ulrich Schweigmann, Thomas Schuetz, Wolfgang Dichtl, Corinna Velik-Salchner, Joerg-I. Stein, and Josef M. Penninger. 2016. "Functional Recovery of a Human Neonatal Heart After Severe Myocardial Infarction." *Circulation Research* 118(2):216–21.
- He, Kun Lun, Geng Hua Yi, Warren Sherman, Hua Zhou, Ge Ping Zhang, Anguo Gu, Race Kao, Howard B. Haines, John Harvey, Eric Roos, Desmond White, Doris A. Taylor, Jie Wang, and Daniel Burkhoff. 2005. "Autologous Skeletal Myoblast Transplantation Improved Hemodynamics and Left Ventricular Function in Chronic Heart Failure Dogs." *Journal of Heart and Lung Transplantation* 24(11):1940–49.
- Hee Ryu, Ju, Il-Kwon Kim, Seung-Woo Cho, Myeong-Chan Cho, Kyung-Kuk Hwang, Hainan Piao, Shuguang Piao, Sang Hyun Lim, Yoo Sun Hong, Cha Yong Choi, Kyung Jong Yoo, and Byung-Soo Kim. 2005. "Implantation of Bone Marrow Mononuclear Cells Using Injectable Fibrin Matrix Enhances Neovascularization in Infarcted Myocardium." *Biomaterials* 26:319–26.
- Heidt, Timo, Gabriel Courties, Partha Dutta, Hendrik B. Sager, Matt Sebas, Yoshiko Iwamoto, Yuan Sun, Nicolas Da Silva, Peter Panizzi, Anja M. Van Der Lahn, Filip K. Swirski, Ralph Weissleder, and Matthias Nahrendorf. 2014. "Differential Contribution of Monocytes to Heart Macrophages in Steady-State and after Myocardial Infarction." *Circulation Research* 115(2):284–95.
- Henry, Timothy D., Lem Moyé, and Jay H. Traverse. 2016. "Consistently Inconsistent - Bone Marrow Mononuclear Stem Cell Therapy Following Acute Myocardial Infarction." *Circulation Research* 119(3):404–6.
- Hergenreider, Eduard, Susanne Heydt, Karine Tréguer, Thomas Boettger, Anton J. G. Horrevoets, Andreas M. Zeiher, Margot P. Scheffer, Achilleas S. Frangakis, Xiaoke Yin, Manuel Mayr, Thomas Braun, Carmen Urbich, Reinier A. Boon, and Stefanie Dimmeler. 2012. "Atheroprotective Communication between Endothelial Cells and Smooth Muscle Cells through miRNAs." *Nature Cell Biology* 14(3):249–56.
- Herrerosa, Jesús, Felipe Prósper, Ana Perez, Juan J. Gavira, María José Garcia-Velloso, Joaquín Barba, Pedro L. Sánchez, Consuelo Cañizo, Gregorio Rábago, Josep M. Martí-Climent, Milagros Hernández, Natalia López-Holgado, José María González-Santos, Cándido Martín-Luengo, and Eduardo Alegria. 2003. "Autologous Intramyocardial Injection of Cultured Skeletal Muscle-Derived Stem Cells in Patients with Non-Acute Myocardial Infarction." *European Heart Journal* 24(22):2012–20.
- Heslop, James A., Thomas G. Hammond, Iaria Santeramo, Agnès Tort Piella, Isabel Hopp, Jing Zhou, Roua Baty, Enrique I. Graziano, Bernabé Proto Marco, Alexis Caron, Patrik Sköld, Peter W. Andrews, Melissa A. Baxter, David C. Hay, Junnat Hamdam, Michaela E. Sharpe, Sara Patel, David R. Jones, Jens Reinhardt, Erik H. J. Danen, Uri Ben-David, Glyn Stacey, Petter Björquist, Jacqueline Piner, John Mills, Cliff Rowe, Giovanni Pellegrini, Swaminathan Sethu, Daniel J. Antoine, Michael J. Cross, Patricia Murray, Dominic P. Williams, Neil R. Kitteringham, Chris E. P. Goldring, and B. Kevin Park. 2015. "Concise Review: Workshop Review: Understanding and Assessing the Risks of Stem Cell-Based Therapies." *STEM CELLS Translational Medicine*

- 4(4):389–400.
- Hofmann, Michael, Kai C. Wollert, Gerd P. Meyer, Alix Menke, Lubomir Arseniev, Bernd Hertenstein, Arnold Ganser, Wolfram H. Knapp, and Helmut Drexler. 2005. “Monitoring of Bone Marrow Cell Homing into the Infarcted Human Myocardium.” *Circulation* 111(17):2198–2202.
- Hong, Kyung U., Qian Hong Li, Yiru Guo, Nikita S. Patton, Afsoon Mokhtar, Aruni Bhatnagar, and Roberto Bolli. 2013. “A Highly Sensitive and Accurate Method to Quantify Absolute Numbers of C-Kit+ Cardiac Stem Cells Following Transplantation in Mice.” *Basic Research in Cardiology* 108(3).
- Hong, Soon Jun, Dongming Hou, Todd J. Brinton, Brian Johnstone, Dongni Feng, Pamela Rogers, William F. Fearon, Paul Yock, and Keith L. March. 2014. “Intracoronary and Retrograde Coronary Venous Myocardial Delivery of Adipose-Derived Stem Cells in Swine Infarction Lead to Transient Myocardial Trapping with Predominant Pulmonary Redistribution.” *Catheterization and Cardiovascular Interventions* 83(1).
- Hou, Dongming, Eyas Al Shaykh Youssef, Todd J. Brinton, Ping Zhang, Pamela Rogers, Erik T. Price, Alan C. Yeung, Brian H. Johnstone, Paul G. Yock, and Keith L. March. 2005. “Radiolabeled Cell Distribution after Intramyocardial, Intracoronary, and Interstitial Retrograde Coronary Venous Delivery: Implications for Current Clinical Trials.” *Circulation* 112(9).
- Hsu, Chieh, Yuichi Morohashi, Shin Ichiro Yoshimura, Natalia Manrique-Hoyos, Sang Yong Jung, Marcel A. Lauterbach, Mostafa Bakhti, Mads Grønberg, Wiebke Möbius, Jeong Seop Rhee, Francis A. Barr, and Mikael Simons. 2010. “Regulation of Exosome Secretion by Rab35 and Its GTPase-Activating Proteins TBC1D10A-C.” *Journal of Cell Biology* 189(2):223–32.
- Hulot, Jean Sébastien, Joe Elie Salem, Alban Redheuil, Jean Philippe Collet, Shaïda Varnous, Patrick Jourdain, Damien Logeart, Estelle Gandjbakhch, Claude Bernard, Stéphane N. Hatem, Richard Isnard, Philippe Cluzel, Claude Le Feuvre, Pascal Leprince, Nadjib Hammoudi, François M. Lemoine, David Klatzmann, Eric Vicaut, Michel Komajda, Gilles Montalescot, Anne Marie Lompré, and Roger J. Hajjar. 2017. “Effect of Intracoronary Administration of AAV1/SERCA2a on Ventricular Remodelling in Patients with Advanced Systolic Heart Failure: Results from the AGENT-HF Randomized Phase 2 Trial.” *European Journal of Heart Failure* 19(11):1534–41.
- Ibrahim, Ahmed Gamal Eldin, Ke Cheng, and Eduardo Marbán. 2014. “Exosomes as Critical Agents of Cardiac Regeneration Triggered by Cell Therapy.” *Stem Cell Reports* 2(5):606–19.
- Ikonen, E. 2001. “Roles of Lipid Rafts in Membrane Transport.” *Current Opinion in Cell Biology* 13(4):470–77.
- Ince, Hüseyin, Michael Petzsch, Tim C. Rehders, Tushar Chatterjee, and Christoph A. Nienaber. 2004. “Transcatheter Transplantation of Autologous Skeletal Myoblasts in Postinfarction Patients With Severe Left Ventricular Dysfunction.” *Journal of Endovascular Therapy* 11(6):695–704.
- Invernici, Gloria, Silvia Cristini, Paolo Madeddu, Stefano Brock, Frank Spillmann, Pia Bernasconi, Cristina Cappelletti, Chiara Calatozzolo, Umberto Fascio, Gianluigi Bisleri, Claudio Muneretto, Giulio Alessandri, and Eugenio A. Parati. 2008. “Human Adult Skeletal Muscle Stem Cells Differentiate into Cardiomyocyte Phenotype in Vitro.” *Experimental Cell Research* 314(2):366–76.
- Jaski, Brian E., Mariell L. Jessup, Donna M. Mancini, Thomas P. Cappola, Daniel F. Pauly, Barry Greenberg, Kenneth Borow, Howard Dittrich, Krisztina M. Zsebo, and Roger J. Hajjar. 2009. “Calcium Upregulation by

- Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID Trial), a First-in-Human Phase 1/2 Clinical Trial." *Journal of Cardiac Failure* 15(3):171–81.
- Johnston, Peter V., Tetsuo Sasano, Kevin Mills, Robert Evers, Shuo Tsan Lee, Rachel Ruckdeschel Smith, Albert C. Lardo, Shenghan Lai, Charles Steenbergen, Gary Gerstenblith, Richard Lange, and Eduardo Marbán. 2009. "Engraftment, Differentiation, and Functional Benefits of Autologous Cardiosphere-Derived Cells in Porcine Ischemic Cardiomyopathy." *Circulation* 120(12):1075–83.
- Johnstone, R. M., M. Adam, J. R. Hammond, L. Orr, and C. Turbide. 1987. "Vesicle Formation during Reticulocyte Maturation. Association of Plasma Membrane Activities with Released Vesicles (Exosomes)." *The Journal of Biological Chemistry* 262(19):9412–20.
- de Jong, Olivier G., Marianne C. Verhaar, Yong Chen, Pieter Vader, Hendrik Gremmels, George Posthuma, Raymond M. Schiffelers, Marjan Gucek, and Bas W. M. van Balkom. 2012. "Cellular Stress Conditions Are Reflected in the Protein and RNA Content of Endothelial Cell-Derived Exosomes." *Journal of Extracellular Vesicles* 1(1).
- Jujo, Kentaro, Masaaki Ii, and Douglas W. Losordo. 2008. "Endothelial Progenitor Cells in Neovascularization of Infarcted Myocardium." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 45(4):530–44.
- Kajstura, Jan, Marcello Rota, Brian Whang, Stefano Cascapera, Toru Hosoda, Claudia Bearzi, Daria Nurzynska, Hideko Kasahara, Elias Zias, Massimiliano Bonafé, Bernardo Nadal-Ginard, Daniele Torella, Angelo Nascimbene, Federico Quaini, Konrad Urbanek, Annarosa Leri, and Piero Anversa. 2005. "Bone Marrow Cells Differentiate in Cardiac Cell Lineages after Infarction Independently of Cell Fusion." *Circulation Research* 96(1):127–37.
- Kalluri, Raghu and Valerie S. Lebleu. 2016. "Discovery of Double-Stranded Genomic DNA in Circulating Exosomes." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 81(1):275–80.
- Kalra, Hina, Christopher G. Adda, Michael Liem, Ching Seng Ang, Adam Mechler, Richard J. Simpson, Mark D. Hulett, and Suresh Mathivanan. 2013. "Comparative Proteomics Evaluation of Plasma Exosome Isolation Techniques and Assessment of the Stability of Exosomes in Normal Human Blood Plasma." *Proteomics* 13(22):3354–64.
- Kalra, Hina, Richard J. Simpson, Hong Ji, Elena Aikawa, Peter Altevogt, Philip Askenase, Vincent C. Bond, Francesc E. Borràs, Xandra Breakefield, Vivian Budnik, Edit Buzas, Giovanni Camussi, Aled Clayton, Emanuele Cocucci, Juan M. Falcon-Perez, Susanne Gabrielsson, Yong Song Gho, Dwijendra Gupta, H. C. Harsha, An Hendrix, Andrew F. Hill, Jameel M. Inal, Guido Jenster, Eva Maria Krämer-Albers, Sai Kiang Lim, Alicia Llorente, Jan Lötvall, Antonio Marcilla, Lucia Mincheva-Nilsson, Irina Nazarenko, Rienk Nieuwland, Esther N. M. Nolte-'t Hoen, Akhilesh Pandey, Tushar Patel, Melissa G. Piper, Stefano Pluchino, T. S. Keshav. Prasad, Lawrence Rajendran, Graca Raposo, Michel Record, Gavin E. Reid, Francisco Sánchez-Madrid, Raymond M. Schiffelers, Pia Siljander, Allan Stensballe, Willem Stoorvogel, Douglas Taylor, Clotilde Thery, Hadi Valadi, Bas W. M. van Balkom, Jesús Vázquez, Michel Vidal, Marca H. M. Wauben, María Yáñez-Mó, Margot Zoeller, and Suresh Mathivanan. 2012. "Vesiclepedia: A Compendium for Extracellular Vesicles with Continuous Community Annotation." *PLoS Biology* 10(12):e1001450.
- De Kam, P. J., G. L. Nicolosi, A. A. Voors, M. P. Van Den Berg, J. Brouwer, D. J. Van Veldhuisen, S. Barlera, A. P.

- Maggioni, P. Giannuzzi, P. L. Temporelli, R. Latini, and W. H. Van Gilst. 2002. "Prediction of 6 Months Left Ventricular Dilatation after Myocardial Infarction in Relation to Cardiac Morbidity and Mortality: Application of a New Dilatation Model to GISSI-3 Data." *European Heart Journal* 23(7):536–42.
- Kanda, Pushpinder and Darryl R. Davis. 2017. "Cellular Mechanisms Underlying Cardiac Engraftment of Stem Cells." *Expert Opinion on Biological Therapy* 17(9):1127–43.
- Kang, Kai, Ruilian Ma, Wenfeng Cai, Wei Huang, Christian Paul, Jialiang Liang, Yuhua Wang, Tiejun Zhao, Ha Won Kim, Meifeng Xu, Ronald W. Millard, Zhili Wen, and Yigang Wang. 2015. "Exosomes Secreted from CXCR4 Overexpressing Mesenchymal Stem Cells Promote Cardioprotection via Akt Signaling Pathway Following Myocardial Infarction." *Stem Cells International*.
- Karantalis, Vasileios, Ivonne Hernandez Schulman, Wayne Balkan, and Joshua M. Hare. 2015. "Allogeneic Cell Therapy." *Circulation Research* 116(1):12–15.
- Katarzyna, Rygiel. 2017. "Adult Stem Cell Therapy for Cardiac Repair in Patients After Acute Myocardial Infarction Leading to Ischemic Heart Failure: An Overview of Evidence from the Recent Clinical Trials." *Current Cardiology Reviews* 13(3):223–31.
- Kawamura, Masashi, Shigeru Miyagawa, Kenji Miki, Atsuhiko Saito, Satsuki Fukushima, Takahiro Higuchi, Takuji Kawamura, Toru Kuratani, Takashi Daimon, Tatsuya Shimizu, Teruo Okano, and Yoshiki Sawa. 2012. "Feasibility, Safety, and Therapeutic Efficacy of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocyte Sheets in a Porcine Ischemic Cardiomyopathy Model." *Circulation* 126(11).
- Kervadec, Anaïs, Valérie Bellamy, Nadia El Harane, Lousineh Arakélian, Valérie Vanneaux, Isabelle Cacciapuoti, Hany Nemetalla, Marie Cécile Périer, Hadi D. Toeg, Adèle Richart, Mathilde Lemitre, Min Yin, Xavier Loyer, Jérôme Larghero, Albert Hagège, Marc Ruel, Chantal M. Boulanger, Jean Sébastien Silvestre, Philippe Menasché, and Nisa K. E. Renault. 2016. "Cardiovascular Progenitor-Derived Extracellular Vesicles Recapitulate the Beneficial Effects of Their Parent Cells in the Treatment of Chronic Heart Failure." *Journal of Heart and Lung Transplantation* 35(6):795–807.
- Khan, Mohsin, Emily Nickoloff, Tatiana Abramova, Jennifer Johnson, Suresh Kumar Verma, Prasanna Krishnamurthy, Alexander Roy Mackie, Erin Vaughan, Venkata Naga Srikanth Garikipati, Cynthia Benedict, Veronica Ramirez, Erin Lambers, Aiko Ito, Erhe Gao, Sol Misener, Timothy Luongo, John Elrod, Gangjian Qin, Steven R. Houser, Walter J. Koch, and Raj Kishore. 2015. "Embryonic Stem Cell-Derived Exosomes Promote Endogenous Repair Mechanisms and Enhance Cardiac Function Following Myocardial Infarction." *Circulation Research* 117(1):52–64.
- Kilpinen, Lotta, Ulla Impola, Lotta Sankkila, Ilja Ritamo, Maria Aatonen, Sami Kilpinen, Jarno Tuimala, Leena Valmu, Jouko Levijoki, Piet Finckenberg, Pia Siljander, Esko Kankuri, Eero Mervaala, and Saara Laitinen. 2013. "Extracellular Membrane Vesicles from Umbilical Cord Blood-Derived MSC Protect against Ischemic Acute Kidney Injury, a Feature That Is Lost after Inflammatory Conditioning." *Journal of Extracellular Vesicles* 2(1):21927.
- Kim, Dae Won, Meaghan Staples, Kazutaka Shinozuka, Paolina Pantcheva, Sung Don Kang, and Cesar V. Borlongan. 2013. "Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: Phenotypic Characterization and Optimizing Their Therapeutic Potential for Clinical Applications." *International Journal of Molecular*

