

Utilisation de dérivés cellulaires d'origine cardiaque au cours de l'ischémie reperfusion et du remodelage post-ischémique

Romain Gallet de Saint-Aurin

▶ **To cite this version:**

Romain Gallet de Saint-Aurin. Utilisation de dérivés cellulaires d'origine cardiaque au cours de l'ischémie reperfusion et du remodelage post-ischémique. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2018. Français. NNT : 2018PESC0084 . tel-02382836

HAL Id: tel-02382836

https://theses.hal.science/tel-02382836

Submitted on 27 Nov 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-EST

ECOLE DOCTORALE : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

SPECIALITE : BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

THESE

Présentée

A L'UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE

FACULTE DE MEDECINE PARIS-EST

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS-EST

Par

Monsieur Romain GALLET DE SAINT-AURIN

UTILISATION DE DERIVES CELLULAIRES D'ORIGINE CARDIAQUE AU COURS DE L'ISCHEMIE REPERFUSION ET DU REMODELAGE POST-ISCHEMIQUE

Soutenue le 14 décembre 2018

JURY :

M. le Professeur Alain BERDEAUX	Président du jury
M. le Professeur Fabrice PRUNIER	Rapporteur
M. le Professeur Jérôme RONCALLI	Rapporteur
Mme. la Docteur Chantal BOULANGER	Examinateur
Mr. le Professeur Emmanuel TEIGER	Examinateur
Mr. Le Professeur Bijan GHALEH-MARZBAN	Directeur de Thèse

Remerciements

Au Pr Bijan Ghaleh-Marzban. Tu m'as fait l'honneur d'accepter de diriger cette thèse et je t'en remercie. Au-delà de cette thèse, je te remercie sincèrement pour ton aide, tes encouragements et ta bienveillance dans la conduite de ma carrière professionnelle. Ton ouverture d'esprit a par ailleurs permis de démarrer des travaux prolongeant ce travail. J'espère que ce travail sera le premier d'une longue série.

Au Pr Fabrice Prunier. Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail dans sa version préliminaire l'année dernière et de le juger maintenant dans sa version finale.

Au Pr Jérôme Roncalli. Je te remercie de me faire l'honneur de juger ce travail. Par ailleurs, je te remercie pour ta bienveillance lors des quelques échanges que nous avons eus. Tu m'as témoigné ta confiance en nous choisissant comme équipe pour le protocole MESAMI. J'espère pouvoir te rendre cette confiance.

Au Dr Chantal Boulanger. Je vous remercie de me faire l'honneur de juger ce travail.

Au Pr Alain Berdeaux. Je vous remercie de me faire l'honneur de juger ce travail. Je vous remercie également pour votre gentillesse et vos conseils avisés lors de nos différents entretiens.

Au Pr Emmanuel Teiger. Je te remercie de me faire l'honneur de juger ce travail. Tu m'as accueilli dans ton unité et m'as permis de me former à la cardiologie interventionnelle comme interne, puis comme chef de clinique et maintenant comme MCU-PH. Je te remercie pour ta patience et ton aide au quotidien.

Au Pr Eduardo Marban sans qui ce travail n'aurait jamais vu le jour. J'ai pu réaliser dans votre laboratoire des travaux dont je ne me serais jamais cru capable. Je n'oublierai jamais vos encouragements et votre bienveillance. Ces années passées aux Etats-Unis restent parmi les plus agréables de ma vie.

Au Pr Jean-Luc Dubois-Randé. Tu m'as accepté dans ton service et pris sous ton aile dès mon plus jeune âge. Tu m'as permis de m'orienter vers la cardiologie interventionnelle, et plus largement d'envisager un futur à l'hôpital Henri Mondor. Merci pour ta gentillesse et tes conseils qui sont précieux.

A Mrs. Alain Bizé et Lucien Sambin. Vous m'avez permis de reprendre une activité de recherche préclinique de la façon la plus simple et la plus agréable qui soit. Merci pour vos compétences, votre patience et votre bonne humeur. A Mme Sandrine Pons pour son aide bienveillante dans la mise en route de mes projets.

Aux personnes croisées durant ma formation et qui m'ont donné l'envie de faire de la cardiologie, notamment le Pr Pierre-Louis Michel, le Dr Nadjib Hammoudi, le Dr Jacques Schwob, le Pr Pascal Lim, le Dr Laurens Mitchell-Heggs et le Dr Aures Chaib.

A tous mes amis, trop nombreux pour être cités ici.

A mes parents, à Basile et à Noémie.

A Sophie, Arthur et Célestin qui illuminent ma vie tous les jours.

INTRODUCTION 16

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES 19

CHAPITRE 1 : PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFARCTUS DU MYOCARDE ET DE SES CONSEQUENCES 20

1. Phase précoce : ischémie et reperfusion 20
2. Les lésions d'ischémie reperfusion 21
   2.1. Mécanismes 22
   2.2. Conséquences fonctionnelles 23
3. Prolifération cellulaire et fibrose 24
4. Le remodelage inverse 25

CHAPITRE 2 : TRAITEMENT PHARMACOLOGIQUES ET MECANIQUES 27

1. Phase aiguë 27
   1.1. La reperfusion 27
   1.2. La cardioprotection 27
      1.2.1. Stratégies mécaniques 28
         1.2.1.1. Conditionnement ischémique 28
            1.2.1.1.1. Pré-conditionnement 28
            1.2.1.1.2. Post-conditionnement 29
            1.2.1.1.3. Per-conditionnement à distance 29
         1.2.1.2. Décharge ventriculaire gauche 29
      1.2.2. Stratégie pharmacologique 30
         1.2.2.1. Ciclosporine A 30
         1.2.2.2. β-bloquants 30
         1.2.2.3. Agonistes de GLP-1 31
         1.2.2.4. Autres 31
      1.2.3. Stratégies non mécaniques et non pharmacologiques 31
2. Infarctus constitué 33
   2.1. β-bloquants 33
   2.2. Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et antagonistes du récepteur AT1 de l'angiotensine II 33
   2.3. Anti-aldostérone 34

CHAPITRE 3 : THERAPIE CELLULAIRE CARDIAQUE 35

1. Définition 35
2. Types cellulaires utilisés 36
   2.1. Cellules souches embryonnaires 36

2.2. Cellules souches pluripotentes induites (IPSc) 37
2.3. Myoblastes squelettiques 37
2.4. Cellules dérivées de la moelle osseuse (hors cellules stromales mésenchymateuses) 38
2.5. Cellules stromales mésenchymateuses 39
2.6. Cellules d'origine cardiaque 40
3. Thérapie cellulaire autologue et allogénique 41
4. Modes d'administration 42
4.1. Voie intra-coronaire 42
4.2. Injection intra-myocardique par voie trans-endocardique 43
4.3. Abord chirurgical 43
4.4. Voie intra-veineuse cardiaque 44
4.5. Voie intra-veineuse périphérique 44
5. Principaux résultats dans l'infarctus du myocarde et la cardiopathie ischémique 44
5.1. Infarctus du myocarde à la phase aiguë 44
5.1.1. Cellules mononuclées de moelle osseuse 44
5.1.2. Cellules de moelle osseuse sélectionnées et cellules stromales mésenchymateuses 46
5.1.3. Infarctus constitué et insuffisance cardiaque post infarctus 47
6. Cardiosphères et cellules dérivées des cardiosphères 50
6.1. Historique 50
6.2. Méthodes d'obtention et culture cellulaire 50
6.3. Etudes pré-cliniques impliquant les cardiosphères et cellules dérivées des cardiosphères 52
6.3.1. Preuve de concept 52
6.3.2. Comparaison cardiosphère-CDCs 53
6.3.3. Comparaison CDCs, cardiosphères et autres types cellulaires 55
6.3.4. Thérapie cellulaire allogénique et post-conditionnement cellulaire 57
6.3.4.1. Thérapie cellulaire allogénique 57
6.3.4.2. Infarctus du myocarde à la phase aiguë et post-conditionnement cellulaire 59
6.4. Etudes cliniques impliquant les cellules dérivées des cardiosphères 60
7. Résultats des études dans les autres indications de thérapie cellulaire 63
7.1. Cardiomyopathie dilatée non ischémique 63
7.2. Angor réfractaire 65
8. Mécanisme d'action 66
8.1. Trans-différentiation des cellules injectées 66
8.2. Action paracrine 67