- Sciences* 14(6):11692–712.
- Kim, Myung Soo, Matthew J. Haney, Yuling Zhao, Vivek Mahajan, Irina Deygen, Natalia L. Klyachko, Eli Inskoe, Aleksandr Piroyan, Marina Sokolsky, Onyi Okolie, Shawn D. Hingtgen, Alexander V. Kabanov, and Elena V. Batrakova. 2016. "Development of Exosome-Encapsulated Paclitaxel to Overcome MDR in Cancer Cells." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 12(3):655–64.
- Kim, Paul J., Morteza Mahmoudi, Xiaohu Ge, Yuka Matsuura, Ildiko Toma, Scott Metzler, Nigel G. Kooreman, John Ramunas, Colin Holbrook, Michael V. McConnell, Helen Blau, Phillip Harnish, Eric Rulifson, and Phillip C. Yang. 2015. "Direct Evaluation of Myocardial Viability and Stem Cell Engraftment Demonstrates Salvage of the Injured Myocardium." *Circulation Research* 116(7):e40–50.
- King, Hamish W., Michael Z. Michael, and Jonathan M. Gleadle. 2012. "Hypoxic Enhancement of Exosome Release by Breast Cancer Cells." *BMC Cancer* 12:421.
- Kinnaird, Tim, E. Stabile, M. S. Burnett, C. W. Lee, S. Barr, S. Fuchs, and S. E. Epstein. 2004. "Marrow-Derived Stromal Cells Express Genes Encoding a Broad Spectrum of Arteriogenic Cytokines and Promote In Vitro and In Vivo Arteriogenesis Through Paracrine Mechanisms." *Circulation Research* 94(5):678–85.
- Koch, Sina and Lena Claesson-welsh. 2012. "Signal Transduction by VEGFRs.Pdf." (Stringer 2006):1–21.
- Kolios, George and Yuben Moodley. 2012. "Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine." *Respiration* 85(1):3–10.
- Korup, Eva, Dorthe Dalsgaard, Ole Nyvad, Thomas Møller Jensen, Egon Toft, and Jens Berning. 1997. *Comparison of Degrees of Left Ventricular Dilatation within Three Hours and up to Six Days after Onset of First Acute Myocardial Infarction*. 80(4):449-453.
- Kostrominova, Tatiana Y. 2011. "Application of WGA Lectin Staining for Visualization of the Connective Tissue in Skeletal Muscle, Bone, and Ligament/Tendon Studies." *Microscopy Research and Technique* 74(1):18–22.
- Kowal, Joanna, Guillaume Arras, Marina Colombo, Mabel Jouve, Jakob Paul Morath, Bjarke Primdal-Bengtson, Florent Dingli, Damarys Loew, Mercedes Tkach, and Clotilde Théry. 2016. "Proteomic Comparison Defines Novel Markers to Characterize Heterogeneous Populations of Extracellular Vesicle Subtypes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(8):968–77.
- Kraus, William E., Kelley A. Hutcheson, Doris A. Taylor, B. Zane Atkins, Cleveland W. Lewis, and Donald D. Glower. 1999. "Intracardiac Transplantation of Skeletal Myoblasts Yields Two Populations of Striated Cells in Situ." *Annals of Thoracic Surgery* 67(1):124-129.
- Kucharzewska, Paulina, Helena C. Christianson, Johanna E. Welch, Katrin J. Svensson, Erik Fredlund, Markus Ringné, Matthias Mörgelin, Erika Bourseau-Guilmain, Johan Bengzon, and Mattias Belting. 2013. "Exosomes Reflect the Hypoxic Status of Glioma Cells and Mediate Hypoxia-Dependent Activation of Vascular Cells during Tumor Development." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(18):7312–17.
- Kuehbacher, Angelika, Carmen Urbich, Andreas M. Zeiher, and Stefanie Dimmeler. 2007. "Role of Dicer and Drosha for Endothelial MicroRNA Expression and Angiogenesis." *Circulation Research* 101(1):59–68.
- Kuwabara, Yasuhide, Koh Ono, Takahiro Horie, Hitoo Nishi, Kazuya Nagao, Minako Kinoshita, Shin Watanabe, Osamu Baba, Yoji Kojima, Satoshi Shizuta, Masao Imai, Toshihiro Tamura, Toru Kita, and Takeshi Kimura.

2011. "Increased MicroRNA-1 and MicroRNA-133a Levels in Serum of Patients with Cardiovascular Disease Indicate Myocardial Damage." *Circulation: Cardiovascular Genetics* 4(4):446–54.
- Lacroix, R., C. Judicone, P. Poncellet, S. Robert, L. Arnaud, J. Sampol, and F. Dignat-George. 2012. "Impact of Pre-Analytical Parameters on the Measurement of Circulating Microparticles: Towards Standardization of Protocol." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 10(3):437–46.
- Lai, Ruenn Chai, Fatih Arslan, May May Lee, Newman Siu Kwan Sze, Andre Choo, Tian Sheng Chen, Manuel Salto-Tellez, Leo Timmers, Chuen Neng Lee, Reida Menshawe El Oakley, Gerard Pasterkamp, Dominique P. V. de Kleijn, and Sai Kiang Lim. 2010. "Exosome Secreted by MSC Reduces Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury." *Stem Cell Research* 4(3):214–22.
- Lamparski, Henry G., Anita Metha-Damani, Jenq Yuan Yao, Sanjay Patel, Di Hwei Hsu, Curtis Ruegg, and Jean Bernard Le Pecq. 2002. "Production and Characterization of Clinical Grade Exosomes Derived from Dendritic Cells." *Journal of Immunological Methods* 270(2):211–26.
- Laugwitz, K. L., A. Moretti, L. Caron, A. Nakano, and K. R. Chien. 2007. "Islet1 Cardiovascular Progenitors: A Single Source for Heart Lineages?" *Development* 135(2):193–205.
- Laugwitz, Karl Ludwig, Alessandra Moretti, Jason Lam, Peter Gruber, Yinhong Chen, Sarah Woodard, Li Zhu Lin, Chen Leng Cai, Min Min Lu, Michael Reth, Oleksandr Platoshyn, Jason X. J. Yuan, Sylvia Evans, and Kenneth B. Chien. 2005. "Postnatal Isl1+ Cardioblasts Enter Fully Differentiated Cardiomyocyte Lineages." *Nature* 433(7026):647–53.
- Laulagnier, Karine, Claude Motta, Safouane Hamdi, Sébastien Roy, Florence Fauvelle, Jean François Pageaux, Toshihide Kobayashi, Jean Pierre Salles, Bertrand Perret, Christian Bonnerot, and Michel Record. 2004. "Mast Cell- and Dendritic Cell-Derived Display a Specific Lipid Composition and an Unusual Membrane Organization." *Biochemical Journal* 380(1):161–71.
- Lavine, Kory J., Slava Epelman, Keita Uchida, Cassandra J. Weber, Colin G. Nichols, Joel D. Schilling, David M. Ornitz, Gwendalyn J. Randolph, and Douglas L. Mann. 2014. "Distinct Macrophage Lineages Contribute to Disparate Patterns of Cardiac Recovery and Remodeling in the Neonatal and Adult Heart." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(45):16029–34.
- Lee, Miyoung, Sang Young Jeong, Jueun Ha, Miyeon Kim, Hye Jin Jin, Soon Jae Kwon, Jong Wook Chang, Soo Jin Choi, Wonil Oh, Yoon Sun Yang, Jae Sung Kim, and Hong Bae Jeon. 2014. "Low Immunogenicity of Allogeneic Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells in Vitro and in Vivo." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 446(4):983–89.
- Lee, Shuo Tsan, Anthony J. White, Satoshi Matsushita, Konstantinos Malliaras, Charles Steenbergen, Yiqiang Zhang, Tao Sheng Li, John Terrovitis, Kristine Yee, Sinan Simsir, Raj Makkar, and Eduardo Marbán. 2011. "Intramyocardial Injection of Autologous Cardiospheres or Cardiosphere-Derived Cells Preserves Function and Minimizes Adverse Ventricular Remodeling in Pigs with Heart Failure Post-Myocardial Infarction." *Journal of the American College of Cardiology* 57(4):455–65.
- Leri, Annarosa, Jan Kajstura, and Piero Anversa. 2005. "Cardiac Stem Cells and Mechanisms of Myocardial Regeneration." *Physiological Reviews* 85(4):1373–1416.
- Li, Chuanwei, Fang Pei, Xiaoshan Zhu, Dayue D. Duan, and Chunyu Zeng. 2012. "Circulating MicroRNAs as Novel

- and Sensitive Biomarkers of Acute Myocardial Infarction." *Clinical Biochemistry* 45(10–11):727–32.
- Li, Qianhong, Yiru Guo, Qinghui Ou, Ning Chen, Wen Jian Wu, Fangping Yuan, Erin O'Brien, Tao Wang, Li Luo, Gregory N. Hunt, Xiaoping Zhu, and Roberto Bolli. 2011. "Intracoronary Administration of Cardiac Stem Cells in Mice: A New, Improved Technique for Cell Therapy in Murine Models." *Basic Research in Cardiology* 106(5):849–64.
- Li, Qiong, Baosheng Li, Xiaowei Wang, Annarosa Leri, Kumar P. Jana, Yu Liu, Jan Kajstura, Renato Baserga, and Piero Anversa. 1997. "Overexpression of Insulin-like Growth Factor-1 in Mice Protects from Myocyte Death after Infarction, Attenuating Ventricular Dilation, Wall Stress, and Cardiac Hypertrophy." *Journal of Clinical Investigation* 100(8):1991-1999.
- Li, Shengli, Yuchen Li, Bing Chen, Jingjing Zhao, Shulin Yu, Yan Tang, Qiupeng Zheng, Yan Li, Peng Wang, Xianghuo He, and Shenglin Huang. 2018. "ExoRBase: A Database of CircRNA, LncRNA and MRNA in Human Blood Exosomes." *Nucleic Acids Research* 46(D1):D106–12.
- Li, Song Pei, Zhong Xiao Lin, Xue Yan Jiang, and Xi Yong Yu. 2018. "Exosomal Cargo-Loading and Synthetic Exosome-Mimics as Potential Therapeutic Tools." *Acta Pharmacologica Sinica* 39(4):542–51.
- Li, Tao Sheng, Ke Cheng, Shuo Tsan Lee, Satoshi Matsushita, Darryl Davis, Konstantinos Malliaras, Yiqiang Zhang, Noriko Matsushita, Rachel Ruckdeschel Smith, and Eduardo Marbán. 2010. "Cardiospheres Recapitulate a Niche-like Microenvironment Rich in Stemness and Cell-Matrix Interactions, Rationalizing Their Enhanced Functional Potency for Myocardial Repair." *Stem Cells* 28(11):2088–98.
- Li, Tao Sheng, Ke Cheng, Konstantinos Malliaras, Rachel Ruckdeschel Smith, Yiqiang Zhang, Baiming Sun, Noriko Matsushita, Agnieszka Blusztajn, John Terrovitis, Hideo Kusuoka, Linda Marbán, and Eduardo Marbán. 2012. "Direct Comparison of Different Stem Cell Types and Subpopulations Reveals Superior Paracrine Potency and Myocardial Repair Efficacy with Cardiosphere-Derived Cells." *Journal of the American College of Cardiology* 59(10):942–53.
- Li, Wenzhong, Nan Ma, Lee-Lee Ong, Catharina Nesselmann, Christian Klopsch, Yury Ladilov, Dario Furlani, Christoph Piechaczek, Jeannette M. Moebius, Karola Lützwow, Andreas Lendlein, Christof Stamm, Ren-Ke Li, and Gustav Steinhoff. 2007. "Bcl-2 Engineered MSCs Inhibited Apoptosis and Improved Heart Function." *Stem Cells* 25(8):2118–27.
- Li, Yan, Qiupeng Zheng, Chunyang Bao, Shuyi Li, Weijie Guo, Jiang Zhao, Di Chen, Jianren Gu, Xianghuo He, and Shenglin Huang. 2015. "Circular RNA Is Enriched and Stable in Exosomes: A Promising Biomarker for Cancer Diagnosis." *Cell Research* 25(8):981–84.
- Lima, João A. C., Robert M. Judd, Ann Bazille, Steven P. Schulman, Ergin Atalar, and Elias A. Zerhouni. 1995. "Regional Heterogeneity of Human Myocardial Infarcts Demonstrated by Contrast-Enhanced MRI: Potential Mechanisms." *Circulation* 92(5):1117–25.
- Linke, A., P. Muller, D. Nurzynska, C. Casarsa, D. Torella, A. Nascimbene, C. Castaldo, S. Cascapera, M. Bohm, F. Quaini, K. Urbanek, A. Leri, T. H. Hintze, J. Kajstura, and P. Anversa. 2005. "Stem Cells in the Dog Heart Are Self-Renewing, Clonogenic, and Multipotent and Regenerate Infarcted Myocardium, Improving Cardiac Function." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(25):8966-8971.
- Liu, Jen Fu, Bao Wei Wang, Huei Fong Hung, Hang Chang, and Kou Gi Shyu. 2008. "Human Mesenchymal Stem

- Cells Improve Myocardial Performance in a Splenectomized Rat Model of Chronic Myocardial Infarction.” *Journal of the Formosan Medical Association* 107(2):165–74.
- Liu, Ning and Eric N. Olson. 2010. “MicroRNA Regulatory Networks in Cardiovascular Development.” *Developmental Cell* 18(4):510–25.
- Liu, Xiaojun, Junjie Xiao, Han Zhu, Xin Wei, Colin Platt, Federico Damilano, Chunyang Xiao, Vassilios Bezzerides, Pontus Boström, Lin Che, Chunxiang Zhang, Bruce M. Spiegelman, and Anthony Rosenzweig. 2015. “MiR-222 Is Necessary for Exercise-Induced Cardiac Growth and Protects against Pathological Cardiac Remodeling.” *Cell Metabolism* 21(4):584–95.
- Llorente, Alicia, Tore Skotland, Tuulia Sylvänne, Dimple Kauhanen, Tomasz Róg, Adam Orłowski, Ilpo Vattulainen, Kim Ekroos, and Kirsten Sandvig. 2013. “Molecular Lipidomics of Exosomes Released by PC-3 Prostate Cancer Cells.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1831(7):1302–9.
- Lobo Filho, Herald Guedis, Nestor Lemos Ferreira, Rafael Bezerra de Sousa, Eduardo Rebouças de Carvalho, Patrícia Leal Dantas Lobo, and José Glauco Lobo Filho. 2011. “Modelo Experimental de Infarto Do Miocárdio Induzido Por Isoproterenol Em Ratos.” *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular* 26(3):469–76.
- Lopaschuk, Gary D. 2017. “Metabolic Modulators in Heart Disease: Past, Present, and Future.” *Canadian Journal of Cardiology* 33(7):838–49.
- Lorant, Judith, Charlotte Saury, Cindy Schleder, Florence Robriquet, Blandine Lieubeau, Elisa Négroni, Isabelle Leroux, Lucie Chabrand, Sabrina Viau, Candice Babarit, Mireille Ledevin, Laurence Dubreil, Antoine Hamel, Armelle Magot, Chantal Thorin, Laëtitia Guevel, Bruno Delorme, Yann Péréon, Gillian Butler-Browne, Vincent Mouly, and Karl Rouger. 2018. “Skeletal Muscle Regenerative Potential of Human MuStem Cells Following Transplantation into Injured Mice Muscle.” *Molecular Therapy* 26(2):618–33.
- Louapre, Pamela, Jean F. Grongnet, Robert M. Tanguay, and Jean C. David. 2005. “Effects of Hypoxia on Stress Proteins in the Piglet Heart at Birth.” *Cell Stress and Chaperones* 10(1):17–23.
- Lui, Kathy O., Lior Zangi, Eduardo A. Silva, Lei Bu, Makoto Sahara, Ronald A. Li, David J. Mooney, and Kenneth R. Chien. 2013. “Driving Vascular Endothelial Cell Fate of Human Multipotent Isl1 + Heart Progenitors with VEGF Modified mRNA.” *Cell Research* 23(10):1172–86.
- Ma, Teng, Jiacheng Sun, Zhenao Zhao, Wei Lei, Yueqiu Chen, Xu Wang, Junjie Yang, and Zhenya Shen. 2017. “A Brief Review: Adipose-Derived Stem Cells and Their Therapeutic Potential in Cardiovascular Diseases.” *Stem Cell Research and Therapy* 8(1).
- Madigan, Mariah and Rony Atoui. 2018. “Therapeutic Use of Stem Cells for Myocardial Infarction.” *Bioengineering* 5(2):28.
- Madonna, Rosalinda, Peter Ferdinandy, Raffaele De Caterina, James T. Willerson, and Ali J. Marian. 2014. “Recent Developments in Cardiovascular Stem Cells.” *Circulation Research* 115(12):71–78.
- Madonna, Rosalinda, Linda W. Van Laake, Hans Erik Botker, Sean M. Davidson, Raffaele De Caterina, Felix B. Engel, Thomas Eschenhagen, Francesco Fernandez-Aviles, Derek J. Hausenloy, Jean Sebastien Hulot, Sandrine Lecour, Jonathan Leor, Philippe Menasché, Maurizio Pesce, Cinzia Perrino, Fabrice Prunier, Sophie Van Linthout, Kirsti Ytrehus, Wolfram Hubertus Zimmermann, Peter Ferdinandy, and Joost P. G. Sluijter. 2019. “ESC Working Group on Cellular Biology of the Heart: Position Paper for Cardiovascular Research:

- Tissue Engineering Strategies Combined with Cell Therapies for Cardiac Repair in Ischaemic Heart Disease and Heart Failure." *Cardiovascular Research* 115(3):488–500.
- Madonna, Rosalinda, Linda W. Van Laake, Sean M. Davidson, Felix B. Engel, Derek J. Hausenloy, Sandrine Lecour, Jonathan Leor, Cinzia Perrino, Rainer Schulz, Kirsti Ytrehus, Ulf Landmesser, Christine L. Mummery, Stefan Janssens, James Willerson, Thomas Eschenhagen, Pter Ferdinandy, and Joost P. G. Sluijter. 2016. "Position Paper of the European Society of Cardiology Working Group Cellular Biology of the Heart: Cell-Based Therapies for Myocardial Repair and Regeneration in Ischemic Heart Disease and Heart Failure." *European Heart Journal* 37(23):1789–98.
- Makkar, Raj R., Rachel R. Smith, Ke Cheng, Konstantinos Malliaras, Louise E. J. Thomson, Daniel Berman, Lawrence S. C. Czer, Linda Marbán, Adam Mendizabal, Peter V. Johnston, Stuart D. Russell, Karl H. Schuleri, Albert C. Lardo, Gary Gerstenblith, and Eduardo Marbán. 2012. "Intracoronary Cardiosphere-Derived Cells for Heart Regeneration after Myocardial Infarction (CADUCEUS): A Prospective, Randomised Phase 1 Trial." *The Lancet* 379(9819):895–904.
- Malizia, Andrea P. and Da Zhi Wang. 2011. "MicroRNAs in Cardiomyocyte Development." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* 3(2):183–90.
- Malliaras, Konstantinos, Tao Sheng Li, Daniel Luthringer, John Terrovitis, Ke Cheng, Tarun Chakravarty, Giselle Galang, Yiqiang Zhang, Florian Schoenhoff, Jennifer Van Eyk, Linda Marbán, and Eduardo Marbán. 2012. "Safety and Efficacy of Allogeneic Cell Therapy in Infarcted Rats Transplanted with Mismatched Cardiosphere-Derived Cells." *Circulation* 125(1):100–112.
- Malliaras, Konstantinos, Yiqiang Zhang, Jeffrey Seinfeld, Giselle Galang, Eleni Tseliou, Ke Cheng, Baiming Sun, Mohammad Aminzadeh, and Eduardo Marbán. 2013. "Cardiomyocyte Proliferation and Progenitor Cell Recruitment Underlie Therapeutic Regeneration after Myocardial Infarction in the Adult Mouse Heart." *EMBO Molecular Medicine* 5(2):191–209.
- Mannu, Gurdeep Singh. 2014. "The Non-Cardiac Use and Significance of Cardiac Troponins." *Scottish Medical Journal* 59(3):172–78.
- Mansour, Samer, Denis-Claude Roy, Vincent Bouchard, Louis Mathieu Stevens, Francois Gobeil, Alain Rivard, Guy Leclerc, François Reeves, and Nicolas Noiseux. 2011. "One-Year Safety Analysis of the COMPARE-AMI Trial: Comparison of Intracoronary Injection of CD133 + Bone Marrow Stem Cells to Placebo in Patients after Acute Myocardial Infarction and Left Ventricular Dysfunction ." *Bone Marrow Research* 2011:1–6.
- Marc A. Pfeffer, Janice M. Pfeffer, Michael C. Fishbein, Peter J. Fletcher, Eugene Braunwald, Joel Spadaro and Robert A. Kloner. 1979. "Myocardial Infarct Size and Ventricular Function in Rats." *Circulation Research* 44:503-512.
- Markel, Troy A., Yue Wang, Jeremy L. Herrmann, Paul R. Crisostomo, Meijing Wang, Nathan M. Novotny, Christine M. Herring, Jiangning Tan, Tim Lahm, and Daniel R. Meldrum. 2008. "VEGF Is Critical for Stem Cell-Mediated Cardioprotection and a Crucial Paracrine Factor for Defining the Age Threshold in Adult and Neonatal Stem Cell Function." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 295(6):2308-14.
- Marleau, Annette M., Chien Shing Chen, James A. Joyce, and Richard H. Tullis. 2012. "Exosome Removal as a Therapeutic Adjuvant in Cancer." *Journal of Translational Medicine* 10(1):134.

- Martin, Cindy M., Annette P. Meeson, Scott M. Robertson, Thomas J. Hawke, James A. Richardson, Susan Bates, Sean C. Goetsch, Teresa D. Gallardo, and Daniel J. Garry. 2004. "Persistent Expression of the ATP-Binding Cassette Transporter, *Abcg2*, Identifies Cardiac SP Cells in the Developing and Adult Heart." *Developmental Biology* 265(1):262–75.
- Mathieu, Myrielle, Jozef Bartunek, Bachar El Oumeiri, Karim Touihri, Ielham Hadad, Philippe Thoma, Thierry Metens, Agnes Mendes da Costa, Maryam Mahmoudabady, Dominique Egrise, Didier Blocklet, Naïma Mazouz, Robert Naeije, Guy Heyndrickx, and Kathleen McEntee. 2009. "Cell Therapy with Autologous Bone Marrow Mononuclear Stem Cells Is Associated with Superior Cardiac Recovery Compared with Use of Nonmodified Mesenchymal Stem Cells in a Canine Model of Chronic Myocardial Infarction." *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 138(3):646–53.
- Mathivanan, Suresh, Cassie J. Fahner, Gavin E. Reid, and Richard J. Simpson. 2012. "ExoCarta 2012: Database of Exosomal Proteins, RNA and Lipids." *Nucleic Acids Research* 40(D1):D1241–44.
- Mathiyalagan, Prabhu, Yaxuan Liang, David Kim, Sol Misener, Tina Thorne, Christine E. Kamide, Ekaterina Klyachko, Douglas W. Losordo, Roger J. Hajjar, and Susmita Sahoo. 2017. "Angiogenic Mechanisms of Human CD34+ Stem Cell Exosomes in the Repair of Ischemic Hindlimb." *Circulation Research* 120(9):1466–76.
- Matsuura, Katsuhisa, Atsushi Honda, Toshio Nagai, Noritoshi Fukushima, Koji Iwanaga, Masakuni Tokunaga, Tatsuya Shimizu, Teruo Okano, Hiroshi Kasanuki, Nobuhisa Hagiwara, and Issei Komuro. 2009. "Transplantation of Cardiac Progenitor Cells Ameliorates Cardiac Dysfunction after Myocardial Infarction in Mice." *Journal of Clinical Investigation* 119(8):2204–17.
- Matsuura, Katsuhisa, Toshio Nagai, Nobuhiro Nishigaki, Tomomi Oyama, Junichiro Nishi, Hiroshi Wada, Masanori Sano, Haruhiro Toko, Hiroshi Akazawa, Toshiaki Sato, Haruaki Nakaya, Hiroshi Kasanuki, and Issei Komuro. 2004. "Adult Cardiac Sca-1-Positive Cells Differentiate into Beating Cardiomyocytes." *Journal of Biological Chemistry* 279(12):11384–91.
- Matsuzaka, Yasunari, Jun Tanihata, Hirofumi Komaki, Akihiko Ishiyama, Yasushi Oya, Urs Rüegg, Shin Ichi Takeda, and Kazuo Hashido. 2016. "Characterization and Functional Analysis of Extracellular Vesicles and Muscle-Abundant miRNAs (miR-1, miR-133a, and miR-206) in C2 C12 Myocytes and Mdx Mice." *PLoS ONE* 11(12).
- Mauro, A. 1961. "Satellite Cell of Skeletal Muscle Fibers." *The Journal of Cell Biology* 9(2):493-495.
- Mazhari, Ramesh and Joshua M. Hare. 2007. "Mechanisms of Action of Mesenchymal Stem Cells in Cardiac Repair: Potential Influences on the Cardiac Stem Cell Niche." *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* 4:21–26.
- Mazo, Manuel, Juan José Gavira, Gloria Abizanda, Cristina Moreno, Margarita Eca, Mario Soriano, Pablo Aranda, María Collantes, Eduardo Alegría, Juana Merino, Iván Peñuelas, José Manuel García Verdugo, Beatriz Pelacho, and Felipe Prósper. 2010. "Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Exerts a Greater Long-Term Effect than Bone Marrow Mononuclear Cells in a Chronic Myocardial Infarction Model in Rat." *Cell Transplantation* 19(3):313–28.
- McGough, Ian John and Jean Paul Vincent. 2016. "Exosomes in Developmental Signalling." *Development (Cambridge)* 143(14):2482–93.

- McVeigh, Elliot R., João A. C. Lima, Jacques A. Melin, David A. Bluemke, Toshiya Furuta, Scott B. Reeder, Carlos E. Rochitte, and Lewis C. Becker. 2012. "Magnitude and Time Course of Microvascular Obstruction and Tissue Injury After Acute Myocardial Infarction." *Circulation* 98(10):1006-1014.
- Mehta, Laxmi S., Theresa M. Beckie, Holli A. DeVon, Cindy L. Grines, Harlan M. Krumholz, Michelle N. Johnson, Kathryn J. Lindley, Viola Vaccarino, Tracy Y. Wang, Karol E. Watson, and Nanette K. Wenger. 2016. "Acute Myocardial Infarction in Women : A Scientific Statement from the American Heart Association." *Circulation* 133(9):916–47.
- Memon, Imran A., Yoshiki Sawa, Shigeru Miyagawa, Satoshi Taketani, and Hikaru Matsuda. 2005. "Combined Autologous Cellular Cardiomyoplasty with Skeletal Myoblasts and Bone Marrow Cells in Canine Hearts for Ischemic Cardiomyopathy." *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 130(3):646–53.
- Menasche, Philippe. 2011. "Cardiac Cell Therapy: Lessons from Clinical Trials." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 50(2):258–65.
- Menasché, Philippe. 2004. "Myoblast Transfer in Heart Failure." *Surgical Clinics of North America* 84(1):125–39.
- Menasché, Philippe, Ottavio Alfieri, Stefan Janssens, William McKenna, Hermann Reichenspurner, Ludovic Trinquart, Jean Thomas Vilquin, Jean Pierre Marolleau, Barbara Seymour, Jérôme Larghero, Stephen Lake, Gilles Chatellier, Scott Solomon, Michel Desnos, and Albert A. Hagège. 2008. "The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) Trial: First Randomized Placebo-Controlled Study of Myoblast Transplantation." *Circulation* 117(9):1189–1200.
- Menasché, Philippe, Albert A. Hagège, Marcio Scorsin, Bruno Pouzet, Michel Desnos, Denis Duboc, Ketty Schwartz, Jean-Thomas Vilquin, and Jean-Pierre Marolleau. 2001. "Myoblast Transplantation for Heart Failure." *The Lancet* 357.
- Menasché, Philippe, Albert A. Hagège, Jean-Thomas Vilquin, Michel Desnos, Eric Abergel, Bruno Pouzet, Alain Bel, Sorin Sarateanu, Marcio Scorsin, Ketty Schwartz, Patrick Bruneval, Marc Benbunan, Jean-Pierre Marolleau, Denis Duboc, and France Orsay. 2003. "Autologous Skeletal Myoblast Transplantation for Severe Postinfarction Left Ventricular Dysfunction." *Journal of the American College of Cardiology* 41(7):1078–83.
- Menasché, Philippe, Valérie Vanneaux, Albert Hagège, Alain Bel, Bernard Cholley, Isabelle Cacciapuoti, Alexandre Parouchev, Nadine Benhamouda, Gérard Tachdjian, Lucie Tosca, Jean Hugues Trouvin, Jean Roch Fabreguettes, Valérie Bellamy, Romain Guillemain, Caroline Suberbielle Boissel, Eric Tartour, Michel Desnos, and Jérôme Larghero. 2015. "Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiac Progenitors for Severe Heart Failure Treatment: First Clinical Case Report." *European Heart Journal* 36(30):2011–17.
- Menasché, Philippe, Valérie Vanneaux, Albert Hagège, Alain Bel, Bernard Cholley, Alexandre Parouchev, Isabelle Cacciapuoti, Reem Al-Daccak, Nadine Benhamouda, Hélène Blons, Onnik Agbulut, Lucie Tosca, Jean Hugues Trouvin, Jean Roch Fabreguettes, Valérie Bellamy, Dominique Charron, Eric Tartour, Gérard Tachdjian, Michel Desnos, and Jérôme Larghero. 2018. "Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiovascular Progenitors for Severe Ischemic Left Ventricular Dysfunction." *Journal of the American College of Cardiology* 71(4):429–38.
- Ménoret, Séverine, Laure Hélène Ouisse, Laurent Tesson, Frédéric Delbos, Delphine Garnier, Séverine Remy,

- Claire Usal, Jean Paul Concordet, Carine Giovannangeli, Vanessa Chenouard, Lucas Brusselle, Emmanuel Merieau, Véronique Nerrière-Daguin, Franck Duteille, Frédérique Bellier-Waast, Alexandre Fraichard, Tuan H. Nguyen, and Ignacio Anegon. 2018. "Generation of Immunodeficient Rats With Rag1 and Il2rg Gene Deletions and Human Tissue Grafting Models." *Transplantation* 102(8):1271–78.
- Merchant, Michael L., David W. Powell, Daniel W. Wilkey, Timothy D. Cummins, Jeroen K. Deegens, Ilse M. Rood, K. Jill McAfee, Cornelia Fleischer, Elias Klein, and Jon B. Klein. 2010. "Microfiltration Isolation of Human Urinary Exosomes for Characterization by MS." *Proteomics - Clinical Applications* 4(1):84–96.
- Messina, Elisa, Luciana De Angelis, Giacomo Frati, Stefania Morrone, Stefano Chimenti, Fabio Fiordaliso, Monica Salio, Massimo Battaglia, Michael V. G. Latronico, Marcello Coletta, Elisabetta Vivarelli, Luigi Frati, Giulio Cossu, and Alessandro Giacomello. 2004. "Isolation and Expansion of Adult Cardiac Stem Cells from Human and Murine Heart." *Circulation Research* 95(9):911–21.
- Micheu, Miruna Mihaela and Maria Dorobantu. 2017. "Fifteen Years of Bone Marrow Mononuclear Cell Therapy in Acute Myocardial Infarction." *World Journal of Stem Cells* 9(4):68.
- Minciacchi, Valentina R., Michael R. Freeman, and Dolores Di Vizio. 2015. "Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes." *Seminars in Cell and Developmental Biology* 40:41–51.
- Mitchell, A. J., E. Sabondjian, J. Sykes, L. Deans, W. Zhu, X. Lu, Q. Feng, F. S. Prato, and G. Wisenberg. 2010. "Comparison of Initial Cell Retention and Clearance Kinetics After Subendocardial or Subepicardial Injections of Endothelial Progenitor Cells in a Canine Myocardial Infarction Model." *Journal of Nuclear Medicine* 51(3):413–17.
- Mitchelson, Keith Richard. 2015. "Roles of the Canonical MyomiRs MiR-1, -133 and -206 in Cell Development and Disease." *World Journal of Biological Chemistry* 6(3):162.
- Mocchetti, Tiziano, Annarosa Leri, Polina Goichberg, Marcello Rota, and Piero Anversa. 2015. "A Novel Class of Human Cardiac Stem Cells." *Cardiology in Review* 23(4):189–200.
- Momen-Heravi, Fatemeh, Leonora Balaj, Sara Alian, Alexander J. Trachtenberg, Fred H. Hochberg, Johan Skog, and Winston Patrick Kuo. 2012. "Impact of Biofluid Viscosity on Size and Sedimentation Efficiency of the Isolated Microvesicles." *Frontiers in Physiology* 162.
- Moore, Alastair, Harold Goerne, Prabhakar Rajiah, Yuki Tanabe, Sachin Saboo, and Suhny Abbara. 2019. "Acute Myocardial Infarct." *Radiologic Clinics of North America* 57(1):45–55.
- Moore, Ryan A., Angela Lorts, Peace C. Madueme, Michael D. Taylor, and David L. S. Morales. 2016. "Virtual Implantation of the 50cc SynCardia Total Artificial Heart." *Journal of Heart and Lung Transplantation* 35(6):824–27.
- Morelli, Adrian E., Adriana T. Larregina, William J. Shufesky, Mara L. G. Sullivan, Donna Beer Stolz, Glenn D. Papworth, Alan F. Zahorchak, Alison J. Logar, Zhiliang Wang, Simon C. Watkins, Louis D. Faló, and Angus W. Thomson. 2004. "Endocytosis, Intracellular Sorting, and Processing of Exosomes by Dendritic Cells." *Blood* 104(10):3257–66.
- Morrison, E. E., M. A. Bailey, and J. W. Dear. 2016. "Renal Extracellular Vesicles: From Physiology to Clinical Application." *Journal of Physiology* 594(20):5735–48.

- Mulcahy, Laura Ann, Ryan Charles Pink, and David Raul Francisco Carter. 2014. "Routes and Mechanisms of Extracellular Vesicle Uptake." *Journal of Extracellular Vesicles* 3(1):246-41.
- Muralidharan-Chari, Vandhana, James Clancy, Carolyn Plou, Maryse Romao, Philippe Chavrier, Graca Raposo, and Crislyn D'Souza-Schorey. 2009. "ARF6-Regulated Shedding of Tumor Cell-Derived Plasma Membrane Microvesicles." *Current Biology* 19(22):1875-85.
- Murry, Charles E., Mark H. Soonpaa, Hans Reinecke, Hidehiro Nakajima, Hisako O. Nakajima, Michael Rubart, Kishore B. S. Pasumarthi, Jiika Ismail Virag, Stephen H. Bartelmez, Veronica Poppa, Gillian Bradford, Joshua D. Dowell, David A. Williams, and Loren J. Field. 2004. "Haematopoietic Stem Cells Do Not Transdifferentiate into Cardiac Myocytes in Myocardial Infarcts." *Nature* 428(6983):664-68.
- Murry, Charles E., Robert W. Wiseman, Stephen M. Schwartz, and Stephen D. Hauschka. 1996. "Skeletal Myoblast Transplantation for Repair of Myocardial Necrosis." *Journal of Clinical Pathology* 49(11):2512-2523.
- N. Adler, L. L. Camin, and P. Shulkin. 1976. "Rat Model for Acute Myocardial Infarction: Application to Technetium-Labeled Glucoheptonate, Tetracycline and Polyphosphate." *Radiochemistry and radiopharmaceuticals* 17(3).
- Nagase, Hideaki and J. Frederick . Woessner. 1999. "Matrix Metalloproteinases". *The Journal of Biological Chemistry* 274(31):21491-21494.
- Nagaya, Noritoshi, Kenji Kangawa, Takefumi Itoh, Takashi Iwase, Shinsuke Murakami, Yoshinori Miyahara, Takafumi Fujii, Masaaki Uematsu, Hajime Ohgushi, Masakazu Yamagishi, Takeshi Tokudome, Hidezo Mori, Kunio Miyatake, and Soichiro Kitamura. 2005. "Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Improves Cardiac Function in a Rat Model of Dilated Cardiomyopathy." *Circulation* 112(8):1128-35.
- Nanbo, A., E. Kawanishi, R. Yoshida, and H. Yoshiyama. 2013. "Exosomes Derived from Epstein-Barr Virus-Infected Cells Are Internalized via Caveola-Dependent Endocytosis and Promote Phenotypic Modulation in Target Cells." *Journal of Virology* 87(18):10334-47.
- Nauta, Alma J. and Willem E. Fibbe. 2007. "Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stromal Cells." *Blood* 110(10):3499-3506.
- Nawaz, Muhammad, Giovanni Camussi, Hadi Valadi, Irina Nazarenko, Karin Ekström, Xiaoqin Wang, Simona Principe, Neelam Shah, Naeem M. Ashraf, Farah Fatima, Luciano Neder, and Thomas Kislinger. 2014. "The Emerging Role of Extracellular Vesicles as Biomarkers for Urogenital Cancers." *Nature Reviews Urology* 11(12):688-701.
- Neubauer, Stefan. 2019. "Mechanisms of Disease The Failing Heart-An Engine Out of Fuel." *The New England Journal of Medicine* 381(11):1140-1151.
- Ng, Sze Ying, Chun Kit Wong, and Suk Ying Tsang. 2010. "Differential Gene Expressions in Atrial and Ventricular Myocytes: Insights into the Road of Applying Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes for Future Therapies." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 299(6):1234-49.
- Nigro, Patrizia, Beatrice Bassetti, Laura Cavallotti, Valentina Catto, Corrado Carbuicchio, and Giulio Pompilio. 2018. "Cell Therapy for Heart Disease after 15 Years: Unmet Expectations." *Pharmacological Research* 127:77-91.
- Noiseux, Nicolas, Massimiliano Gnechi, Marco Lopez-Illasaca, Lunan Zhang, Scott D. Solomon, Arjun Deb, Victor