8.3. Rôle des exosomes 71
8.3.1. Définition, nomenclatures 71
8.3.2. Biogénèse et sécrétion 72
8.3.3. Composition des exosomes 73
8.3.3.1. Lipidiques membranaires 73
8.3.3.2. Protéines membranaires 73
8.3.3.3. Contenu des exosomes 73
8.3.3.4. Méthode d'isolement 74
8.3.3.5. Rôle des exosomes en pathologie cardio-vasculaire 74
8.3.3.6. Rôle des exosomes dans la thérapie cellulaire 76
PARTIE EXPERIMENTALE 82
CHAPITRE 4 : MATERIEL ET METHODES 83
1. Culture cellulaire 83
1.1. Isolation et cultures des CDCs 83
1.2. Obtention des cardiosphères et optimisation des conditions de culture 83
1.3. Isolement et caractérisation des exosomes 84
2. Modèles animaux 85
2.1. Modèle d'infarctus à sa phase aigu 85
2.1.1. Création de l'infarctus 85
2.1.2. Euthanasie et recueil des critères de jugements 86
2.2. Modèle d'infarctus constitué 87
2.3. Méthodes d'administration des cardiosphères et exosomes 88
2.3.1. Voie intra-coronaire 88
2.3.2. Injection intra-myocardique par voie épicardique 88
2.3.3. Injection intra-myocardique trans-endocardique 89
3. Plan expérimental 90
3.1. Evaluation des cardiosphères 90
3.1.1. Evaluation de la dose maximale injectable 90
3.1.2. Etude d'efficacité pré-clinique randomisée en double aveugle 90
3.2. Evaluation des effets de l'administration des exosomes 91
3.2.1. Infarctus en phase aigu 91
3.2.2. Evaluation de la rétention intra-cardiaque des exosomes 92
3.2.3. Etude d'efficacité pré-clinique randomisée dans un modèle d'infarctus constitué . 92
4. Imagerie par résonnance magnétique (IRM) 93
5. Mesure de réserve coronaire 94

6. Histologie 94
7. Quantification de la réponse immunitaire 95
8. Analyses statistiques 95

CHAPITRE 5 : EVALUATION DES CARDIOSPHERES DANS UN MODELE D'INFARCTUS CONSTITUE 97

1. Contexte 97
2. Objectifs 97
3. Plan expérimental 98
4. Résultats 99
   4.1. Optimisation des conditions de culture des cardiosphères 99
   4.2. Faisabilité et sécurité de l'injection de cardiosphères 102
   4.3. Bénéfice de l'administration des cardiosphères 104
      4.3.1. Préservation de la fonction ventriculaire gauche et diminution de la taille de l'infarctus 104
      4.3.2. Amélioration de la perfusion myocardique 108
      4.3.3. Modification histologique : fibrose, densité vasculaire et architecture myocardique 109
      4.3.4. Amélioration hémodynamique 113
5. Commentaires 116

CHAPITRE 6 : EVALUATION DE LA FAISABILITE ET DE L'EFFICACITE DE L'ADMINISTRATION DES EXOSOMES DERIVES DES CDCS 128

1. Contexte 128
2. Objectifs 129
3. Plan expérimental 129
4. Résultats 131
   4.1. Caractérisation des exosomes 131
   4.2. Phase aiguë d'infarctus 132
      4.2.1. Exosomes, taille d'infarctus et fonction ventriculaire gauche 132
      4.2.2. Rétention des exosomes 138
   4.3. Etude d'efficacité randomisée pré-clinique sur un modèle d'infarctus constitué 138
      4.3.1. Sécurité et faisabilité de l'injection des exosomes guidée par NOGA 138
      4.3.2. Préservation des volumes et de la fonction ventriculaire gauche 140
      4.3.3. Réduction de la cicatrice d'infarctus 142
      4.3.4. Histologie : fibrose, architecture et angiogenèse 144
      4.3.5. Immunogénicité 147
      4.3.6. Confirmation de l'inefficacité de l'administration intra-coronaire 149

5. Commentaires 151

DISCUSSION ET CONCLUSIONS GENERALES 163

AUTRES PUBLICATIONS ASSOCIEES.....177

REFERENCES 208

LISTE DES ABBREVIATIONS

ARN: acide ribonucléique

AAR: aire à risque

CDC : cardiosphere derived cells

CFR : *coronary flow reserve*

CK: créatine kinase

Csp : cardiosphères

ECMO : *extra-corporal membran oxygenation*

FEVG : fraction d'éjection du ventricule gauche

IC : intra-coronaire

IM : intra-myocardique

IMDM : *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*

IPSc : *induced pluripotent stem cells*

IRM : imagerie par résonnance magnétique

ISHLT: *international Society for Heart and Lung Transplantation*

IVA : artère inter-ventriculaire antérieure

MEC : matrice extra-cellulaire

MSCs : *mesenchymal stem cells*

NR : *no-reflow*

PEG : poly-ethylène glycol

PTDVG : pression télé-diastolique du ventricule gauche

Qc : débit cardiaque

RISK : *Reperfusion Injury Signaling Kinase*

SAFE : *Survival Activating Factor Enhancement*

SC : surface corporelle

Sca-1+ : *stem cell antigen 1*

SHH : *Sonic Hedgehog*

STAT : *Signal Transducer and Activator of Transcription*

TNF-α*: tumor necrosis factor alpha*

TTC : chlorure de triphényltétrazolium

TUNEL: *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*

VG : ventricule gauche

VTDVG : volume télé-diastolique du ventricule gauche

VTSVG : volume télé-systolique du ventricule gauche ; FEVG : fraction d'éjection du ventricule gauche

XO : exosomes

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Principales causes de décès dans le monde (à gauche) et en France (à droite).

Figure 2 : Evolution de la mortalité à 30 jours et à 1 an de l'infarctus du myocarde au Royaume Uni (à gauche). Evolution de la mortalité hospitalière de l'infarctus du myocarde en Ile de France (à droite) (registre CardioARSIF).

Figure 3 : Contribution des lésions de reperfusion à la taille finale de l'infarctus. D'après Yellon et collaborateurs.

Figure 4 : Mécanismes impliqués dans les lésions d'ischémie-reperfusion d'après Hausenloy et collaborateurs.

Figure 5 : Méthode d'isolement des cardiosphères et des CDCs.

Figure 6 : Principaux résultats de l'étude de Jonhston et collaborateurs ayant étudié les CDCs dans l'infarctus constitué chez le porc. La taille de l'infarctus diminue chez les animaux traités par CDCs mais pas chez les animaux contrôles (panneau de gauche). La fonction ventriculaire gauche systolique s'améliore chez les animaux traités par CDCs mais pas chez les animaux contrôles (panneau de droite). D'après Johnston et collaborateurs.

Figure 7 : Principaux résultats de l'étude CADUCEUS. La taille de l'infarctus est diminuée chez les patients traités comparativement au placebo (A). Parallèlement, la masse de l'infarctus diminue également alors que la masse viable augmente (B). Chez les patients traités cette diminution de taille d'infarctus corrèle avec l'augmentation de masse viable (C) aboutissant à une fonction systolique améliorée chez ces patients (D, E et F). D'après Malliaras et collaborateurs.

Figure 8 : Représentation schématique des différentes actions paracrines des cellules souches.

Figure 9 : Genèse et sécrétion des exosomes (Ibrahim et collaborateurs, 2016) (en rouge). Etape1 : Invagination de la membrane plasmique pour former un endosome. Etape 2 : « chargement » du contenu (protéines, ARN) par invagination dans l'endosome formant ainsi un endosome multivésiculaire. Etape 3 : maturation de l'endosome par acidification. Etape 4 : Fusion de l'endosome avec la membrane plasmique sous l'action de stimuli variés, permettant la libération extra-cellulaire des exosomes. D'après Ibrahim et collaborateurs.

Figure 10 : Isolation des exosomes sécrétés par les CDCs. (UFC : Ultra-filtration par centrifugation ; IMDM : Iscove's Modified Dulbecco's Medium).

Figure 11 : représentation schématique et photo représentative des aires à risque et non ischémique, de la zone infarcie et de la zone d'obstruction micro-vasculaire dite de « no-reflow ».

Figure 12 : Visualisation de la zone infarcie (délimitée par les pointillés) et injection intra-myocardique par voie chirurgicale après sternotomie médiane.

Figure 13 : Efficacité identique des doses de 15mg et 7.5mg d'exosomes administrées par voie intra-myocardique. Pour une même aire à risque (panneau de gauche), l'étendu du no-

reflow (panneau du milieu) et la taille de l'infarctus (panneau de droite) sont identiques. (AAR : aire à risque ; VG : ventricule gauche, NR : no-reflow ; IM : intra-myocardique ; XO : exosomes).

Figure 14 : Schéma des études de dose et d'efficacité ayant évalué les cardiosphères. (CFR : Coronary flow reserve ; Csp : Cardiosphères).

Figure 15 : (A) Représentation du protocole utilisé pour optimiser la taille de cardiosphère par optimisation des conditions de culture. (B) Taille des cardiosphères obtenues en fonction des conditions de cultures. L'augmentation de la densité de CDCs mises en culture augmente la proportion de cardiosphères > 50µm (C) alors que l'augmentation de la durée de culture augmente la proportion de cardiosphères > 150µm. Une densité de 1.5M/ boîte de 75cm² a été choisie (flèche rouge). (E) Représentation de petite, moyenne et très grosse cardiosphères. (CDC : cardiosphere derived cells).

Figure 16 : (A) Distribution de la taille des cardiosphères obtenues à partir de $12,5x10^6$ CDCs cultivées selon les conditions de cultures choisies précédemment. (B) Schéma du protocole utilisé pour évaluer la perte de cardiosphères lors de l'injection dans le microcathéter. (C) Nombre de cardiosphères comptées avant et après injection à travers le microcathéter et (D) proportion perdue en fonction de la taille des cardiosphères. Les cardiosphères de petite taille sont très peu modifiées par l'injection dans le cathéter alors que les cardiosphères de très grosse taille (>150µm) diminuent de façon importante. (CDC : cardiosphere derived cells).

Figure 17 : Après injection de doses croissantes de cardiosphères ($12,5x10^6$, $25x10^6$ et $50x10^6$ équivalents de cellules uniques), il n'a pas été observé d'altération du flux TIMI (A) de la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG) (B) ni d'élévation significative de troponine (C). De plus l'analyse histologique du cœur d'un porc injecté avec $50x10^6$ équivalents de cellules uniques n'a pas révélé de zone de nécrose myocardique (D). Chez les animaux infarcis, l'injection de $50x10^6$ équivalents de cellules uniques a provoqué une altération du flux TIMI chez 1 animal (E), sans altération de la FEVG (F), ni élévation significative de la troponine I (G) ou des CPK (H). (FEVG : fraction d'éjection du ventricule gauche ; Csp : cardiosphères ; CK : creatine kinase).

Figure 18 : (A) Images représentatives du ventricule gauche en télé-diastole et télé-systole avant et après traitement chez un porc du groupe placebo et un porc du groupe Cardiosphères. La fraction d'éjection diminue dans le groupe contrôle mais reste inchangée dans le groupe cardiosphères (B) alors que les volumes sont supérieurs dans le groupe placebo (C). La fonction contractile segmentaire des zones infarcie (D) et non infarcie (E) s'améliore chez les animaux traités mais pas chez les contrôles. (Csp : cardiosphères ; VTDVG : volume télé-diastolique du ventricule gauche ; VTSVG : volume télé-systolique du ventricule gauche ; FEVG : fraction d'éjection du ventricule gauche).

Figure 19 : Image représentative de séquence de rehaussement tardif montrant la cicatrice d'infarctus avant et après traitement chez un porc du groupe placebo et un porc du groupe cardiosphères. Variation de la masse nécrosée (B), de l'étendue de la nécrose (C) et de la masse viable (D). (Csp : cardiosphères).

Figure 20 : (A) Variation de la réserve coronaire. La réserve coronaire est significativement plus élevée après traitement chez les animaux traités par cardiosphères que chez les

animaux contrôles. (B) Variation de la perfusion myocardique mesurée en IRM (séquences de premier passage). La perfusion myocardique augmente significativement chez les animaux traités mais pas chez les contrôles. (CFR : Coronary flow reserve ; IRM : Imagerie par résonnance magnétique ; Csp : cardiosphères).

Figure 21 : (A) Images représentatives de la densité vasculaire évaluée par histologie chez un animal recevant des cardiosphères et un animal contrôle (zone bordante). (B) Densité vasculaire dans les zones infarcie, bordante et non infarcie. (C) Densité capillaire dans la zone peri-infarctus et la zone non-infarcie.

Figure 22 : (A) Coloration de la zone infarcie au rouge Sirius (1) et au trichrome de Masson (2), et de la zone bordante (3) et de la zone non infarcie (4) au rouge Sirius chez un animal contrôle et un animal traité pas cardiosphères. (B) Transmuralité de l'infarctus et contenu en collagène des zones infarcie (C), bordante (D) et non infarcie (E). (Csp : cardiosphères).

Figure 23 : Images représentatives servant à mesurer la surface transverse des cardiomyocytes (A). Surface transverse des cardiomyocytes dans les zones infarcie (B), bordante (C) et non-infarcie (D).

Figure 24 : Variations relatives du débit cardiaque (QC, en abscisse) et de la pression télé-diastolique du ventricule gauche (PTDVG, en ordonnée) dans les groupes Placebo et Cardiosphères. L'administration de cardiosphères entraîne une diminution de la PTDVG et une augmentation du débit cardiaque mais pas le placebo.

Figure 25 : (A) Infiltration cellulaire dans les zones infarcie, bordante et non infarcie : l'administration de cardiosphères cause une discrète réaction immunitaire tissulaire mais sans dommage cardiomyocytaire (grade ISHLT<2). (B) Quantification des allo-anticorps par cytométrie de flux ; une légère augmentation des allo-anticorps est observée chez les animaux traités par cardiosphères comparés aux animaux contrôles (courbe bleue) ; néanmoins ces valeurs sont nettement inférieures à celle du contrôle positif (courbe rouge).

Figure 26 : Plan experimental des études ayant évalué les exosomes. (A) : Validation de la voie d'administration dans un modèle d'infarctus aigu. (B) Etude de la rétention des exosomes dans un modèle d'infarctus aigu. (C) Etude pré-clinique randomisée dans un modèle d'infarctus constitué. (IVA : artère inter-ventriculaire antérieure ; CDC : cardiosphere derived cells ; IC : intra-coronaire ; IM : intra-myocardique ; IRM : imagerie par résonnance magnétique).