- J. Dzau, and Richard E. Pratt. 2006. "Mesenchymal Stem Cells Overexpressing Akt Dramatically Repair Infarcted Myocardium and Improve Cardiac Function despite Infrequent Cellular Fusion or Differentiation." *Molecular Therapy* 14(6):840–50.
- Nosedá, Michela, Marta Abreu-Paiva, and Michael D. Schneider. 2015. "The Quest for the Adult Cardiac Stem Cell." *Circulation Journal* 79(7):1422–30.
- Nosedá, Michela, Mutsuo Harada, Sara McSweeney, Thomas Leja, Elisa Belian, Daniel J. Stuckey, Marta S. Abreu Paiva, Josef Habib, Iain Macaulay, Adam J. De Smith, Farah Al-Beidh, Robert Sampson, R. Thomas Lumbers, Pulivarthi Rao, Sian E. Harding, Alexandra I. F. Blakemore, Sten Eirik Jacobsen, Mauricio Barahona, and Michael D. Schneider. 2015. "PDGFR α Demarcates the Cardiogenic Clonogenic Sca1⁺ Stem/Progenitor Cell in Adult Murine Myocardium." *Nature Communications* 6:6930.
- Nygren, Jens M., Stefan Jovinge, Martin Breitbach, Petter Säwén, Wilhelm Röhl, Jürgen Hescheler, Jalal Taneera, Bernd K. Fleischmann, and Sten Eirik W. Jacobsen. 2004. "Bone Marrow-Derived Hematopoietic Cells Generate Cardiomyocytes at a Low Frequency through Cell Fusion, but Not Transdifferentiation." *Nature Medicine* 10(5):494–501.
- Oh, H., S. B. Bradfute, T. D. Gallardo, T. Nakamura, V. Gaussin, Y. Mishina, J. Pocius, L. H. Michael, R. R. Behringer, D. J. Garry, M. L. Entman, and M. D. Schneider. 2003. "Cardiac Progenitor Cells from Adult Myocardium: Homing, Differentiation, and Fusion after Infarction." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(21):12313–12318.
- Oliveira-Carvalho, Vagner, Vitor Oliveira Carvalho, and Edimar Alcides Bocchi. 2013. "The Emerging Role of MiR-208a in the Heart." *DNA and Cell Biology* 32(1):8–12.
- Olivieri, Fabiola, Roberto Antonicelli, Maria Lorenzi, Yuri D'Alessandra, Raffaella Lazzarini, Gabriele Santini, Liana Spazzafumo, Rosamaria Lisa, Lucia La Sala, Roberta Galeazzi, Rina Recchioni, Roberto Testa, Giulio Pompilio, Maurizio C. Capogrossi, and Antonio Domenico Procopio. 2013. "Diagnostic Potential of Circulating MiR-499-5p in Elderly Patients with Acute Non ST-Elevation Myocardial Infarction." *International Journal of Cardiology* 167(2):531–36.
- Orlic, Donald, Jan Kajstura, Stefano Chimenti, Igor Jakoniuk, Stacie M. Anderson, Baosheng Li, James Pickel, Ronald McKay, Bernardo Nadal-Ginard, David M. Bodine, Annarosa Leri, and Piero Anversa. 2001. "Bone Marrow Cells Regenerate Infarcted Myocardium." *Nature* 410(6829):701–5.
- Oshima, Hideki, Thomas R. Payne, Kenneth L. Urish, Tetsuro Sakai, Yiqun Ling, Burhan Gharaibeh, Kimimasa Tobita, Bradley B. Keller, James H. Cummins, and Johnny Huard. 2005. "Differential Myocardial Infarct Repair with Muscle Stem Cells Compared to Myoblasts." *Molecular Therapy* 12(6):1130–41.
- Ott, H. C., N. Bonaros, R. Marksteiner, D. Wolf, E. Margreiter, T. Schachner, G. Laufer, and S. Hering. 2004. "Combined Transplantation of Skeletal Myoblasts and Bone Marrow Stem Cells for Myocardial Repair in Rats." *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 25(4):627–34.
- Oyama, Tomomi, Toshio Nagai, Hiroshi Wada, Atsuhiko Thomas Naito, Katsuhisa Matsuura, Koji Iwanaga, Toshinao Takahashi, Motohiro Goto, Yoko Mikami, Noritaka Yasuda, Hiroshi Akazawa, Akiyoshi Uezumi, Shin'ichi Takeda, and Issei Komuro. 2007. "Cardiac Side Population Cells Have a Potential to Migrate and Differentiate into Cardiomyocytes in Vitro and in Vivo." *Journal of Cell Biology* 176(3):329–41.

- Pagani, Francis D., Harout DerSimonian, Agatha Zawadzka, Kristie Wetzel, Albert S. .. Edge, Douglas B. Jacoby, Jonathan H. Dinsmore, Susan Wright, Tom H. Aretz, Howard J. Eisen, and Keith D. Aaronson. 2003. "Autologous Skeletal Myoblasts Transplanted to Ischemia-Damaged Myocardium in Humans." *Journal of the American College of Cardiology* 41(5):879–88.
- Parolini, Isabella, Cristina Federici, Carla Raggi, Luana Lugini, Simonetta Palleschi, Angelo De Milito, Carolina Coscia, Elisabetta Iessi, Mariantonia Logozzi, Agnese Molinari, Marisa Colone, Massimo Tatti, Massimo Sargiacomo, and Stefano Fais. 2009. "Microenvironmental pH Is a Key Factor for Exosome Traffic in Tumor Cells." *Journal of Biological Chemistry* 284(49):34211–22.
- Patel, B., J. Patel, J. H. Cho, S. Manne, S. Bonala, E. Henske, F. Roegiers, M. Markiewski, and M. Karbowniczek. 2016. "Exosomes Mediate the Acquisition of the Disease Phenotypes by Cells with Normal Genome in Tuberous Sclerosis Complex." *Oncogene* 35(23):1–10.
- Payne, T. R., H. Oshima, T. Sakai, Y. Ling, B. Gharaibeh, J. Cummins, and J. Huard. 2005. "Regeneration of Dystrophin-Expressing Myocytes in the Mdx Heart by Skeletal Muscle Stem Cells." *Gene Therapy* 12(16):1264–74.
- Penn, Marc S. and Abeel A. Mangi. 2008. "Genetic Enhancement of Stem Cell Engraftment, Survival, and Efficacy." *Circulation Research* 102(12):1471–82.
- Penny, William F. and H. Kirk Hammond. 2017. "Randomized Clinical Trials of Gene Transfer for Heart Failure with Reduced Ejection Fraction." *Human Gene Therapy* 28(5):378–84.
- Perin, Emerson C., Hans F. R. Dohmann, Radovan Borojevic, Suzana A. Silva, Andre L. S. Sousa, Claudio T. Mesquita, Maria I. D. Rossi, Antonio C. Carvalho, Helio S. Dutra, Hans J. F. Dohmann, Guilherme V. Silva, Luciano Belém, Ricardo Vivacqua, Fernando O. D. Rangel, Roberto Esporcatte, Yong J. Geng, William K. Vaughn, Joao A. R. Assad, Evandro T. Mesquita, and James T. Willerson. 2003. "Transendocardial, Autologous Bone Marrow Cell Transplantation for Severe, Chronic Ischemic Heart Failure." *Circulation* 107(18):2294–2302.
- Perin, Emerson C., Hans F. R. Dohmann, Radovan Borojevic, Suzana A. Silva, Andre L. S. Sousa, Guilherme V. Silva, Claudio T. Mesquita, Luciano Belém, William K. Vaughn, Fernando O. D. Rangel, Joao A. R. Assad, Antonio C. Carvalho, Rodrigo V. C. Branco, Maria I. D. Rossi, Hans J. F. Dohmann, and James T. Willerson. 2004. "Improved Exercise Capacity and Ischemia 6 and 12 Months after Transendocardial Injection of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells for Ischemic Cardiomyopathy." *Circulation* 110(11).
- Perin, Emerson C., Ricardo Sanz-Ruiz, Pedro L. Sánchez, José Lasso, Rosa Pérez-Cano, Juan C. Alonso-Farto, Esther Pérez-David, Maria Eugenia Fernández-Santos, Patrick W. Serruys, Henrick J. Duckers, Jens Kastrup, Steven Chamuleau, Yi Zheng, Guilherme V. Silva, James T. Willerson, and Francisco Fernández-Avilés. 2014. "Adipose-Derived Regenerative Cells in Patients with Ischemic Cardiomyopathy: The PRECISE Trial." *American Heart Journal* 168(1).
- Perin, Emerson C., Guilherme V. Silva, Timothy D. Henry, Maria G. Cabreira-Hansen, Warren H. Moore, Stephanie A. Coulter, J. Patrick Herlihy, Marlos R. Fernandes, Benjamin Y. C. Cheong, Scott D. Flamm, Jay H. Traverse, Yi Zheng, Deirdre Smith, Sandi Shaw, Lynette Westbrook, Rachel Olson, Dipsu Patel, Amir Gahremanpour, John Canales, William K. Vaughn, and James T. Willerson. 2011. "A Randomized Study of Transendocardial

- Injection of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells and Cell Function Analysis in Ischemic Heart Failure (FOCUS-HF)." *American Heart Journal* 161(6).
- Perin, Emerson C., James T. Willerson, Carl J. Pepine, Timothy D. Henry, Stephen G. Ellis, David X. M. Zhao, Guilherme V. Silva, Dejian Lai, James D. Thomas, Marvin W. Kronenberg, A. Daniel Martin, R. David Anderson, Jay H. Traverse, Marc S. Penn, Saif Anwaruddin, Antonis K. Hatzopoulos, Adrian P. Gee, Doris A. Taylor, Christopher R. Cogle, Deirdre Smith, Lynette Westbrook, James Chen, Eileen Handberg, Rachel E. Olson, Carrie Geither, Sherry Bowman, Judy Francescon, Sarah Baraniuk, Linda B. Piller, Lara M. Simpson, Catalin Loghin, David Aguilar, Sara Richman, Claudia Zierold, Judy Bettencourt, Shelly L. Sayre, Rachel W. Vojvodic, Sonia I. Skarlatos, David J. Gordon, Ray F. Ebert, Minjung Kwak, Lemuel A. Moyé, and Robert D. Simari. 2012. "Effect of Transendocardial Delivery of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells on Functional Capacity, Left Ventricular Function, and Perfusion in Chronic Heart Failure: The FOCUS-CCTRN Trial." *JAMA - Journal of the American Medical Association* 307(16):1717–26.
- Pironti, Gianluigi, Ryan T. Strachan, Dennis Abraham, Samuel Mon-Wei Yu, Minyong Chen, Wei Chen, Kenji Hanada, Lan Mao, Lewis J. Watson, and Howard A. Rockman. 2015. "Circulating Exosomes Induced by Cardiac Pressure Overload Contain Functional Angiotensin II Type 1 Receptors." *Circulation* 131(24):2120–30.
- Pittenger, M. F. 1999. "Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells." *Science* 284(5411):143–47.
- van der Pol, E., F. A. W. Coumans, A. E. Grootemaat, C. Gardiner, I. L. Sargent, P. Harrison, A. Sturk, T. G. van Leeuwen, and R. Nieuwland. 2014. "Particle Size Distribution of Exosomes and Microvesicles Determined by Transmission Electron Microscopy, Flow Cytometry, Nanoparticle Tracking Analysis, and Resistive Pulse Sensing." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 12(7):1182–92.
- Van Der Pol, E., A. G. Hoekstra, A. Sturk, C. Otto, T. G. Van Leeuwen, and R. Nieuwland. 2010. "Optical and Non-Optical Methods for Detection and Characterization of Microparticles and Exosomes." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 8(12):2596–2607.
- Porrello, Enzo R., Ahmed I. Mahmoud, Emma Simpson, Joseph A. Hill, James A. Richardson, Eric N. Olson, and Hesham A. Sadek. 2011. "Transient Regenerative Potential of the Neonatal Mouse Heart." *Science* 331(6020):1078–80.
- Porrello, Enzo R., Ahmed I. Mahmoud, Emma Simpson, Brett A. Johnson, David Grinsfelder, Diana Canseco, Pradeep P. Mammen, Beverly A. Rothermel, Eric N. Olson, and Hesham A. Sadek. 2013. "Regulation of Neonatal and Adult Mammalian Heart Regeneration by the MiR-15 Family." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(1):187–92.
- Porrello, Enzo R. and Eric N. Olson. 2014. "A Neonatal Blueprint for Cardiac Regeneration." *Stem Cell Research* 13(3):556–70.
- Poss, Kenneth D., Lindsay G. Wilson, and Mark T. Keating. 2002. "Heart Regeneration in Zebrafish." *Science* 298(5601):2188–90.
- Pouly, Julia, Albert A. Hagege, Jean Thomas Vilquin, Alvine Bissery, Andréée Rouche, Patrick Bruneval, Denis Duboc, Michel Desnos, Marc Fiszman, Yves Fromes, and Philippe Menasché. 2004. "Does the Functional

- Efficacy of Skeletal Myoblast Transplantation Extend to Nonischemic Cardiomyopathy?" *Circulation* 110(12):1626–31.
- Povsic, Thomas J., Christopher M. O'Connor, Timothy Henry, Andrew Taussig, Dean J. Kereiakes, F. David Fortuin, Alan Niederman, Richard Schatz, Richard Spencer IV, Douglas Owens, Missy Banks, Diane Joseph, Rhonda Roberts, John H. Alexander, and Warren Sherman. 2011. "A Double-Blind, Randomized, Controlled, Multicenter Study to Assess the Safety and Cardiovascular Effects of Skeletal Myoblast Implantation by Catheter Delivery in Patients with Chronic Heart Failure after Myocardial Infarction." *American Heart Journal* 162(4).
- Premaratne, Goditha U., Keiichi Tambara, Masatoshi Fujita, Xue Lin, Naoki Kanemitsu, Shinji Tomita, Genichi Sakaguchi, Hiroyuki Nakajima, Tadashi Ikeda, and Masashi Komeda. 2006. "Repeated Implantation Is a More Effective Cell Delivery Method in Skeletal Myoblast Transplantation for Rat Myocardial Infarction." *Circulation Journal* 70(9):1184–89.
- Psaltis, Peter J., Andrew C. W. Zannettino, Stephen G. Worthley, and Stan Gronthos. 2008. "Concise Review: Mesenchymal Stromal Cells: Potential for Cardiovascular Repair." *Stem Cells* 26(9):2201–10.
- Putz, Ulrich, Jason Howitt, Anh Doan, Choo Peng Goh, Ley Hian Low, John Silke, and Seong Seng Tan. 2012. "The Tumor Suppressor PTEN Is Exported in Exosomes and Has Phosphatase Activity in Recipient Cells." *Science Signaling* 5(243).
- Putz, Ulrich, Jason Howitt, Jenny Lackovic, Natalie Foot, Sharad Kumar, John Silke, and Seong Seng Tan. 2008. "Nedd4 Family-Interacting Protein 1 (Ndfip1) Is Required for the Exosomal Secretion of Nedd4 Family Proteins." *Journal of Biological Chemistry* 283(47):32621–27.
- Qayyum, Abbas Ali, Mandana Haack-Sørensen, Anders Bruun Mathiasen, Erik Jørgensen, Annette Ekblond, and Jens Kastrup. 2012. "Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells for Chronic Myocardial Ischemia (MyStromalCell Trial): Study Design." *Regenerative Medicine* 7(3):421–28.
- Qu-Petersen, Zhuqing, Bridget Deasy, Ron Jankowski, Makato Ikezawa, James Cummins, Ryan Pruchnic, John Mytinger, Baohong Cao, Charley Gates, Anton Wernig, and Johnny Huard. 2002. "Identification of a Novel Population of Muscle Stem Cells in Mice: Potential for Muscle Regeneration." *Journal of Cell Biology* 157(5):851–64.
- Quevedo, Henry C., Konstantinos E. Hatzistergos, Behzad N. Oskouei, Gary S. Feigenbaum, Jose E. Rodriguez, David Valdes, Pradip M. Pattany, Juan P. Zambrano, Qinghua Hu, Ian McNiece, Alan W. Heldman, and Joshua M. Hare. 2009. "Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Restore Cardiac Function in Chronic Ischemic Cardiomyopathy via Trilineage Differentiating Capacity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(33):14022-14027.
- Quyyumi, Arshed A., Edmund K. Waller, Jonathan Murrow, Fabio Esteves, James Galt, John Oshinski, Stamatios Lerakis, Salman Sher, Douglas Vaughan, Emerson Perin, James Willerson, Dean Kereiakes, Bernard J. Gersh, Douglas Gregory, Astrid Werner, Thomas Moss, Wai Shun Chan, Robert Preti, and Andrew L. Pecora. 2011. "CD34 + Cell Infusion after ST Elevation Myocardial Infarction Is Associated with Improved Perfusion and Is Dose Dependent." *American Heart Journal* 161(1):98–105.
- Raposo, Graça, Hans W. Nijman, Willem Stoorvogel, Richtje Leijendekker, Clifford V. Harding, Cornelis J. M.