Figure 27 : Etude en phase aiguë d'infarctus. (A) Images représentatives de section myocardique visualisée sous lumière ultra-violette (après injection de thioflavine) et après marquage au TTC dans les 3 groupes. Les aires à risques (AAR) sont identiques dans les 3 groupes (B). Les exosomes administrés par voie intra-coronaire et intra-myocardique diminuent le no-reflow (NR, C) alors que seuls les exosomes injectés par voie intra-myocardique diminuent la taille de l'infarctus (D). Les exosomes administrés par voie intra-myocardique mais pas par voie intra-coronaire préservent les volumes ventriculaires gauches télé-diastolique (VTDVG, E) et télé- systolique (VTSVG, F) ainsi que la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG, G). Le suivi par bioluminescence de la distribution d'exosomes marqués avec un traceur infra-rouge (H) montre une intensité de signal plus importante avec la voie intra-myocardique (panneau de droite) qu'avec la voie intra-coronaire (panneau de gauche). Valeur de P pour la comparaison des 3 groupes en haut à

gauche de chaque figure ; valeur de P pour les comparaisons de groupes 2 à 2 en regard des barres.

Figure 28 : Etude en phase aiguë d'infarctus : apoptose et inflammation. (A) Images représentatives du marquage TUNEL mettant en évidence l'apoptose chez un animal contrôle, un animal traité par exosomes intra-coronaire (IC XO) et un animal traité par exosomes intra-myocardiques (IM XO) (zone bordante). (B) l'apoptose est diminuée dans les zones infarcie (B) et bordante (C) chez les animaux traités par voie intra-myocardique comparés au placebo et aux animaux traités par voie intra-coronaire. (D) Images représentatives du marquage CD45 mettant en évidence l'infiltration leucocytaire chez un animal contrôle, un animal traité par exosomes intra-coronaire et un animal traité par exosomes intra-myocardiques (zone bordante). L'infiltration leucocytaire est diminuée dans les zones infarcie (E) et bordante (F) chez les animaux traités par voie intra-myocardique comparés au placebo et aux animaux traités par voie intra-coronaire. Valeur de P pour la comparaison des 3 groupes en haut à gauche de chaque figure ; valeur de P pour les comparaisons de groupes 2 à 2 en regard des barres.

Figure 29 : Etude randomisée dans un modèle d'infarctus constitué. (A) Image représentative d'une cartographie NOGA. Les points noirs représentent les sites d'injection. (B) Localisation de colorant au niveau de la zone bordante de la zone infarcie, validant la technique d'injection.

Figure 30 : Etude randomisée dans un modèle d'infarctus constitué (A) Images représentatives de coupes IRM télé-diastoliques et télésystoliques avant et après traitement dans les 2 groupes. (B) Les volumes télé-diastolique et télé systolique sont préservés dans le groupe exosomes alors que le volume télé-systolique augmente dans le groupe placebo. (C) La fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG) est identique dans les 2 groupes avant traitement mais plus élevée dans le groupe exosomes après traitement. Cette différence est liée à une dégradation significative de la fraction d'éjection dans le groupe placebo mais pas dans le groupe exosomes (D). (E) Images représentatives des courbes de déformation myocardique circonférentielle après traitement dans les 2 groupes. Les valeurs de déformation sont identiques dans les 2 groupes au départ (F) mais augmentent dans le groupe traité uniquement (variation absolue (G), variation relative (H)).

Figure 31 : Etude randomisée dans un modèle d'infarctus constitué. (A) Image représentative de séquences IRM de rehaussement tardif avant et après traitement chez un animal traité par placebo et un animal traité par exosomes. La masse (B) et l'étendue (C) de la nécrose sont identiques dans les 2 groupes avant traitement puis diminuent dans le groupe exosomes mais pas dans le groupe placebo. Dans le groupe exosomes, la diminution relative de masse nécrosée est associée à une augmentation de masse viable (D).

Figure 32 : Etude randomisée dans un modèle d'infarctus constitué. (A) Images représentatives de l'ensemble des sections de cœurs d'un animal traité par placebo et d'un animal traité par exosomes. La masse de la nécrose tend à être inférieure et son l'étendue (C) et sa transmuralité (D) sont significativement inférieures dans le groupe exosomes à 1 mois post-traitement, alors que la masse viable tend à être plus importante (E).

Figure 33 : Etude randomisée dans un modèle d'infarctus constitué.

(A) Zone infarcie colorée au rouge Sirius. Le contenu en collagène des zones infarcie (B), bordante (C) et non infarcie (D) est diminuée chez les animaux traités par exosomes. (E) Surface transverse des cardiomyocytes. La surface des cardiomyocytes de la zone infarcie (F) est diminuée chez les animaux traités par exosomes alors qu'elle ne change pas dans la zone non infarcie (G). (H) Densité vasculaire dans les zones infarcie et bordante. La densité vasculaire des animaux traités par exosomes et supérieure dans les zones infarcie (I) et bordante (J), mais pas dans la zone non infarcie (K). (L) Prolifération de cardiomyocytes. La proportion de cardiomyocytes proliférant est supérieure chez les animaux traités par exosomes dans la zone peri-infarctus (M) mais pas dans la zone non infarcie (N).

Figure 34 : Etude randomisée dans un modèle d'infarctus constitué. (A) La réaction immunitaire au niveau du site d'injection ainsi que dans la zone non infarcie et non injectée n'est pas différente entre les animaux traités et les animaux contrôles. (B) Données représentatives de la quantification des allo-anticorps circulants (contrôle négatif en bleu, sérum de l'animal en rouge). Des allo-anticorps ont été détectés dans les 2 groupes avec un taux plus élevé dans le groupe exosomes.

Figure 35 : Etude randomisée dans un modèle d'infarctus constitué : changement de fonction et d'étendue de la cicatrice. Les variations de de fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG, A), de masse de la cicatrice (B) et d'étendue de la nécrose (C) mesurées par IRM des animaux traités par exosomes intra-coronaires ne sont pas différentes des animaux contrôles. En revanche la FEVG est préservée et la taille ainsi que l'étendue de la nécrose diminuent chez les animaux traités par exosomes intra-myocardiques. * $P<0.05$ vs. controle et IC exosomes.

Figure 36: Extravasation d'une cardiosphère à travers un vaisseau. A 10 minutes, la cardiosphère est bloquée dans le vaisseau. Puis à 24 heures, une poche endothéliale se forme autour de la cardiosphère permettant le passage de la cardiosphère dans le milieu extra-vasculaire à 72 heures par rupture de la paroi vasculaire (d'après Cheng et collaborateurs).

Figure 37 : Comparaison rétrospective des variations de fraction d'éjection et de taille de la cicatrice d'infarctus après l'administration de cardiosphères par voie intra-coronaire, de CDCs par voie intra-coronaire (résultats non publiés de Malliaras et collaborateurs) et d'une dose équivalente de cardiosphères par voie intra-myocardique (Yee et collaborateurs).

Figure 38 : Comparaison rétrospective de de l'effet des exosomes par voie intra-myocardique à l'effet des CDCs par voie intra-coronaire. Modèle d'infarctus aigu : les diminutions de no-reflow (A) et de taille d'infarctus (B) semblent équivalentes. Modèle d'infarctus constitué : la préservation de la fraction d'éjection (C) et la diminution de la taille de la cicatrice d'infarctus semblent au moins équivalentes. Comparaison aux résultats de Kanazawa et collaborateurs pour l'infarctus à la phase aiguë et à des résultats non publiés de Malliaras et collaborateurs pour l'infarctus constitué.

Figure 39 : Représentation schématique de l'action des exosomes de cellules souches sur les fibroblastes d'après Tseliou et collaborateur).

Tableau 1 : Principales stratégies cardioprotectrices pharmacologiques testées chez l'Homme. D'après Leffer et collaborateurs.