- Melief, and Hans J. Geuze. 1996. "B Lymphocytes Secrete Antigen-Presenting Vesicles." *Journal of Experimental Medicine* 183(3):1161–72.
- Raposo, Graça and Willem Stoorvogel. 2013. "Extracellular Vesicles: Exosomes, Microvesicles, and Friends." *Journal of Cell Biology* 200(4):373–83.
- Reinecke, Hans, Glen H. MacDonald, Stephen D. Hauschka, and Charles E. Murry. 2000. "Electromechanical Coupling between Skeletal and Cardiac Muscle: Implications for Infarct Repair." *Journal of Cell Biology* 149(3):731–40.
- Reinecke, Hans, Veronica Poppa, and Charles E. Murry. 2002. "Skeletal Muscle Stem Cells Do Not Transdifferentiate into Cardiomyocytes after Cardiac Grafting." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 34(2):241–49.
- Rekker, Kadri, Merli Saare, Anne Mari Roost, Anna Liisa Kubo, Natasa Zarovni, Antonio Chiesi, Andres Salumets, and Maire Peters. 2014. "Comparison of Serum Exosome Isolation Methods for MicroRNA Profiling." *Clinical Biochemistry* 47(1–2):135–38.
- Ribeiro, Andreia, Paula Laranjeira, Sandrine Mendes, Isabel Velada, Cristiana Leite, Pedro Andrade, Francisco Santos, Ana Henriques, Mário Grãos, Carla M. P. Cardoso, António Martinho, Mluísa Pais, Cláudia Lobato Da Silva, Joaquim Cabral, Hélder Trindade, and Artur Paiva. 2013. "Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Matrix, Adipose Tissue and Bone Marrow Exhibit Different Capability to Suppress Peripheral Blood B, Natural Killer and T Cells." *Stem Cell Research and Therapy* 4(5):1-16.
- Richart, Adèle, Xavier Loyer, Tui Néri, Kiave Howangyin, Coralie L. Guérin, Anta Ngkelo, Wineke Bakker, Ivana Zlatanova, Marie Rouanet, José Vilar, Bernard Lévy, Marc Rothenberg, Ziad Mallat, Michel Pucéat, and Jean Sébastien Silvestre. 2014. "MicroRNA-21 Coordinates Human Multipotent Cardiovascular Progenitors Therapeutic Potential." *Stem Cells* 32(11):2908–22.
- Romagnuolo, Rocco, Hassan Masoudpour, Andreu Porta-Sánchez, Beiping Qiang, Jennifer Barry, Andrew Laskary, Xiuling Qi, Stéphane Massé, Karl Magtibay, Hiroyuki Kawajiri, Jun Wu, Tamilla Valdman Sadikov, Janet Rothberg, Krishna M. Panchalingam, Emily Titus, Ren Ke Li, Peter W. Zandstra, Graham A. Wright, Kumaraswamy Nanthakumar, Nilesh R. Ghugre, Gordon Keller, and Michael A. Laflamme. 2019. "Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Regenerate the Infarcted Pig Heart but Induce Ventricular Tachyarrhythmias." *Stem Cell Reports* 12(5):967–81.
- Ronak Delewi^{1*}, Alexander Hirsch¹, Jan G. Tijssen¹, Volker Schaichinger², WojciechWojakowski³, JérômeRoncalli⁴, SvendAakhus⁵, SandraErbs⁶, BirgitAssmus², Michal Tendra³, R. Goekmen Turan⁷, Roberto Corti⁸, TimHenry⁹, Patricia Lemarchand¹⁰, Ketil Lunde⁵, and Jan J. Piek¹. 2014. "Impact Ofintracoronarybonemarrowcell Therapy on Left Ventricular Function in the Setting of ST-Segment Elevation Myocardial Infarction: A Collaborativemeta-Analysis Ronak." *European Heart Journal* 35(15):989–98.
- Van Rooij, Eva and Eric N. Olson. 2012. "MicroRNA Therapeutics for Cardiovascular Disease: Opportunities and Obstacles." *Nature Reviews Drug Discovery* 11(11):860–72.
- Rosová, Ivana, Mo Dao, Ben Capoccia, Daniel Link, and Jan A. Nolte. 2008. "Hypoxic Preconditioning Results in Increased Motility and Improved Therapeutic Potential of Human Mesenchymal Stem Cells." *Stem Cells*

- 26(8):2173–82.
- Rota, M., J. Kajstura, T. Hosoda, C. Bearzi, S. Vitale, G. Esposito, G. Iaffaldano, M. E. Padin-Iruegas, A. Gonzalez, R. Rizzi, N. Small, J. Muraski, R. Alvarez, X. Chen, K. Urbanek, R. Bolli, S. R. Houser, A. Leri, M. A. Sussman, and P. Anversa. 2007. "Bone Marrow Cells Adopt the Cardiomyogenic Fate in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(45):17783–88.
- Rota, Marcello, M. Elena Padin-Iruegas, Yu Misao, Antonella De Angelis, Silvia Maestroni, João Ferreira-Martins, Emanuela Fiumana, Raffaella Rastaldo, Michael L. Arcarese, Thomas S. Mitchell, Alessandro Boni, Roberto Bolli, Konrad Urbanek, Toru Hosoda, Piero Anversa, Annarosa Leri, and Jan Kajstura. 2008. "Local Activation or Implantation of Cardiac Progenitor Cells Rescues Scarred Infarcted Myocardium Improving Cardiac Function." *Circulation Research* 103(1):107–16.
- Rouger, Karl, Thibaut Larcher, Laurence Dubreil, Jack Yves Deschamps, Caroline Le Guiner, Gregory Jouvion, Bruno Delorme, Blandine Lieubeau, Marine Carlus, Benot Fornasari, Marine Theret, Priscilla Orlando, Mireille Ledevin, Céline Zuber, Isabelle Leroux, Stéphane Deleau, Lydie Guigand, Isabelle Testault, Elisabeth Le Rumeur, Marc Fisman, and Yan Chérel. 2011. "Systemic Delivery of Allogenic Muscle Stem Cells Induces Long-Term Muscle Repair and Clinical Efficacy in Duchenne Muscular Dystrophy Dogs." *American Journal of Pathology* 179(5):2501–18.
- Rountree, Ryan B., Stefanie J. Mandl, James M. Nachtwey, Katie Dalpozzo, Lisa Do, John R. Lombardo, Peter L. Schoonmaker, Kay Brinkmann, Ulrike Dirmeier, Reiner Laus, and Alain Delcayre. 2011. "Exosome Targeting of Tumor Antigens Expressed by Cancer Vaccines Can Improve Antigen Immunogenicity and Therapeutic Efficacy." *Cancer Research* 71(15):5235–44.
- Roura, Santiago. 2013. "In Vitro Characterization of the Molecular Machinery Regulating Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cell Angiogenesis: A Step Towards Multipotent Stem Cell Therapy for Vascular Regeneration." *Journal of Stem Cell Research & Therapy* 3(3).
- Roura, Santiago, Carolina Gálvez-Montón, Clémentine Mirabel, Joaquim Vives, and Antoni Bayes-Genis. 2017. "Mesenchymal Stem Cells for Cardiac Repair: Are the Actors Ready for the Clinical Scenario?" *Stem Cell Research and Therapy* 8(1).
- Roura, Santiago, Josep Maria Pujal, Carolina Gálvez-Montón, and Antoni Bayes-Genis. 2016. "Quality and Exploitation of Umbilical Cord Blood for Cell Therapy: Are We beyond Our Capabilities?" *Developmental Dynamics* 245(7):710–17.
- Sachinidis, Agapios, Cornelia Gissel, Dirk Nierhoff, Rita Hippler-Altenburg, Heinrich Sauer, Maria Wartenberg, and Jürgen Hescheler. 2003. "Identification of Platelet-Derived Growth Factor-BB as Cardiogenesis-Inducing Factor in Mouse Embryonic Stem Cells under Serum-Free Conditions." *Cellular Physiology and Biochemistry* 13(6):423–29.
- Saeed, Maythem, Gunnar Lund, Michael F. Wendland, Jens Bremerich, Hanns-Joachim Weinmann, and Charles B. Higgins. 2001. "Magnetic Resonance Characterization of the Peri-Infarction Zone of Reperfused Myocardial Infarction With Necrosis-Specific and Extracellular Nonspecific Contrast Media." *Circulation* 103(6):871-876.
- Sahoo, Susmita, Ekaterina Klychko, Tina Thorne, Sol Misener, Kathryn M. Schultz, Meredith Millay, Aiko Ito, Ting

- Liu, Christine Kamide, Hemant Agrawal, Harris Perlman, Gangjian Qin, Raj Kishore, and Douglas W. Losordo. 2011. "Exosomes from Human CD34+ Stem Cells Mediate Their Proangiogenic Paracrine Activity." *Circulation Research* 109(7):724–28.
- Sala, V. and T. Crepaldi. 2011. "Novel Therapy for Myocardial Infarction: Can HGF/Met Be Beneficial?" *Cellular and Molecular Life Sciences* 68(10):1703–17.
- Sanchis-Gomar, Fabian, Carme Perez-Quilis, Roman Leischik, and Alejandro Lucia. 2016. "Epidemiology of Coronary Heart Disease and Acute Coronary Syndrome." *Annals of Translational Medicine* 4(13):256–256.
- Sanganalmath, Santosh K. and Roberto Bolli. 2013. "Cell Therapy for Heart Failure." *Circulation Research* 113(6):810–34.
- Santangelo, Laura, Giorgio Giurato, Carla Cicchini, Claudia Montaldo, Carmine Mancone, Roberta Tarallo, Cecilia Battistelli, Tonino Alonzi, Alessandro Weisz, and Marco Tripodi. 2016. "The RNA-Binding Protein SYNCRIP Is a Component of the Hepatocyte Exosomal Machinery Controlling MicroRNA Sorting." *Cell Reports* 17(3):799–808.
- Sanz-Ruiz, Ricardo, Ana Casado Plasencia, Luis R. Borlado, María Eugenia Fernández-Santos, Reem Al-Daccak, Piet Claus, Itziar Palacios, Rafael Sádaba, Dominique Charron, Jan Bogaert, Miguel Mulet, Raquel Yotti, Immaculada Gilaberte, Antonio Bernad, Javier Bermejo, Stefan Janssens, and Francisco Fernández-Avilés. 2017. "Rationale and Design of a Clinical Trial to Evaluate the Safety and Efficacy of Intracoronary Infusion of Allogeneic Human Cardiac Stem Cells in Patients With Acute Myocardial Infarction and Left Ventricular Dysfunction: The Randomized Multicenter Double-Blind Controlled CAREMI Trial (Cardiac Stem Cells in Patients With Acute Myocardial Infarction)." *Circulation Research* 121(1):71–80.
- Saraste, Antti and Kari Pulkki. 2000. "Morphologic and Biochemical Hallmarks of Apoptosis." *Cardiovascular Research* 45(3):528–37.
- Sasaki, K. -i., C. Heeschen, A. Aicher, T. Ziebart, J. Honold, C. Urbich, L. Rossig, U. Koehl, M. Koyanagi, A. Mohamed, R. P. Brandes, H. Martin, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler. 2006. "Ex Vivo Pretreatment of Bone Marrow Mononuclear Cells with Endothelial NO Synthase Enhancer AVE9488 Enhances Their Functional Activity for Cell Therapy." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(39):14537-14541.
- Sauer, Heinrich, Jürgen Hescheler, and Maria Wartenberg. 2002. "Cardiac Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Sex Mis-Matched Transplanted Hearts: Self-Repair or Just a Visit?" *Cardiovascular Research* 56(3):357-358.
- Saury, Charlotte, Aurélie Lardenois, Cindy Schleder, Isabelle Leroux, Blandine Lieubeau, Laurent David, Marine Charrier, Laëticia Guével, Sabrina Viau, Bruno Delorme, and Karl Rouger. 2018. "Human Serum and Platelet Lysate Are Appropriate Xeno-Free Alternatives for Clinical-Grade Production of Human MuStem Cell Batches." *Stem Cell Research and Therapy* 9(1).
- Sayed, Ali Sheikh Md, Ke Xia, Tian Lun Yang, and Jun Peng. 2013. "Circulating MicroRNAs: A Potential Role in Diagnosis and Prognosis of Acute Myocardial Infarction." *Disease Markers* 35(5):561–66.
- Schächinger, Volker, Sandra Erbs, Albrecht Elsässer, Werner Haberbosch, Rainer Hambrecht, Hans Hölschermann, Jiangtao Yu, Roberto Corti, Detlef G. Mathey, Christian W. Hamm, Tim Süselbeck, Birgit Assmus, Torsten Tonn, Stefanie Dimmeler, and Andreas M. Zeiher. 2006. "Intracoronary Bone Marrow–

- Derived Progenitor Cells in Acute Myocardial Infarction.” *New England Journal of Medicine* 355(12):1210–21.
- Schmuck, Eric G., Jill M. Koch, Timothy A. Hacker, Charles R. Hatt, Michael T. Tomkowiak, Karl K. Vigen, Nicholas Hendren, Cathlyn Leitzke, Ying qi Zhao, Zhanhai Li, John M. Centanni, Derek J. Hei, Denise Schwahn, Jaehyup Kim, Peiman Hematti, and Amish N. Raval. 2015. “Intravenous Followed by X-Ray Fused with MRI-Guided Transendocardial Mesenchymal Stem Cell Injection Improves Contractility Reserve in a Swine Model of Myocardial Infarction.” *Journal of Cardiovascular Translational Research* 8(7):438–48.
- Schuleri, Karl H., Gary S. Feigenbaum, Marco Centola, Eric S. Weiss, Jeffrey M. Zimmet, Jennifer Turney, Joshua Kellner, Menekhem M. Zviman, Konstantinos E. Hatzistergos, Barbara Detrick, John V Conte, Ian Mcniece, Charles Steenbergen, Albert C. Lardo, and Joshua M. Hare. 2009. “Autologous Mesenchymal Stem Cells Produce Reverse Remodelling in Chronic Ischaemic Cardiomyopathy.” *European Heart Journal* 30(22):2722-2732.
- Segers, Vincent F. M. and Richard T. Lee. 2008. “Stem-Cell Therapy for Cardiac Disease.” *Nature* 451(7181):937–42.
- Segers, Vincent F. M. and Richard T. Lee. 2011. “Biomaterials to Enhance Stem Cell Function in the Heart” edited by S. Dimmeler and D. Losordo. *Circulation Research* 109(8):910–22.
- Segura, Elodie, Carole Nicco, Bérangère Lombard, Philippe Véron, Graça Raposo, Frédéric Batteux, Sebastian Amigorena, and Clotilde Théry. 2005. “ICAM-1 on Exosomes from Mature Dendritic Cells Is Critical for Efficient Naive T-Cell Priming.” *Blood* 106(1):216–23.
- Sekine, Hidekazu, Tatsuya Shimizu, Izumi Dobashi, Katsuhisa Matsuura, Nobuhisa Hagiwara, Masafumi Takahashi, Eiji Kobayashi, Masayuki Yamato, and Teruo Okano. 2011. “Cardiac Cell Sheet Transplantation Improves Damaged Heart Function via Superior Cell Survival in Comparison with Dissociated Cell Injection.” *Tissue Engineering - Part A* 17(23–24):2973–80.
- Sekiya, Naosumi, Kimimasa Tobita, Sarah Beckman, Masaho Okada, Burhan Gharaibeh, Yoshiki Sawa, Robert L. Kormos, and Johnny Huard. 2013. “Muscle-Derived Stem Cell Sheets Support Pump Function and Prevent Cardiac Arrhythmias in a Model of Chronic Myocardial Infarction.” *Molecular Therapy* 21(3):662–69.
- Shao, Lianbo, Yu Zhang, Beibei Lan, Juanjuan Wang, Zhiwei Zhang, Lulu Zhang, Pengli Xiao, Qingyou Meng, Yongjian Geng, Xi-yong Yu, and Yangxin Li. 2017. “MiRNA-Sequence Indicates That Mesenchymal Stem Cells and Exosomes Have Similar Mechanism to Enhance Cardiac Repair.” *BioMed Research International* 2017:1–9.
- Sharma, Shivani, Boyd M. Gillespie, Viswanathan Palanisamy, and James K. Gimzewski. 2011. “Quantitative Nanostructural and Single-Molecule Force Spectroscopy Biomolecular Analysis of Human-Saliva-Derived Exosomes.” *Langmuir* 27(23):14394–400.
- Shiba, Yuji, Toshihito Gomibuchi, Tatsuichiro Seto, Yuko Wada, Hajime Ichimura, Yuki Tanaka, Tatsuki Ogasawara, Kenji Okada, Naoko Shiba, Kengo Sakamoto, Daisuke Ido, Takashi Shiina, Masamichi Ohkura, Junichi Nakai, Narumi Uno, Yasuhiro Kazuki, Mitsuo Oshimura, Itsunari Minami, and Uichi Ikeda. 2016. “Allogeneic Transplantation of IPS Cell-Derived Cardiomyocytes Regenerates Primate Hearts.” *Nature* 538(7625):388–91.
- Shintani, Yasunori, Satsuki Fukushima, Anabel Varela-Carver, Joon Lee, Steven R. Coppen, Kunihiko Takahashi,

- Scott W. Brouillette, Kenta Yashiro, Cesare M. N. Terracciano, Magdi H. Yacoub, and Ken Suzuki. 2009. "Donor Cell-Type Specific Paracrine Effects of Cell Transplantation for Post-Infarction Heart Failure." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 47(2):288–95.
- Shiomi, Masashi, Takashi Ito, Satoshi Yamada, Seinosuke Kawashima, and Jianglin Fan. 2003. "Development of an Animal Model for Spontaneous Myocardial Infarction (WHHLMI Rabbit)." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23(7):1239–44.
- Sicco, Claudia Lo, Daniele Reverberi, Carolina Balbi, Valentina Ulivi, Elisa Principi, Luisa Pascucci, Pamela Becherini, Maria Carla Bosco, Luigi Varesio, Chiara Franzin, Michela Pozzobon, Ranieri Cancedda, and Roberta Tasso. 2017. "Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles as Mediators of Anti-Inflammatory Effects: Endorsement of Macrophage Polarization." *Stem Cells Translational Medicine* 6(3):1018–28.
- Silva, Guilherme V., Silvio Litovsky, Joao A. R. Assad, Andre L. S. Sousa, Bradley J. Martin, Deborah Vela, Stephanie C. Coulter, Jing Lin, Judy Ober, William K. Vaughn, Rodrigo V. C. Branco, Edie M. Oliveira, Rumin He, Yong Jian Geng, James T. Willerson, and Emerson C. Perin. 2005. "Mesenchymal Stem Cells Differentiate into an Endothelial Phenotype, Enhance Vascular Density, and Improve Heart Function in a Canine Chronic Ischemia Model." *Circulation* 111(2):150–56.
- De Silva, Ranil, Amish N. Raval, Mohiuddin Hadi, Karena M. Gildea, Aylin C. Bonifacino, Zu Xi Yu, Yu Ying Yau, Susan F. Leitman, Stephen L. Bacharach, Robert E. Donahue, Elizabeth J. Read, and Robert J. Lederman. 2008. "Intracoronary Infusion of Autologous Mononuclear Cells from Bone Marrow or Granulocyte Colony-Stimulating Factor-Mobilized Apheresis Product May Not Improve Remodelling, Contractile Function, Perfusion, or Infarct Size in a Swine Model of Large Myocardial." *European Heart Journal* 29(14):1772–82.
- Siminiak, Tomasz, Dorota Fiszer, Olga Jerzykowska, Beata Grygielska, Natalia Rozwadowska, Piotr Kałmucki, and Maciej Kurpisz. 2005. "Percutaneous Trans-Coronary-Venous Transplantation of Autologous Skeletal Myoblasts in the Treatment of Post-Infarction Myocardial Contractility Impairment: The POZNAN Trial." *European Heart Journal* 26(12):1188–95.
- Siminiak, Tomasz, Ryszard Kalawski, Dorota Fiszer, Olga Jerzykowska, Janusz Rzeźniczak, Natalia Rozwadowska, and Maciej Kurpisz. 2004. "Autologous Skeletal Myoblast Transplantation for the Treatment of Postinfarction Myocardial Injury: Phase I Clinical Study with 12 Months of Follow-Up." *American Heart Journal* 148(3):531–37.
- Sitar, Simona, Anja Kežar, David Pahovnik, Ksenija Kogej, Magda Tušek-Žnidarič, Metka Lenassi, and Ema Žagar. 2015. "Size Characterization and Quantification of Exosomes by Asymmetrical-Flow Field-Flow Fractionation." *Analytical Chemistry* 87(18):9225–33.
- Sluijter, Joost Petrus Gerardus, Sean Michael Davidson, Chantal M. Boulanger, Edit Iren Buzás, Dominique Paschalis Victor De Kleijn, Felix Benedikt Engel, Zoltán Giricz, Derek J. Hausenloy, Raj Kishore, Sandrine Lecour, Jonathan Leor, Rosalinda Madonna, Cinzia Perrino, Fabrice Prunier, Susmita Sahoo, Ray Michel Schiffelers, Rainer Schulz, Linda Wilhelmina Van Laake, Kirsti Ytrehus, and Peter Ferdinandy. 2018. "Extracellular Vesicles in Diagnostics and Therapy of the Ischaemic Heart: Position Paper from the Working Group on Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology." *Cardiovascular Research*

114(1):19–34.

- Smith, Rachel Ruckdeschel, Lucio Barile, Hee Cheol Cho, Michelle K. Leppo, Joshua M. Hare, Elisa Messina, Alessandro Giacomello, M. Roselle Abraham, and Eduardo Marbán. 2007. “Regenerative Potential of Cardiosphere-Derived Cells Expanded from Percutaneous Endomyocardial Biopsy Specimens.” *Circulation* 115(7):896–908.
- Smits, Pieter C., Robert Jan M. Van Geuns, Don Poldermans, Manolis Bountiukos, Emile E. M. Onderwater, Chi Hang Lee, Alex P. W. M. Maat, and Patrick W. Serruys. 2003. “Catheter-Based Intramyocardial Injection of Autologous Skeletal Myoblasts as a Primary Treatment of Ischemic Heart Failure Clinical Experience with Six-Month Follow-Up.” *Journal of the American College of Cardiology* 42(12):2063–69.
- Van der Spoel, Tycho I. G., Krijn R. Vrijsen, Stefan Koudstaal, Joost P. G. Sluijter, Johannes Frank W. Nijssen, Hugo W. de Jong, Imo E. Hofer, Maarten Jan M. Cramer, Pieter A. Doevendans, Eric van Belle, and Steven A. J. Chamuleau. 2012. “Transendocardial Cell Injection Is Not Superior to Intracoronary Infusion in a Porcine Model of Ischaemic Cardiomyopathy: A Study on Delivery Efficiency.” *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 16(11):2768–76.
- Sterzenbach, Ulrich, Ulrich Putz, Ley Hian Low, John Silke, Seong Seng Tan, and Jason Howitt. 2017. “Engineered Exosomes as Vehicles for Biologically Active Proteins.” *Molecular Therapy* 25(6):1269–78.
- Strauer, Bodo Eckehard and Gustav Steinhoff. 2011. “10 Years of Intracoronary and Intramyocardial Bone Marrow Stem Cell Therapy of the Heart: From the Methodological Origin to Clinical Practice.” *Journal of the American College of Cardiology* 58(11):1095–1104.
- Stuart, Michael J. and Ananthababu Pattavilakom. 2015. “Clinically Relevant Aspects of Stem Cell Technologies: Current State of Play.” *ANZ Journal of Surgery* 85(9):615–19.
- Sun, Rongrong, Xianchi Li, Min Liu, Yi Zeng, Shuang Chen, and Peking Zhang. 2016. “Advances in Stem Cell Therapy for Cardiovascular Disease (Review).” *International Journal of Molecular Medicine* 38(1):23–29.
- Sun, Yao, John Q. Zhang, Jiakun Zhang, and Steffen Lamparter. 2000. “Cardiac Remodeling by Fibrous Tissue after Infarction in Rats.” *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 135(4):316–23.
- Sürder, Daniel, Robert Manka, Tiziano Moccetti, Viviana Lo Cicero, Maximilian Y. Emmert, Catherine Klersy, Sabrina Soncin, Lucia Turchetto, Marina Radrizzani, Michel Zuber, Stephan Windecker, Aris Moschovitis, Ines Bühler, Sebastian Kozerke, Paul Erne, Thomas F. Lüscher, and Roberto Corti. 2016. “Effect of Bone Marrow-Derived Mononuclear Cell Treatment, Early or Late after Acute Myocardial Infarction.” *Circulation Research* 119(3):481–90.
- Suzuki, K., N. J. Brand, R. T. Smolenski, J. Jayakumar, B. Murtuza, and M. H. Yacoub. 2000. “Development of a Novel Method for Cell Transplantation Through the Coronary Artery.” *Circulation* 102(3):359–364.
- Suzuki, Ken, Bari Murtuza, Noriko Suzuki, Ryszard T. Smolenski, and Magdi H. Yacoub. 2007. “Intracoronary Infusion of Skeletal Myoblasts Improves Cardiac Function in Doxorubicin-Induced Heart Failure.” *Circulation* 115(2):213–217.
- Takahashi, Kazutoshi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda, and Shinya Yamanaka. 2007. “Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors.” *Cell* 131(5):861–72.

- Takahashi, Kazutoshi and Shinya Yamanaka. 2006. "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors." *Cell* 126(4):663–76.
- Tambara, Keiichi, Yutaka Sakakibara, Genichi Sakaguchi, Fanglin Lu, Goditha U. Premaratne, Xue Lin, Kazunobu Nishimura, and Masashi Komeda. 2003. "Transplanted Skeletal Myoblasts Can Fully Replace the Infarcted Myocardium When They Survive in the Host in Large Numbers." *Circulation* 108(10).
- Tang, Xian Liang, Gregg Rokosh, Santosh K. Sanganalmath, Fangping Yuan, Hiroshi Sato, Jianyao Mu, Shujing Dai, Chengxin Li, Ning Chen, Yong Peng, Buddhadeb Dawn, Greg Hunt, Annarosa Leri, Jan Kajstura, Sumit Tiwari, Gregg Shirk, Piero Anversa, and Roberto Bolli. 2010. "Intracoronary Administration of Cardiac Progenitor Cells Alleviates Left Ventricular Dysfunction in Rats with a 30-Day-Old Infarction." *Circulation* 121(2):293–305.
- Tang, Yao Liang, Yi Tang, Y. Clare Zhang, Keping Qian, Leping Shen, and M. Ian Phillips. 2005. "Improved Graft Mesenchymal Stem Cell Survival in Ischemic Heart with a Hypoxia-Regulated Heme Oxygenase-1 Vector." *Journal of the American College of Cardiology* 46(7):1339–50.
- Tang, Yao Liang, Wuqiang Zhu, Min Cheng, Lijuan Chen, John Zhang, Tao Sun, Raj Kishore, M. Ian Phillips, Douglas W. Losordo, and Gangjian Qin. 2009. "Hypoxic Preconditioning Enhances the Benefit of Cardiac Progenitor Cell Therapy for Treatment of Myocardial Infarction by Inducing CXCR4 Expression." *Circulation Research* 104(10):1209–16.
- Tauro, Bow J., David W. Greening, Rommel A. Mathias, Hong Ji, Suresh Mathivanan, Andrew M. Scott, and Richard J. Simpson. 2012. "Comparison of Ultracentrifugation, Density Gradient Separation, and Immunoaffinity Capture Methods for Isolating Human Colon Cancer Cell Line LIM1863-Derived Exosomes." *Methods* 56(2):293–304.
- Taylor, Doris A., Kelley A. Hutcheson, William E. Kraus, B. Zane Atkins, Donald D. Glower, Pinata Hungspreugs, Thomas R. Jones, and Mary C. Reedy. 1998. "Regenerating Functional Myocardium: Improved Performance after Skeletal Myoblast Transplantation." *Nature Medicine* 4(8):929-933.
- Taylor, Douglas D., Iih Nan Chou, and Paul H. Black. 1983. "Isolation of Plasma Membrane Fragments from Cultured Murine Melanoma Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 113(2):470–76.
- Taylor, Douglas D., Wolfgang Zacharias, and Cicek Gercel-Taylor. 2011. "Exosome Isolation for Proteomic Analyses and RNA Profiling." *Methods in Molecular Biology*. 728:235-246.
- Tendera, Michał, Wojciech Wojakowski, Witold Ruz'ycio, Lidia Chojnowska, Cezary Kełpka, Wiesława Tracz, Piotr Musiałek, Wiesława Piwowarska, Jadwiga Nessler, Paweł Buszman, Stefan Grajek, Piotr Brejcia, Borowicz, Marcin Majka, and Mariusz Z. Ratajczak. 2009. "Intracoronary Infusion of Bone Marrow-Derived Selected CD34⁺ CXCR4⁺ Cells and Non-Selected Mononuclear Cells in Patients with Acute STEMI and Reduced Left Ventricular Ejection Fraction: Results of Randomized, Multicentre Myocardial Regeneration by Intracoronary Infusion of Selected Population of Stem Cells in Acute Myocardial Infarction (REGENT) Trial." *European Heart Journal* 30:1313–21.
- Teng, Xiaomei, Lei Chen, Weiqian Chen, Junjie Yang, Ziying Yang, and Zhenya Shen. 2015. "Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Improve the Microenvironment of Infarcted Myocardium Contributing to Angiogenesis and Anti-Inflammation." *Cellular Physiology and Biochemistry* 37(6):2415–24.

- The Lancet Editors, The Lancet. 2014. "Expression of Concern: The SCIPIO Trial." *The Lancet* 383(9925):1279.
- Théry, Clotilde, Sebastian Amigorena, Graça Raposo, and Aled Clayton. 2006. "Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids." *Current Protocols in Cell Biology* Chapter 3(1):Unit 3.22.
- Théry, Clotilde, Muriel Boussac, Philippe Véron, Paola Ricciardi-Castagnoli, Graça Raposo, Jérôme Garin, and Sebastian Amigorena. 2001. "Proteomic Analysis of Dendritic Cell-Derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles." *The Journal of Immunology* 166(12):7309–18.
- Théry, Clotilde, Matias Ostrowski, and Elodie Segura. 2009. "Membrane Vesicles as Conveyors of Immune Responses." *Nature Reviews Immunology* 9(8):581–93.
- Théry, Clotilde, Armelle Regnault, Jérôme Garin, Joseph Wolfers, Laurence Zitvogel, Paola Ricciardi-Castagnoli, Graça Raposo, and Sebastian Amigorena. 1999. "Molecular Characterization of Dendritic Cell-Derived Exosomes: Selective Accumulation of the Heat Shock Protein Hsc73." *Journal of Cell Biology* 147(3):599–610.
- Thygesen, K., J. S. Alpert, H. D. White, A. S. Jaffe, F. S. Apple, M. Galvani, H. A. Katus, L. K. Newby, J. Ravkilde, B. Chaitman, P. M. Clemmensen, M. Dellborg, H. Hod, P. Porela, R. Underwood, J. J. Bax, G. A. Beller, R. Bonow, E. E. Van Der Wall, J. P. Bassand, W. Wijns, T. B. Ferguson, P. G. Steg, B. F. Uretsky, D. O. Williams, P. W. Armstrong, E. M. Antman, K. A. Fox, C. W. Hamm, E. M. Ohman, M. L. Simoons, P. A. Poole-Wilson, E. P. Gurfinkel, J. L. Lopez-Sendon, P. Pais, S. Mendis, J. R. Zhu, L. C. Wallentin, F. Fernandez-Aviles, K. M. Fox, A. N. Parkhomenko, S. G. Priori, M. Tendera, L. M. Voipio-Pulkki, A. Vahanian, A. J. Camm, R. De Caterina, V. Dean, K. Dickstein, G. Filippatos, C. Funck-Brentano, I. Hellems, S. D. Kristensen, K. McGregor, U. Sechtem, S. Silber, M. Tendera, P. Widimsky, J. L. Zamorano, J. Morais, S. Brener, R. Harrington, D. Morrow, U. Sechtem, M. Lim, M. A. Martinez-Rios, S. Steinhubl, G. N. Levine, W. B. Gibler, D. Goff, M. Tubaro, D. Dudek, and N. Al-Attar. 2007. "Universal Definition of Myocardial Infarction: Kristian Thygesen, Joseph S. Alpert and Harvey D. White on Behalf of the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction." *European Heart Journal* 28(20):2525–38.
- Thygesen, Kristian, Joseph S. Alpert, and Harvey D. White. 2007. "Universal Definition of Myocardial Infarction." *Circulation* 116(22):2634–53.
- Tian, Ying, Ying Liu, Tao Wang, Ning Zhou, Jun Kong, Li Chen, Melinda Snitow, Michael Morley, Deqiang Li, Nataliya Petrenko, Su Zhou, Minmin Lu, Erhe Gao, Walter J. Koch, Kathleen M. Stewart, and Edward E. Morrisey. 2015. "A MicroRNA-Hippo Pathway That Promotes Cardiomyocyte Proliferation and Cardiac Regeneration in Mice." *Science Translational Medicine* 7(279).
- Tibaut, Miha, Dusan Mekis, and Daniel Petrovic. 2017. "Pathophysiology of Myocardial Infarction and Acute Management Strategies." *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry* 14(3):150–59.
- Tillmanns, J., M. Rota, T. Hosoda, Y. Misao, G. Esposito, A. Gonzalez, S. Vitale, C. Parolin, S. Yasuzawa-Amano, J. Muraski, A. De Angelis, N. LeCapitaine, R. W. Siggins, M. Loreda, C. Bearzi, R. Bolli, K. Urbanek, A. Leri, J. Kajstura, and P. Anversa. 2008. "Formation of Large Coronary Arteries by Cardiac Progenitor Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(5):1668-1673.
- Toma, C., M. F. Pittenger, K. S. Cahill, B. J. Byrne, and P. D. Kessler. 2002. "Human Mesenchymal Stem Cells

- Differentiate to a Cardiomyocyte Phenotype in the Adult Murine Heart." *Circulation* 105(1):93-98.
- Tomita, S., R. K. Li, R. D. Weisel, D. A. G. Mickle, E. J. Kim, T. Sakai, and Z. Q. Jia. 1999. "Autologous Transplantation of Bone Marrow Cells Improves Damaged Heart Function." *Circulation* 100(2):247-256.
- Tongers, Jörn, Douglas W. Losordo, and Ulf Landmesser. 2011. "Stem and Progenitor Cell-Based Therapy in Ischaemic Heart Disease: Promise, Uncertainties, and Challenges." *European Heart Journal* 32(10):1197–1206.
- Townsend, Nick, Melanie Nichols, Peter Scarborough, and Mike Rayner. 2015. "Cardiovascular Disease in Europe - Epidemiological Update 2015." *European Heart Journal* 36(40):2696–2705.
- Trajkovic, Katarina, Chieh Hsu, Salvatore Chiantia, Lawrence Rajendran, Dirk Wenzel, Felix Wieland, Petra Schwillle, Britta Brügger, and Mikael Simons. 2008. "Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes." *Science* 319(5867):1244–47.
- Trams, Eberhard G., Carl J. Lauter, Jr Norman Salem, and Ursula Heine. 1981. "Exfoliation of Membrane Ecto-Enzymes in the Form of Micro-Vesicles." *BBA - Biomembranes* 645(1):63–70.
- Traverse, Jay H., Timothy D. Henry, Stephen G. Ellis, Carl J. Pepine, James T. Willerson, David X. M. Zhao, John R. Forder, Barry J. Byrne, Antonis K. Hatzopoulos, Marc S. Penn, Emerson C. Perin, Kenneth W. Baran, Jeffrey Chambers, Charles Lambert, Ganesh Raveendran, Daniel I. Simon, Douglas E. Vaughan, Lara M. Simpson, Adrian P. Gee, Doris A. Taylor, Christopher R. Cogle, James D. Thomas, Guilherme V. Silva, Beth C. Jorgenson, Rachel E. Olson, Sherry Bowman, Judy Francescon, Carrie Geither, Eileen Handberg, Deirdre X. Smith, Sarah Baraniuk, Linda B. Piller, Catalin Loghin, David Aguilar, Sara Richman, Claudia Zierold, Judy Bettencourt, Shelly L. Sayre, Rachel W. Vojvodic, Sonia I. Skarlatos, David J. Gordon, Ray F. Ebert, Minjung Kwak, Lemuel A. Moyé, and Robert D. Simari. 2011. "Effect of Intracoronary Delivery of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells 2 to 3 Weeks Following Acute Myocardial Infarction on Left Ventricular Function: The LateTIME Randomized Trial." *JAMA - Journal of the American Medical Association* 306(19):2110–19.
- Traverse, Jay H., Timothy D. Henry, Carl J. Pepine, James T. Willerson, Atul Chugh, Phillip C. Yang, David X. M. Zhao, Stephen G. Ellis, John R. Forder, Emerson C. Perin, Marc S. Penn, Antonis K. Hatzopoulos, Jeffrey C. Chambers, Kenneth W. Baran, Ganesh Raveendran, Adrian P. Gee, Doris A. Taylor, Ray F. Ebert, and Robert D. Simari. 2017. "TIME Trial: Effect of Timing of Stem Cell Delivery Following ST-Elevation Myocardial Infarction on the Recovery of Global and Regional Left Ventricular Function Final 2-Year Analysis." *Circulation Research* 122:479-488.
- Troyer, Deryl L. and Mark L. Weiss. 2008. "Concise Review: Wharton's Jelly-Derived Cells Are a Primitive Stromal Cell Population." *Stem Cells* 26(3):591–99.
- Tseliou, Eleni, Joseph Fouad, Heidi Reich, Leandro Slipczuk, Geoffrey De Couto, Mark Aminzadeh, Ryan Middleton, Jackelyn Valle, Liu Weixin, and Eduardo Marbán. 2015. "Fibroblasts Rendered Antifibrotic, Antiapoptotic, and Angiogenic by Priming with Cardiosphere-Derived Extracellular Membrane Vesicles." *Journal of the American College of Cardiology* 66(6):599–611.
- Turiák, Lilla, Petra Misják, Tamás G. Szabó, Borbála Aradi, Krisztina Pálóczi, Oliver Ozohanic, László Drahos, Ágnes Kittel, András Falus, Edit I. Buzás, and Károly Vékey. 2011. "Proteomic Characterization of Thymocyte-