Tableau 2 : Exemples d'effets cardio-vasculaires des exosomes. D'après Barile et collaborateurs.

Tableau 3 : Caractéristiques IRM des porcs avant traitement (3-4 semaines après infarctus). (Csp : cardiosphères. VTDVG : volume télé-diastolique du ventricule gauche ; VTSVG : volume télé-systolique du ventricule gauche ; FEVG : fraction d'éjection du ventricule gauche).

Tableau 4 : Caractéristiques hémodynamiques des animaux traités et contrôles avant traitement et 1 mois après traitement. (PTDVG : pression télé-diastolique du ventricule gauche ; QC : débit cardiaque ; PAS : pression artérielle systolique ; PAD : pressions artérielle diastolique ; FC : fréquence cardiaque).

INTRODUCTION

Les maladies cardio-vasculaires (et notamment l'infarctus du myocarde) sont la première cause de mortalité dans le monde (Figure 1)[1]. En France on dénombre environ 120000 Infarctus du myocarde par an parmi lesquels 15% seront fatals. Cette maladie est donc une vraie priorité de santé publique et ce d'autant plus que la nécrose myocardique post-infarctus va, chez de nombreux patients, être responsable d'une insuffisance cardiaque à l'origine d'hospitalisations répétées. Les facteurs de risque de la maladie coronaire et de l'infarctus du myocarde sont maintenant bien connus et identifiés grâce notamment à l'étude Framingham. La diminution de la prévalence de certains de ces facteurs de risque (tabac) est actuellement contrebalancée par l'augmentation d'une part des facteurs de risques « métaboliques » liés au mode de vie occidental et l'augmentation importante de la prévalence de l'obésité, et d'autre part par le vieillissement de la population, si bien que le nombre d'infarctus du myocarde survenant en France diminue moins qu'attendu.

L'avènement de la reperfusion myocardique a permis une diminution importante de la mortalité liée à l'infarctus. Néanmoins la mortalité et la morbidité de l'infarctus tendent à diminuer moins ces dernières années (Figure 2), rendant nécessaire le développement de traitements adjuvants[2].

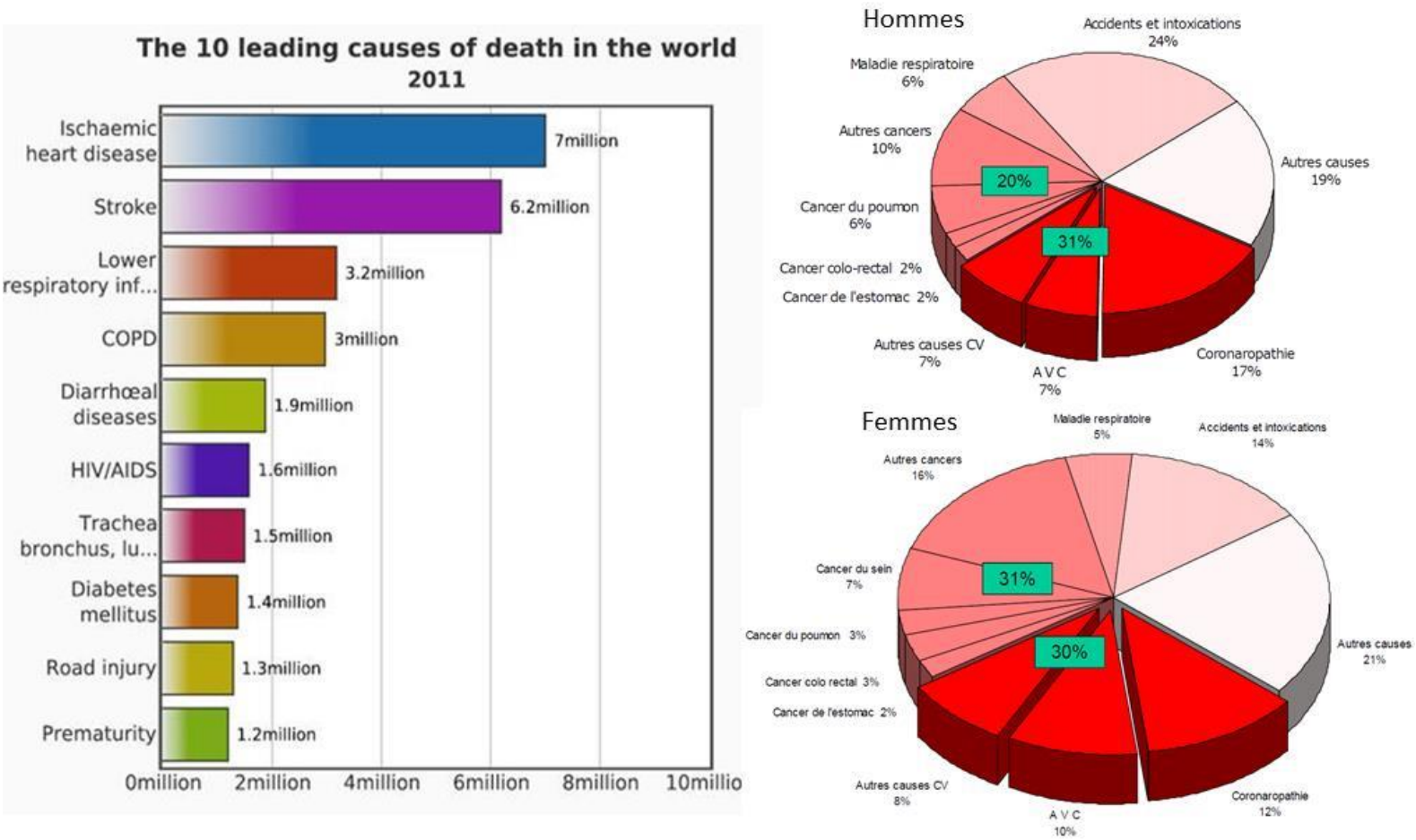


Figure 1 : Principales causes de décès dans le monde (à gauche) et en France (à droite)

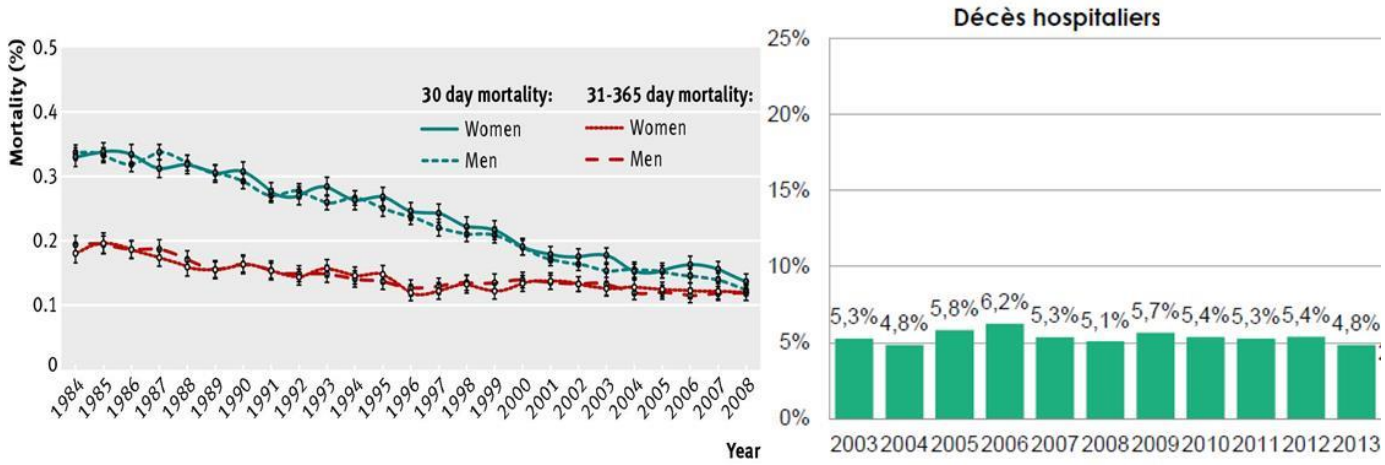


Figure 2 : Evolution de la mortalité à 30 jours et à 1 an de l'infarctus du myocarde au Royaume Uni (à gauche)[2]. Evolution de la mortalité hospitalière de l'infarctus du myocarde en Ile de France (à droite) (registre CardioARSIF).