- Derived Microvesicles and Apoptotic Bodies in BALB/c Mice." *Journal of Proteomics* 74(10):2025–33.
- Urbanek, Konrad, Marcello Rota, Stefano Cascapera, Claudia Bearzi, Angelo Nascimbene, Antonella De Angelis, Toru Hosoda, Stefano Chimenti, Mathue Baker, Federica Limana, Daria Nurzynska, Daniele Torella, Francesco Rotatori, Raffaella Rastaldo, Ezio Musso, Federico Quaini, Annarosa Leri, Jan Kajstura, and Piero Anversa. 2005. "Cardiac Stem Cells Possess Growth Factor-Receptor Systems That after Activation Regenerate the Infarcted Myocardium, Improving Ventricular Function and Long-Term Survival." *Circulation Research* 97(7):663–73.
- Urbich, Carmen, Alexandra Aicher, Christopher Heeschen, Elisabeth Dernbach, Wolf K. Hofmann, Andreas M. Zeiher, and Stefanie Dimmeler. 2005. "Soluble Factors Released by Endothelial Progenitor Cells Promote Migration of Endothelial Cells and Cardiac Resident Progenitor Cells." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 39(5):733–42.
- Valadi, Hadi, Karin Ekström, Apostolos Bossios, Margareta Sjöstrand, James J. Lee, and Jan O. Lötvall. 2007. "Exosome-Mediated Transfer of MRNAs and MicroRNAs Is a Novel Mechanism of Genetic Exchange between Cells." *Nature Cell Biology* 9(6):654–59.
- Valina, Christian, Kai Pinkernell, Yao-Hua Song, Xiaowen Bai, Sanga Sadat, Richard J. Campeau, Thierry H. Le Jemtel, and Eckhard Alt. n.d. "Intracoronary Administration of Autologous Adipose Tissue-Derived Stem Cells Improves Left Ventricular Function, Perfusion, and Remodelling after Acute Myocardial Infarction." *European Heart Journal* 28:2667-2677.
- Vandergriff, Adam, Ke Huang, Deliang Shen, Shiqi Hu, Michael Taylor Hensley, Thomas G. Caranasos, Li Qian, and Ke Cheng. 2018. "Targeting Regenerative Exosomes to Myocardial Infarction Using Cardiac Homing Peptide." *Theranostics* 8(7):1869–78.
- Varga, Zoltán, Yuana Yuana, Anita E. Grootemaat, Edwin van der Pol, Christian Gollwitzer, Michael Krumrey, and Rienk Nieuwland. 2014. "Towards Traceable Size Determination of Extracellular Vesicles." *Journal of Extracellular Vesicles* 3(1):1–10.
- Vela, Deborah C., Guilherme V. Silva, Joao A. R. Assad, Andre L. S. Sousa, Stephanie Coulter, Marlos R. Fernandes, Emerson C. Perin, James T. Willerson, and L. Maximilian Buja. 2009. "Histopathological Study of Healing after Allogenic Mesenchymal Stem Cell Delivery in Myocardial Infarction in Dogs." *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 57(2):167–76.
- Veltman, Caroline E., Osama I. I. Soliman, Marcel L. Geleijnse, Wim B. Vletter, Pieter C. Smits, Folkert J. Ten Cate, Luc J. Jordaens, Aggie H. H. M. Balk, Patrick W. Serruys, Eric Boersma, Ron T. Van Domburg, and Wim J. Van Der Giessen. 2008. "Four-Year Follow-up of Treatment with Intramyocardial Skeletal Myoblasts Injection in Patients with Ischaemic Cardiomyopathy." *European Heart Journal* 29(11):1386–96.
- Vicencio, Jose M., Derek M. Yellon, Vivek Sivaraman, Debashish Das, Claire Boi-Doku, Sapna Arjun, Ying Zheng, Jaime A. Riquelme, Jessica Kearney, Vikram Sharma, Gabriele Multhoff, Andrew R. Hall, and Sean M. Davidson. 2015. "Plasma Exosomes Protect the Myocardium from Ischemia-Reperfusion Injury." *Journal of the American College of Cardiology* 65(15):1525–36.
- Vickers, Kasey C., Brian T. Palmisano, Bassem M. Shoucri, Robert D. Shamburek, and Alan T. Remaley. 2011. "MicroRNAs Are Transported in Plasma and Delivered to Recipient Cells by High-Density Lipoproteins."

- Nature Cell Biology* 13(4):423–35.
- Vrijsen, K. R., J. P. G. Sluijter, M. W. L. Schuchardt, B. W. M. van Balkom, W. A. Noort, S. A. J. Chamuleau, and P. A. F. M. Doevendans. 2010. "Cardiomyocyte Progenitor Cell-Derived Exosomes Stimulate Migration of Endothelial Cells." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14(5):1064–70.
- Vrtovec, Bojan, Gregor Poglajen, Matjaz Sever, Luka Lezaic, Dragoslav Domanovic, Peter Cernelc, Francois Haddad, and Guillermo Torre-Amione. 2011. "Effects of Intracoronary Stem Cell Transplantation in Patients with Dilated Cardiomyopathy." *Journal of Cardiac Failure* 17(4):272–81.
- Vulliet, P. Richard, Melanie Greeley, S. Mitchell Halloran, Kristin A. MacDonald, and Mark D. Kittleson. 2004. "Intra-Coronary Arterial Injection of Mesenchymal Stromal Cells and Microinfarction in Dogs." *Lancet* 363(9411):783-784.
- Waldenström, Anders, Nina Genneback, Urban Hellman, and Gunnar Ronquist. 2012. "Cardiomyocyte Microvesicles Contain DNA/RNA and Convey Biological Messages to Target Cells" edited by G. Qin. *PLoS ONE* 7(4):e34653.
- Wang, Bo, Likui Zhang, Hao Cao, Junqi Yang, Manyu Wu, Yali Ma, Huimin Fan, Zhenzhen Zhan, and Zhongmin Liu. 2017. "Myoblast Transplantation Improves Cardiac Function after Myocardial Infarction through Attenuating Inflammatory Responses." *Oncotarget* 8(40):68780-68794.
- Wang, Jingxiong, Sui Zhang, Brian Rabinovich, Luc Bidaut, Suren Soghomonyan, Mian M. Alauddin, James A. Bankson, Elizabeth Shpall, James T. Willerson, Juri G. Gelovani, and Edward T. H. Yeh. 2010. "Human CD34+ Cells in Experimental Myocardial Infarction: Long-Term Survival, Sustained Functional Improvement, and Mechanism of Action." *Circulation Research* 106(12):1904–11.
- Wang, John C., Sharon Lise T. Normand, Laura Mauri, and Richard E. Kuntz. 2004. "Coronary Artery Spatial Distribution of Acute Myocardial Infarction Occlusions." *Circulation* 110(3):278–84.
- Wang, Leo L., Ying Liu, Jennifer J. Chung, Tao Wang, Ann C. Gaffey, Minmin Lu, Christina A. Cavanaugh, Su Zhou, Rahul Kanade, Pavan Atluri, Edward E. Morrisey, and Jason A. Burdick. 2017. "Sustained MiRNA Delivery from an Injectable Hydrogel Promotes Cardiomyocyte Proliferation and Functional Regeneration after Ischaemic Injury." *Nature Biomedical Engineering* 1(12):983–92.
- Wang, Xiaohong, Haitao Gu, Wei Huang, Jiangtong Peng, Yutian Li, Liwang Yang, Dongze Qin, Kobina Essandoh, Yigang Wang, Tianqing Peng, and Guo Chang Fan. 2016. "Hsp20-Mediated Activation of Exosome Biogenesis in Cardiomyocytes Improves Cardiac Function and Angiogenesis in Diabetic Mice." *Diabetes* 65(10):3111–28.
- Wang, Xiaohong, Qingsong Hu, Yasuhiro Nakamura, Joseph Lee, Ge Zhang, Arthur H. L. From, and Jianyi Zhang. 2006. "The Role of the Sca-1 + /CD31 – Cardiac Progenitor Cell Population in Postinfarction Left Ventricular Remodeling ." *Stem Cells* 24(7):1779–88.
- Wang, Xiaohong, Wei Huang, Guansheng Liu, Wenfeng Cai, Ronald W. Millard, Yigang Wang, Jiang Chang, Tianqing Peng, and Guo Chang Fan. 2014. "Cardiomyocytes Mediate Anti-Angiogenesis in Type 2 Diabetic Rats through the Exosomal Transfer of MiR-320 into Endothelial Cells." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 74:139–50.
- Wang, Xiaoming, Hui Zhang, Liangming Nie, Linhai Xu, Min Chen, and Zhaoping Ding. 2014. "Myogenic

- Differentiation and Reparative Activity of Stromal Cells Derived from Pericardial Adipose in Comparison to Subcutaneous Origin." *Stem Cell Research and Therapy* 5(4):92-103.
- Weber, Karl T., Yao Sun, Suresh C. Tyagi, and Jack P. M. Cleutjens. 1994. "Collagen Network of the Myocardium: Function, Structural Remodeling and Regulatory Mechanisms." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 26(3):279–92.
- Weinberger, Florian, Dennis Mehrkens, Felix W. Friedrich, Mandy Stubbendorff, Xiaoqin Hua, Jana Christina Müller, Sonja Schrepfer, Sylvia M. Evans, Lucie Carrier, and Thomas Eschenhagen. 2012. "Localization of Islet-1-Positive Cells in the Healthy and Infarcted Adult Murine Heart." *Circulation Research* 110(10):1303–10.
- Westrich, Jason, Peter Yaeger, Chufa He, Jeff Stewart, Raymond Chen, Gitta Seleznik, Shane Larson, Bruce Wentworth, Michael O'Callaghan, Sam Wadsworth, Geoffrey Akita, and Gyongyi Molnar. 2010. "Factors Affecting Residence Time of Mesenchymal Stromal Cells (MSC) Injected into the Myocardium." *Cell Transplantation* 19(8):937–48.
- White, Harvey D. 2011. "Pathobiology of Troponin Elevations." *Journal of the American College of Cardiology* 57(24):2406–8.
- White, Harvey D., Robin M. Norris, Michael A. Brown, Peter W. T. Brandt, Ralph M. L. Whitlock, and Christopher J. Wild. 1987. "Left Ventricular End-Systolic Volume as the Major Determinant of Survival after Recovery from Myocardial Infarction." *AHA Journals* 76(1):44-51.
- Wiesner, Miriam, Oliver Berberich, Christiane Hoefner, Torsten Blunk, and Petra Bauer-Kreisel. 2018. "Gap Junctional Intercellular Communication in Adipose-Derived Stromal/Stem Cells Is Cell Density-Dependent and Positively Impacts Adipogenic Differentiation." *Journal of Cellular Physiology* 233(4):3315–29.
- Will, E. 2002. "Unmodified Cre Recombinase Crosses the Membrane." 30(12):59.
- Williams, Adam R., Konstantinos E. Hatzistergos, Benjamin Addicott, Fred McCall, Decio Carvalho, Viky Suncion, Azorides R. Morales, Jose Da Silva, Mark A. Sussman, Alan W. Heldman, and Joshua M. Hare. 2013. "Enhanced Effect of Combining Human Cardiac Stem Cells and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Reduce Infarct Size and to Restore Cardiac Function after Myocardial Infarction." *Circulation* 127(2):213–23.
- Wolf, P. 1967. "The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma." *British Journal of Haematology* 13(3):269–88.
- Wollert, Kai C., Gerd P. Meyer, Joachim Lotz, Stefanie Ringes-Lichtenberg, Peter Lippolt, Christiane Breidenbach, Stephanie Fichtner, Thomas Korte, Burkhard Hornig, Diethelm Messinger, Lubomir Arseniev, Bernd Hertenstein, Arnold Ganser, and Helmut Drexler. 2004. "Intracoronary Autologous Bone-Marrow Cell Transfer after Myocardial Infarction: The BOOST Randomised Controlled Clinical Trial." *Lancet* 364(9429):141–48.
- Wubbolts, Richard, Rachel S. Leckie, Peter T. M. Veenhuizen, Guenter Schwarzmann, Wiebke Möbius, Joerg Hoernschemeyer, Jan Willem Slot, Hans J. Geuze, and Willem Stoorvogel. 2003. "Proteomic and Biochemical Analyses of Human B Cell-Derived Exosomes: Potential Implications for Their Function and Multivesicular Body Formation." *Journal of Biological Chemistry* 278(13):10963–72.

- Xiao, J., Y. Pan, X. H. Li, X. Y. Yang, Y. L. Feng, H. H. Tan, L. Jiang, J. Feng, and X. Y. Yu. 2016. "Cardiac Progenitor Cell-Derived Exosomes Prevent Cardiomyocytes Apoptosis through Exosomal MiR-21 by Targeting PDCD4." *Cell Death and Disease* 7(6):2277.
- Xu, Jun Yan, Gui Hao Chen, and Yue Jin Yang. 2017. "Exosomes: A Rising Star in Falling Hearts." *Frontiers in Physiology* 8:494.
- Xue, Tian, Hee Cheol Cho, Fadi G. Akar, Suk Ying Tsang, Steven P. Jones, Eduardo Marbán, Gordon F. Tomaselli, and Ronald A. Li. 2005. "Functional Integration of Electrically Active Cardiac Derivatives from Genetically Engineered Human Embryonic Stem Cells with Quiescent Recipient Ventricular Cardiomyocytes: Insights into the Development of Cell-Based Pacemakers." *Circulation* 111(1):11–20.
- Yamada, Tetsuya, Yasuo Inoshima, Tsukasa Matsuda, and Naotaka Ishiguro. 2012. "Comparison of Methods for Isolating Exosomes from Bovine Milk." *Journal of Veterinary Medical Science* 74(11):1523–25.
- Yamaguchi, Jun ichi, Kengo Fukushima Kusano, Osamu Masuo, Atsuhiko Kawamoto, Marcy Silver, Satoshi Murasawa, Marta Bosch-Marce, Haruchika Masuda, Douglas W. Losordo, Jeffrey M. Isner, and Takayuki Asahara. 2003. "Stromal Cell-Derived Factor-1 Effects on Ex Vivo Expanded Endothelial Progenitor Cell Recruitment for Ischemic Neovascularization." *Circulation* 107(9):1322–28.
- Yáñez-Mó, María, Pia R. M. Siljander, Zoraida Andreu, Apolonija Bedina Zavec, Francesc E. Borràs, Edit I. Buzas, Krisztina Buzas, Enriqueta Casal, Francesco Cappello, Joana Carvalho, Eva Colás, Anabela Cordeiro-Da Silva, Stefano Fais, Juan M. Falcon-Perez, Irene M. Ghobrial, Bernd Giebel, Mario Gimona, Michael Graner, Ihsan Gursel, Mayda Gursel, Niels H. H. Heegaard, An Hendrix, Peter Kierulf, Katsutoshi Kokubun, Maja Kosanovic, Veronika Kralj-Iglic, Eva Maria Krämer-Albers, Saara Laitinen, Cecilia Lässer, Thomas Lener, Erzsébet Ligeti, Aija Line, Georg Lipps, Alicia Llorente, Jan Lötvall, Mateja Manček-Keber, Antonio Marcilla, Maria Mittelbrunn, Irina Nazarenko, Esther N. M. Nolte-'t Hoen, Tuula A. Nyman, Lorraine O'Driscoll, Mireia Olivan, Carla Oliveira, Éva Pállinger, Hernando A. Del Portillo, Jaume Reventós, Marina Rigau, Eva Rohde, Marei Sammar, Francisco Sánchez-Madrid, N. Santarém, Katharina Schallmoser, Marie Stampe Ostenfeld, Willem Stoorvogel, Roman Stukelj, Susanne G. Van Der Grein, M. Helena Vasconcelos, Marca H. M. Wauben, and Olivier De Wever. 2015. "Biological Properties of Extracellular Vesicles and Their Physiological Functions." *Journal of Extracellular Vesicles* 4(2015):1–60.
- Yang, Jinfu, Wenwu Zhou, Wei Zheng, Yanlin Ma, Ling Lin, Tao Tang, Jianxin Liu, Jiefeng Yu, Xinmin Zhou, and Jianguo Hu. 2006. "Effects of Myocardial Transplantation of Marrow Mesenchymal Stem Cells Transfected with Vascular Endothelial Growth Factor for the Improvement of Heart Function and Angiogenesis after Myocardial Infarction." *Cardiology* 107(1):17–29.
- Yang, Kun, Hui-Fang Song, Sheng He, Wen-Juan Yin, Xue-Mei Fan, Feng Ru, Hui Gong, Xiao-Yan Zhai, Jie Zhang, Ze-Xu Peng, Guang-Xia Xi, Jun Xie, and Ren-Ke Li. 2019. "Effect of Neuron-derived Neurotrophic Factor on Rejuvenation of Human Adipose-derived Stem Cells for Cardiac Repair after Myocardial Infarction." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 23(9):14456.
- Yang, Yan, Yingying Li, Xiao Chen, Xiang Cheng, Yuhua Liao, and Xian Yu. 2016. "Exosomal Transfer of MiR-30a between Cardiomyocytes Regulates Autophagy after Hypoxia." *Journal of Molecular Medicine* 94(6):711–24.

- Yeh, Edward T. H., Sui Zhang, Henry D. Wu, Martin Körbling, James T. Willerson, and Zeev Estrov. 2003. "Transdifferentiation of Human Peripheral Blood CD34 + -Enriched Cell Population Into Cardiomyocytes, Endothelial Cells, and Smooth Muscle Cells In Vivo." *Circulation* 108(17):2070–73.
- Yoon, Young Sup, Andrea Wecker, Lindsay Heyd, Jong Seon Park, Tengiz Tkebuchava, Kengo Kusano, Allison Hanley, Heather Scadova, Gangjian Qin, Dong Hyun Cha, Kirby L. Johnson, Ryuichi Aikawa, Takayuki Asahara, and Douglas W. Losordo. 2005. "Clonally Expanded Novel Multipotent Stem Cells from Human Bone Marrow Regenerate Myocardium after Myocardial Infarction." *Journal of Clinical Investigation* 115(2):326–38.
- Yoshida, Tadashi, Laura Semprun-Prieto, Sergiy Sukhanov, and Patrice Delafontaine. 2010. "IGF-1 Prevents ANG II-Induced Skeletal Muscle Atrophy via Akt- and Foxo-Dependent Inhibition of the Ubiquitin Ligase Atrogin-1 Expression." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 298(5):1565-70.
- Yu, Junying, Maxim A. Vodyanik, Kim Smuga-Otto, Jessica Antosiewicz-Bourget, Jennifer L. Frane, Shulan Tian, Jeff Nie, Gudrun A. Jonsdottir, Victor Ruotti, Ron Stewart, Igor I. Slukvin, and James A. Thomson. 2007. "Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells." *Science* 318(5858):1917–20.
- Yu, Xian, Lingyan Deng, Dan Wang, Na Li, Xiao Chen, Xiang Cheng, Jin Yuan, Xingli Gao, Mengyang Liao, Min Wang, and Yuhua Liao. 2012. "Mechanism of TNF- α Autocrine Effects in Hypoxic Cardiomyocytes: Initiated by Hypoxia Inducible Factor 1 α , Presented by Exosomes." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 53(6):848–57.
- Zakharova, Liudmila, Maria Svetlova, and Alla F. Fomina. 2007. "T Cell Exosomes Induce Cholesterol Accumulation in Human Monocytes via Phosphatidylserine Receptor." *Journal of Cellular Physiology* 212(1):174–81.
- Zaruba, Marc Michael and Wolfgang Michael Franz. 2010. "Role of the SDF-1-CXCR4 Axis in Stem Cell-Based Therapies for Ischemic Cardiomyopathy." *Expert Opinion on Biological Therapy* 10(3):321–35.
- Zen, Kan, Mitsuhiro Okigaki, Yohei Hosokawa, Yasushi Adachi, Yoshihisa Nozawa, Michitaka Takamiya, Tetsuya Tatsumi, Norifumi Urao, Kento Tateishi, Tomosaburo Takahashi, and Hiroaki Matsubara. 2006. "Myocardium-Targeted Delivery of Endothelial Progenitor Cells by Ultrasound-Mediated Microbubble Destruction Improves Cardiac Function via an Angiogenic Response." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 40(6):799–809.
- Zeng, Lepeng, Qingsong Hu, Xiaohong Wang, Abdul Mansoor, Joseph Lee, Julia Feygin, Ge Zhang, Piradeep Suntharalingam, Sherry Boozer, Abner Mhashilkar, Carmelo J. Panetta, Cory Swingen, Robert Deans, Arthur H. L. From, Robert J. Bache, Catherine M. Verfaillie, and Jianyi Zhang. 2007. "Bioenergetic and Functional Consequences of Bone Marrow-Derived Multipotent Progenitor Cell Transplantation in Hearts with Postinfarction Left Ventricular Remodeling." *Circulation* 115(14):1866–75.
- Zhang, Fumin, Yijiang Chen, Zhijian Yang, Xiang Gao, Wenzhu Ma, Chuanfu Li, and Race L. Kao. 2003. "Cellular Cardiomyoplasty for a Patient with Heart Failure." *Cardiovascular Radiation Medicine* 4(1):43–46.
- Zhang, Hong Chao, Xin Bin Liu, Shu Huang, Xiao Yun Bi, Heng Xiang Wang, Li Xian Xie, Yong Qi Wang, Xiao Fang Cao, Jun Lv, Feng Jun Xiao, Yang Yang, and Zi Kuan Guo. 2012. "Microvesicles Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Stimulated by Hypoxia Promote Angiogenesis Both in Vitro and in

- Vivo." *Stem Cells and Development* 21(18):3289–97.
- Zhang, Jianfeng, Yicheng Wu, Anqing Chen, and Qiang Zhao. 2015. "Mesenchymal Stem Cells Promote Cardiac Muscle Repair via Enhanced Neovascularization." *Cellular Physiology and Biochemistry* 35(3):1219–29.
- Zhang, Jianhua, Gisela F. Wilson, Andrew G. Soerens, Chad H. Koonce, Junying Yu, Sean P. Palecek, James A. Thomson, and Timothy J. Kamp. 2009. "Functional Cardiomyocytes Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells." *Circulation Research* 104(4).
- Zhang, Jing, Feras I. Hawari, Robert D. Shamburek, Barbara Adamik, Maryann Kaler, Aminul Islam, Da Wei Liao, Farshid N. Rouhani, Matthew Ingham, and Stewart J. Levine. 2008. "Circulating TNFR1 Exosome-like Vesicles Partition with the LDL Fraction of Human Plasma." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 366(2):579–84.
- Zhang, Sui, Dachun Wang, Zeev Estrov, Sean Raj, James T. Willerson, Edward T. H. Yeh, and Robert A. Kloner. 2004. "Both Cell Fusion and Transdifferentiation Account for the Transformation of Human Peripheral Blood CD34-Positive Cells into Cardiomyocytes in Vivo." *Circulation* 110(25):3803–7.
- Zhang, Y., Z. Zhang, F. Gao, H. F. Tse, V. Tergaonkar, and Q. Lian. 2015. "Paracrine Regulation in Mesenchymal Stem Cells: The Role of Rap1." *Cell Death and Disease* 6(10).
- Zhao, Liyan, Xiaolin Liu, Yuelin Zhang, Xiaoting Liang, Yue Ding, Yan Xu, Zhen Fang, and Fengxiang Zhang. 2016. "Enhanced Cell Survival and Paracrine Effects of Mesenchymal Stem Cells Overexpressing Hepatocyte Growth Factor Promote Cardioprotection in Myocardial Infarction." *Experimental Cell Research* 344(1):30–39.
- Zhou, Pingzhu and William T. Pu. 2016. "Recounting Cardiac Cellular Composition." *Circulation Research* 118(3):368–70.
- Zhou, Sheng, Kevin D. Bunting, Anne-Marie Colapietro, John J. Morris, Brian P. Sorrentino, John D. Schuetz, Janardhan Sampath, Irina Lagutina, Gerard C. Grosveld, Mitsujiro Osawa, and Hiromitsu Nakauchi. 2001. "The ABC Transporter Bcrp1/ABCG2 Is Expressed in a Wide Variety of Stem Cells and Is a Molecular Determinant of the Side-Population Phenotype." *Nature Medicine* 7(9):1028-1034.
- Zitvogel, Laurence, Armelle Regnault, Anne Lozier, Joseph Wolfers, Caroline Flament, Danielle Tenza, Paola Ricciardi-Castagnoli, Graça Raposo, and Sebastian Amigorena. 1998. "Eradication of Established Murine Tumors Using a Novel Cell-Free Vaccine: Dendritic Cell-Derived Exosomes." *Nature Medicine* 4(5):594–600.

ANNEXES

1. Valorisation scientifique

Communication orale :

- Journées Scientifiques de l'Université de Nantes, 2 Juin 2017, Nantes : Isolation and characterisation of MuStem cell-derived extracellular vesicles : potential roles in regenerative medicine ?
- Bioregate forum, European regenerative medicine, December 2018, Nantes : Impact of the human adult muscle-derived stem cells "MuStem" in the context of myocardial infarction

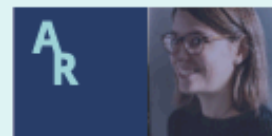
Communication écrite :

- XXX^{ème} congrès de l'AFH : les nouveaux monde de l'histologie, 23-24 Juin 2017, Nantes : Isolement et caractérisation des vésicules extracellulaires sécrétées par les cellules souches humaines MuStem : rôle potentiel en médecine régénératrice ?
- FSEV meeting, 6-7th November 2017, Paris : Isolation and Characterization of MuStem cell-derived extracellular vesicles: potential roles in regenerative medicine?
- ESCGT congress, October 2018, Lausanne : Myocardial infarct repair with human adult muscle-derived stem cells "MuStem"
- Second annual meetinf of the French Society for Stem Cell Research, 11 Décembre 2018, Nantes : Myocardial infarct repair with human adult muscle-derived stem cells "MuStem"
- International congress of Myology, March 2019, Bordeaux : Repair of myocardial infarction with human adult muscle-derived stem cells « MuStem »
- Congrès du GRRC (Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire), 1-3 Avril 2019, Lille : Repair of myocardial infarction with human adult muscle-derived stem cells « MuStem »

2. Curriculum Vitae

DOCTORANTE EN BIOLOGIE-SANTÉ

Recherche un Post-doctorat | À partir d'octobre 2019



ALICE RANNOU

2 Août 1992
Nantes, France
+33 6 19 61 83 22
rannou.alice@gmail.com
Permis B

COMPÉTENCES

Gestion de projet

Construction et gestion de projet |
Respect de la norme qualité ISO9001 | Travail
en équipe, encadrement d'étudiants | Mise en
place de collaborations

Recherche

Travail selon les BPL | Revue de la littérature
Construction et réalisation de la démarche
expérimentale | Analyse, synthèse et
présentation des résultats (français/anglais)

Communication

Scientifique (poster, oral, article et rapport
d'avancement) lors de congrès nationaux et
internationaux |
Grand public (Fête de la Science)

Techniques

Chirurgie et soins chez le rongeur | Explora-
tion vivo : ECG et échographie (rat) | Biologie
moléculaire | Biochimie, Immunohistochimie,
Microscopie | Culture cellulaire de lignées
primaires

LANGUES

Anglais | TOEIC > 900

INFORMATIQUE




Maîtrise du Pack Office |
Logiciel d'analyse d'images : ImageJ |
Logiciels de Statistiques : XlStats, Prism,
Initiation à R

POSTER AWARD

Congrès AFH | 2017

Primtemps de la Cardiologie
Lille | 2019

CENTRES D'INTÉRÊT

-  Voyages
-  Course à pied *en compétition*
-  Encadrement d'enfants en centre
aéré et colonie de vacances (BAFA)

PROFIL

Actuellement en **doctorat** en **recherche préclinique**, je souhaite poursuivre dans ce domaine qui me passionne et plus particulièrement travailler autour des **pathologies cardiovasculaires**.

Autonome Organisée Dynamique Rigoureuse Sens du collectif

EXPÉRIENCES PROFESSIONNELLES

Doctorat en charge d'un projet de recherche |

Institut du thorax, INSERM UMR 1087/CNRS6291 | UMR 703 PAnTher INRA/ONIRIS,
Nantes, France // 2016-aujourd'hui
Exploration fonctionnelle et histologique du cœur infarcié après administration des
cellules humaines MuStem dans un modèle de rat immunodéficient
Physiologie et physiopathologie du cœur | Mise en place et caractérisation d'un modèle
vivo de la pathologie | Extension du domaine d'application thérapeutique des cellules
MuStem | Travail d'équipe, collaboration avec techniciens et encadrement d'étudiants
(Master 1&2)

Chargée d'enseignement | Université de Nantes // 2017-2019

Bioinformatique et Biologie moléculaire (70 heures)
TD et TP étudiants L2 et L3

Stages de recherche | UMR 703 PAnTher, Nantes, France // 2015 et 2016

Master 1 et 2 | 2 et 6 mois
Exploration de biomarqueurs dans le diaphragme de chiens GRMD : physiopathologie
et effet de la transplantation des cellules MuStem
Physiologie et physiopathologie du muscle squelettique

Stage L3 | Institut du thorax // 2014 (200 heures)

Le syndrome du QT long et la mutation SNC5A du canal Nav1.5
Découverte du monde de la recherche en cardiovasculaire | Initiation aux bonnes
pratiques de laboratoire

FORMATION

Doctorat en biologie-santé // 2016 - aujourd'hui

Institut du thorax, INSERM UMR 1087/CNRS 6291 | UMR 703 PAnTher INRA/ONIRIS,
Nantes, France

Master Biologie, Biotechnologies et Recherche Thérapeutique //

2014 - 2016
Université de Nantes
Parcours Biothérapie de l'appareil locomoteur

Licence Biologie-Biochimie // 2012 - 2014

Université de Nantes
Parcours international (Advanced Biology Training)

DIPLÔMES ANNEXES

Expérimentation animale niveau 1 |
2017, Ecole Vétérinaire ONIRIS, Nantes, FR
Formation réglementaire à la chirurgie
expérimentale et module complémentaire :
Cathétérisation vasculaire chez la souris
2017, VETSALIUS, Nantes, FR

RÉFÉRENTS

UMR 703 | Karl Rouger & Laetitia Guevel
karl.rouger@oniris-nantes.fr
laetitia.guevel@univ-nantes.fr
Institut du thorax | Flavien Charpentier
& Gilles Toumaniantz
flavien.charpentier@univ-nantes.fr
gilles.toumaniantz@univ-nantes.fr

Titre : Cellules souches adultes MuStem humaines : étude de leur potentiel thérapeutique dans un contexte d'infarctus du myocarde et caractérisation de leurs vésicules extracellulaires

Mots clés : Réparation cardiaque, cellules hMuStem, thérapie cellulaire, vésicules extracellulaires

Résumé : L'insuffisance cardiaque est un problème majeur de santé publique dans les pays industrialisés. Sur un plan médical, sa prise en charge reste imparfaite et ne permet qu'un ralentissement de l'évolution de la maladie. Sur la base des résultats précliniques et des enseignements tirés des premiers essais cliniques chez l'Homme, l'approche de thérapie cellulaire représente une proposition thérapeutique prometteuse. Cependant une faible viabilité et une absence de prise de greffe à moyen-long terme des différents candidats cellulaires ont été observées, limitant fortement les bénéfices structurels et fonctionnels sur le cœur infarci. Nous avons successivement décrit chez le Chien puis chez l'Homme une population de cellules souches dérivées du muscle squelettique - nommées MuStem - qui présente une capacité à promouvoir la réparation des muscles squelettiques après leur administration en contexte lésionnel. Une amélioration du taux de survie, de la greffe à long terme et de la participation à la formation de fibres musculaires ont été mis en évidence comparativement aux myoblastes, premiers candidats testés en médecine réparatrice. Un remodelage tissulaire important et persistant ainsi que des bénéfices cliniques ont été décrits chez le chien dystrophique positionnant la population MuStem comme candidat thérapeutique prometteur pour les troubles musculo-squelettiques.

Cependant, son potentiel thérapeutique pour les pathologies cardiaques reste inconnu, limitant la définition de son champ d'application. L'objectif général de mon projet a été de définir si les cellules souches hMuStem peuvent s'implanter dans le tissu cardiaque en contexte pathologique, interagir avec les cellules du tissu cardiaque et impacter positivement sur la fonction. Pour cela, un protocole d'induction d'infarctus a été réalisé sur un modèle de rat immunodéficient suivi d'un protocole de xénotransplantation une semaine après. Une exploration fonctionnelle (ECG /échocardiographique), moléculaire et histologique a été mise en place. Histologiquement, une réduction de la fibrose myocardique et une augmentation de l'angiogenèse ont été observées trois semaines après la transplantation. Elle est associée à la formation de fibres musculaires squelettiques et cardiaques au niveau du tissu infarci. Une grande proportion des cellules greffées a adopté une position de cellule de réserve dans la matrice conjonctive. Sur un plan fonctionnel, une atténuation de la dilatation ventriculaire gauche et une préservation considérable de la fonction contractile ont été mises en évidence. Collectivement, les résultats suggèrent que la transplantation intramyocardique de cellules hMuStem pourrait représenter une stratégie appropriée pour le traitement de l'infarctus du myocarde.

Title : Human adult muscle-derived stem cells, hMuStem cells: study of their therapeutic potential in the context of myocardial infarction and characterization of their extracellular vesicles

Keywords : Heart repair, hMuStem cells, cell therapy, extracellular vesicles

Abstract : Myocardial infarction represents one of the leading causes of mortality and morbidity worldwide. From a medical point of view, its management remains imperfect and only allows a slowing down of the disease's course. Based on preclinical results and lessons learned from the first human clinical trials, the cell therapy approach represents a promising therapeutic proposal. However, weak viability and short-term engraftment were recorded when corresponding human cells were evaluated in clinical trials, highly limiting the structural and functional benefits of their administration in infarcted heart.

However, their ability to repair infarcted heart remained unknown, restricting their scope of application. The general objective of my project was to define if hMuStem cells can be implanted in cardiac tissue in a pathological context, interact with cardiac tissue cells and positively impact on function. To do this, an infarction induction protocol was performed on an immunodeficient rat model followed by a xenotransplantation protocol one week later. A functional (electrocardiographic/echocardiographic), molecular and histological exploration was carried out.

We have successively described in the Dog then in the Man a type of skeletal muscle-derived stem cells - we named them MuStem cells - which exhibited an interesting ability to promote repair of muscle fibers following delivery into injured context. Enhanced survival rate, long-term engraftment and participation in muscle fiber formation were reported compared to myoblasts, the first candidates tested in regenerative medicine. This led to striking and persistent tissue remodeling as well as clinical benefits, positioning them as promising therapeutic candidate for skeletal muscle disorders.

Histologically, a reduced myocardial fibrosis and an increased angiogenesis were observed three weeks post-transplantation. It was associated with skeletal and cardiac muscle fiber formation in the infarct site. A large proportion of engrafted cells adopted a reserve cell position in the conjunctive matrix. On a functional level, an attenuation of the left ventricle dilatation and a significant preservation of the contractile function have been highlighted. Overall, our results suggest that intramyocardial transplantation of hMuStem cells could represent a suitable strategy for the treatment of myocardial infarction.