Parmi les principaux facteurs de risque d'évolution défavorable à long terme se trouvent la taille de l'infarctus et l'étendue de l'obstruction micro-vasculaire[3-5]. L'amélioration de la prise en charge visant à diminuer ces deux éléments pourrait permettre une réduction de la mortalité et de la morbidité de l'infarctus du myocarde. Ceux-ci étant étroitement liés aux conditions de prise en charge initiale et de reperfusion, les actions à mener concernent les premières heures suivant la survenue de l'occlusion coronaire. Malheureusement, depuis l'avènement de la reperfusion, la quasi-totalité des stratégies adjuvantes visant à réduire la taille de l'infarctus se sont soldées par un échec[6].

Dans ce contexte une stratégie innovante, la thérapie cellulaire, a émergé il y a quelques années[7]. Cette stratégie pourrait permettre d'une part de diminuer la taille de l'infarctus lors de la prise en charge à la phase aiguë mais également de diminuer la taille de la zone cicatricielle dans un infarctus constitué. Un des types cellulaires étudiés dans cette indication est issu du tissu cardiaque[8]. Cette population cellulaire peut se présenter comme des assemblages tridimensionnels de cellules appelés les cardiosphères ou sous la forme de cellules uniques appelées les cellules dérivées des cardiosphères. Ces cellules sont prometteuses mais certaines incertitudes demeurent concernant d'une part la possibilité d'utilisation de ces groupement cellulaires tridimensionnels et d'autre part les mécanismes d'action de ces cellules et notamment le rôle des exosomes.

Dans ce contexte, notre objectif a été dans un premier temps d'évaluer la faisabilité et l'efficacité de l'administration de ces cardiosphères tridimensionnelles. Dans un deuxième temps, nous avons évalué la possibilité d'utiliser uniquement les exosome secrétés par cette population cellulaire. Toutes les expériences ont été réalisées sur des modèles pré-cliniques porcins d'infarctus du myocarde.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE 1 : PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFARCTUS DU MYOCARDE ET DE SES CONSEQUENCES

1. Phase précoce : ischémie et reperfusion

L'infarctus du myocarde est généralement lié à l'occlusion d'une artère coronaire, en rapport avec la rupture d'une plaque d'athérosclérose, entraînant la libération de matériel pro-thrombotique en provenance du cœur de la plaque. La libération de ce matériel pro-thrombotique va activer l'hémostase primaire puis secondaire et entraîner une occlusion de la lumière artérielle. L'occlusion de l'artère coronaire va être responsable d'une ischémie myocardique liée à l'interruption de l'apport en oxygène au myocarde du fait de l'occlusion coronaire. Cette ischémie va rapidement aboutir à une mort cardiomyocytaire dès quelques minutes d'occlusion[9]. La nécrose va tout d'abord intéresser les couches les plus endocardiques, plus vulnérables (car aux capacités d'adaptation moindre à la baisse de pression de perfusion et à la consommation en oxygène plus élevée) puis s'étendre vers les couches myocardiques épicardiques. Elle va être liée à l'absence de possibilité de synthèse d'ATP et à des déséquilibres de l'homéostasie cellulaire aboutissant notamment à une baisse du pH et à l'accumulation de calcium aboutissant à la mort cellulaire. A ces phénomènes vont s'associer un état pro-inflammatoire rendant les cellules plus vulnérables[10,11].

Dans les 24 heures suivant l'infarctus et sa reperfusion va survenir une phase inflammatoire impliquée dans un processus de réparation tissulaire[11,12]. Cette phase inflammatoire va être liée au recrutement de polynucléaires neutrophiles et de macrophages qui vont initialement avoir une activité pro-inflammatoire permettant la détersion de la zone endommagée. Si cette phase est nécessaire à la cicatrisation de la zone infarcie, l'accumulation de ces cellules inflammatoires va entraîner une réaction locale importante pouvant conduire à la mort de cardiomyocytes supplémentaires directement ou par apoptose.

2. Les lésions d'ischémie reperfusion

Le meilleur moyen de limiter les dommages myocardiques est de réouvrir l'artère occluse afin de reperfuser le territoire ischémié. Néanmoins, cette reperfusion va dans de nombreux cas être responsable de lésions qui lui sont propres, appelées lésions de reperfusion[9,13,14]. Ces lésions d'ischémie reperfusion sont donc définies comme des lésions myocardiques induites par la restauration du flux coronaire après un épisode ischémique. Ces lésions vont induire la mort de cardiomyocytes qui étaient viables avant la reperfusion, de sorte que certains auteurs proposent que jusqu'à 50% des lésions myocardiques survenant lors d'un infarctus pourraient être liées à la reperfusion (Figure 3). Ce phénomène explique en partie pourquoi malgré les progrès de la médecine et l'amélioration notable des délais de reperfusion, la mortalité et la morbidité de l'infarctus du myocarde restent élevées.

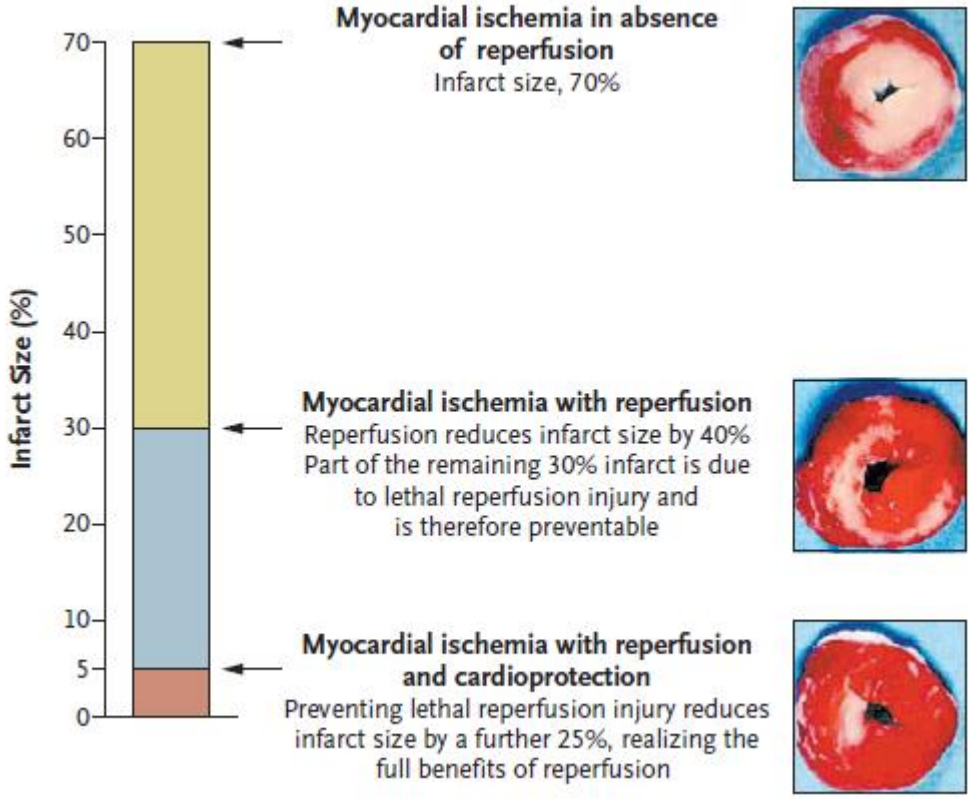


Figure 3 : Contribution des lésions de reperfusion à la taille finale de l'infarctus. D'après Yellon et collaborateurs[9].

2.1. Mécanismes

La réalité des lésions de reperfusion a longtemps été débattue jusqu'aux études de post-conditionnement ischémique démontrant que la modification des conditions de reperfusion pouvait modifier la taille de l'infarctus [15,16] .

Ces lésions de reperfusion vont être liées à plusieurs facteurs intriqués parmi lesquels figurent au premier plan la surcharge calcique, l'accumulation de dérivés radicalaires de l'oxygène et l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale[9-11].

Lors de l'ischémie, le métabolisme de la cellule va basculer du mode aérobie vers le mode anaérobie. Ceci va entraîner *in fine* la genèse d'acide lactique responsable d'une diminution du pH intra-cellulaire. Cette diminution du pH va être en partie contrebalancée par l'activité de pompes ioniques H^+/Na^+ et Na^+/Ca^{2+} permettant de sortir des ions H^+ de la cellule mais au prix d'une surcharge sodique importante qui devient secondairement calcique du fait de l'intervention de la pompe Na^+/Ca^{2+}[9-11,17].

Lors de la réoxygénation du myocarde, plusieurs phénomènes vont se produire (Figure 4). De l'oxygène va être de nouveau fourni aux mitochondries. Or celles-ci ayant été endommagées par la période d'ischémie seront incapables d'utiliser correctement cet oxygène et au lieu de fournir de l'ATP, vont générer des dérivés radicalaires de l'oxygène[18]. En parallèle, le rétablissement de l'activité normale des pompes échangeuses d'ions va aboutir à une normalisation très rapide du pH intra-cellulaire qui sera associée à une aggravation de la surcharge calcique[19]. Cette surcharge calcique massive associée à la présence de dérivés radicalaires de l'oxygène va entraîner l'ouverture dans la membrane externe du pore de transition de perméabilité mitochondriale. L'ouverture de ce pore sera à l'origine d'un gonflement puis d'une altération des mitochondries puis de la mort cellulaire par apoptose ou nécrose. A ces phénomènes vont se surajouter des phénomènes inflammatoires ; en raison de l'infarctus mais également de la genèse des espèces radicalaires de l'oxygène à la reperfusion, il va se produire un afflux de cellules inflammatoires (polynucléaires neutrophiles et macrophages) qui vont, d'une part, entraîner un cercle vicieux en synthétisant à leur tour des dérivés radicalaires de l'oxygène, et d'autre part provoquer une inflammation locale importante[12,20]. Cette inflammation locale va avoir des conséquences sur les vaisseaux (vasospasme, œdème, micro-emboles), en participant au

phénomène d'obstruction micro-vasculaire ou *no-reflow* en association notamment avec les phénomènes emboliques, thrombotiques et spastiques[14,21]. Par ailleurs, cette inflammation va entraîner l'apoptose des cardiomyocytes. La quantité de cellules inflammatoires localisées principalement au niveau de la zone bordante entre tissu nécrosé et tissu sain va croître jusqu'à la fin de la première semaine, puis décroître.

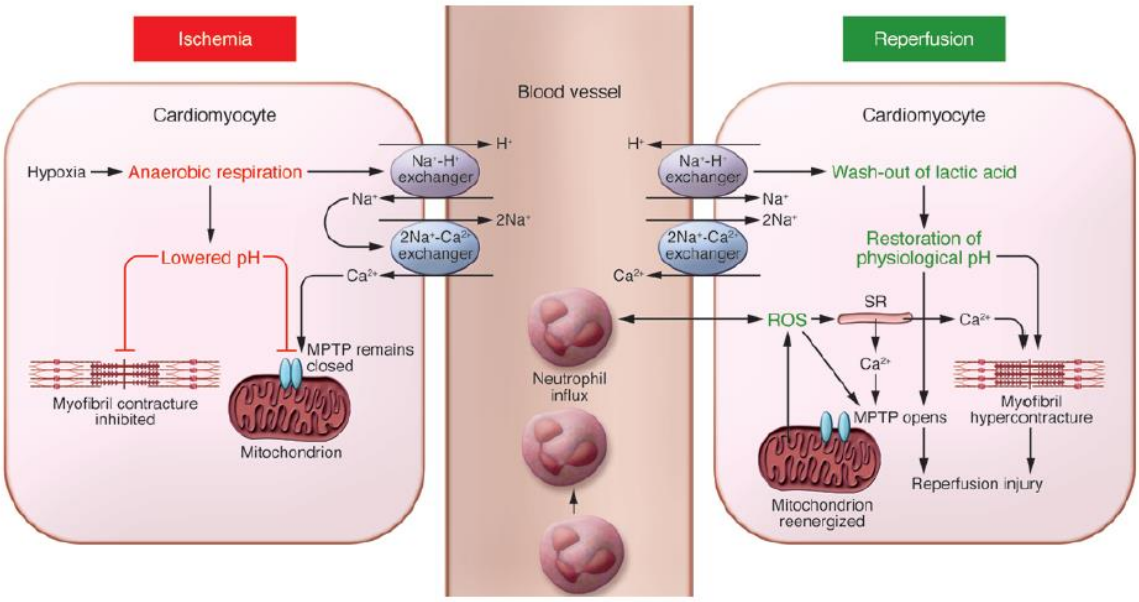


Figure 4 : Mécanismes impliqués dans les lésions d'ischémie-reperfusion d'après Hausenloy et collaborateurs[17].

2.2. Conséquences fonctionnelles

Outre l'aggravation de la nécrose par mort directe de cardiomyocytes liée aux phénomènes décrits précédemment, la reperfusion va être à l'origine de trois autres phénomènes. Le premier est la sidération myocardique. Cette sidération myocardique est définie comme la persistance d'une dysfonction myocardique malgré l'absence de dommages irréversibles et la restauration d'un flux coronaire[22]. Cette sidération peut être due en partie à la surcharge calcique importante altérant les propriétés contractiles et de relâchement du myocarde. L'évolution de la sidération myocardique est généralement

favorable en plusieurs heures ou jours. La seconde conséquence clinique est la survenue de phénomènes d'obstruction micro-vasculaire ou no-reflow, définis par l'absence de reperfusion d'une zone ischémique malgré la levée de l'obstacle[14,21,23]. Ce phénomène est lié à l'obstruction et la perte de perméabilité de tous les vaisseaux formant la micro-circulation en rapport avec plusieurs facteurs parmi lesquels l'embolisation distale de fragments thrombotiques, le spasme artériel lié à l'inflammation, les dommages endothéliaux, la surcharge calcique, l'œdème des tissus périphériques et la disparition de la perméabilité endothéliale. Cette obstruction va aboutir à l'aggravation des lésions de par la mauvaise reperfusion induite, ce qui en fait un des principaux facteurs de mauvais pronostic dans l'infarctus du myocarde. Enfin la reperfusion fait le lit d'arythmies de reperfusion pouvant dans les cas extrêmes conduire à l'arrêt cardiaque par trouble du rythme ventriculaire ou asystolie[24].

3. Prolifération cellulaire et fibrose

Suite à la phase inflammatoire ayant permis la détersion des débris cellulaires, va survenir une phase proliférative associée à la différentiation de fibroblastes en myofibroblastes[25-29]. En effet, sous l'influence de facteurs de croissance et de cytokines sécrétés par les monocytes (notamment le TGF-β), les fibroblastes vont proliférer et se différencier en myofibroblastes qui vont synthétiser du collagène pour reformer une matrice extracellulaire ayant pour but de consolider la paroi nécrosée afin d'éviter sa rupture[26,30,31]. Un mois après l'infarctus, on ne retrouve pratiquement plus de cellules inflammatoires et les myofibroblastes ont envahi la totalité de la zone infarcie. Cette phase va aboutir à la constitution d'une zone cicatricielle dense non contractile composée majoritairement de matrice extra-cellulaire riche en collagène de type 1, de myofibroblastes et de néo-vaisseaux (liés au recrutement de progéniteurs endothéliaux). Si cette phase de réparation est nécessaire à la solidification de la zone infarcie afin d'éviter une déformation anévrismale ou, dans le pire des cas, une rupture de paroi, elle va former une zone non contractile et amincie. Cette zone amincie va également s'étirer du fait de la dilatation du ventricule gauche. Ce phénomène d'étirement-amincissement est appelé expansion de la zone infarcie[32-34].

4. Le remodelage inverse

Le remodelage cardiaque va consister en des modifications de taille, de forme et de fonction du cœur dans les suites de l'infarctus.

Le remodelage inverse va se faire en plusieurs phases. La première étape survient très précocement, dans les premières heures suivant l'infarctus. On assiste à un étirement de la zone infarcie associé à son amincissement, ce phénomène étant appelé expansion de l'infarctus[32-34]. La dysfonction ventriculaire gauche induite par la perte de fonction contractile d'une partie du myocarde entraîne une dilatation du ventricule gauche visantà maintenir le débit cardiaque. Celle-ci provoque une augmentation des contraintes pariétales entraînant un étirement des zones nécrosées et non nécrosées. Sur le plan architectural, on observe une extension de la zone infarcie et un remaniement de la matrice extra-cellulaire liée à l'activation des métalloprotéinases[28,35]. En effet, dans les premiers jours qui suivent l'infarctus, la nécrose des myocytes et leur détersion par les cellules inflammatoires prédominent[29]. Ces phénomènes impliquent la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) et la mise en place d'une fibrose substitutive[28,35]. La dégradation précoce de la matrice par les métallo-protéinases permet l'infiltration des cellules inflammatoires participant à la détersion du tissu nécrotique et à la cicatrisation.

En parallèle on observe une baisse de la pression artérielle moyenne liée à la baisse du débit cardiaque et des résistances. Elle s'accompagne d'une activation des systèmes neuro-hormonaux (catécholamines et système rénine-angiotensine-aldostérone) dont le but principal est de maintenir la pression à un niveau normal. Les facteurs mécaniques et neuro-hormonaux déclenchent presque immédiatement le remodelage des régions nécrosées et non nécrosées. Si les processus adaptatifs l'emportent, l'activation neuro-hormonale décroît et l'on entre dans une phase de remodelage compensé au cours de laquelle les contraintes sont plus ou moins normalisées. A plus long terme, notamment en cas d'infarctus sévère, on va observer une poursuite de la dilatation ventriculaire et ce, malgré la cicatrisation de la zone infarcie qui est alors devenu résistante à l'étirement. Si, au contraire, la dilatation ventriculaire et la baisse de la pression artérielle moyenne persistent, l'évolution se fait vers l'insuffisance cardiaque chronique, caractérisée par la persistance de l'élévation des contraintes mécaniques, de l'activation des systèmes neuro-hormonaux et l'exacerbation du

remodelage. Toutes les interventions thérapeutiques de la phase aiguë des syndromes coronariens et ultérieures tentent de diminuer le processus fibrosant, de normaliser les contraintes mécaniques et de bloquer l'activation des systèmes neuro-hormonaux ou leurs effets délétères sur le myocarde. Ceci a pour but d'éviter l'évolution vers l'insuffisance cardiaque où l'élévation des contraintes altère encore davantage la fonction ventriculaire, avec comme conséquence une majoration de l'activation des systèmes neuro-hormonaux, et donc une aggravation des contraintes mécaniques et du remodelage délétère.

CHAPITRE 2 : TRAITEMENT PHARMACOLOGIQUES ET MECANIQUES

1. Phase aiguë

1.1. La reperfusion

Jusqu'à l'avènement de la reperfusion précoce, le pronostic de l'infarctus du myocarde était dramatique. En effet, en l'absence de reperfusion par réouverture de l'artère occluse, la nécrose va augmenter jusqu'à concerner la quasi-totalité du territoire « à risque », c'est-à-dire en aval de cette occlusion. Au milieu-fin des années 80, l'apparition de la reperfusion par et surtout le développement de la thrombolyse pré-hospitalière ont permis de diminuer drastiquement la mortalité de l'infarctus du myocarde[36]. Cette fibrinolyse réalisée par RTPase ou Tenecteplase, n'est efficace que dans les premières heures suivant l'occlusion artérielle, et permet de limiter la perte de cardiomyocytes par un rétablissement du flux sanguin. Les inconvénients de la fibrinolyse sont qu'elle n'est pas systématiquement efficace, que son efficacité diminue avec la durée de l'occlusion, et surtout que ces agents thrombolytiques très puissants exposent à risque non négligeable de complications hémorragiques sévères. Pour pallier à ces problèmes, une autre stratégie qu'est l'angioplastie primaire a été développée. Cette dernière consiste en la réouverture mécanique en urgence de l'artère par aspiration du caillot ou gonflement d'un ballon. Cette technique a montré de meilleurs résultats que la fibrinolyse conduisant la mise en place de circuits de prise en charge dédiés visant à réduire au maximum le délai de réouverture de l'artère[37,38]. En association à ces techniques, une association de traitement anti-agrégants plaquettaires et anti-coagulants est administrée afin de réduire au maximum le risque de réocclusion.

1.2. La cardioprotection

Comme décrit précédemment, la réouverture de l'artère et la réoxygénation brutale du myocarde qui va en découler va être à l'origine de lésions de reperfusion. La prévention

et le traitement de ces lésions de reperfusion sont un des objectifs et des enjeux majeurs de la cardiologie depuis l'avènement de la reperfusion. Plusieurs stratégies ont été testées jusqu'à présent avec, dans la plupart des cas, des résultats décevants lors de la translation à l'Homme.

1.2.1. Stratégies mécaniques

1.2.1.1. Conditionnement ischémique

1.2.1.1.1. Pré-conditionnement

Le pré-conditionnement ischémique a été mis en évidence pour la première fois par Murry et collaborateurs en 1986 qui ont montré que la réalisation de 5 cycles d'occlusion coronaire alternés avec 5 cycles de reperfusion avant une occlusion coronaire de 40 minutes diminuait de façon importante la taille de l'infarctus[39]. Néanmoins, le bénéfice de ce pré-conditionnement ischémique était perdu si la durée de l'occlusion coronaire était de 3 heures confirmant la nécessité d'une reperfusion rapide. Les mécanismes biologiques et moléculaires impliqués dans le phénomène de pré-conditionnement ont depuis été largement étudiés et il y a maintenant des milliers d'études décrivant >100 molécules et mécanismes impliqués[6,40]. De façon globale, il y a trois étapes de transmission de ces signaux cardioprotecteurs : le signal initial, la cascade d'amplification et l'effecteur final. Le signal initial déclenchant est un ou plusieurs médiateurs tels que l'adénosine, la bradykinine ou des opiacés, qui sont synthétisés et libérés par plusieurs types cellulaires (cardiomyocytes, cellules endothéliales et cellules inflammatoires). Ces médiateurs vont activer le récepteur membranaire sarcolemnal déclenchant ainsi une cascade de signalisation intra-cellulaire qui va au final agir sur certains composants intra-cellulaires tels que les mitochondries et le cytosquelette, stabilisant ainsi ces structures fragilisées par l'ischémie et prévenant la mort cellulaire. Malgré la multiplicité des mécanismes décrits, trois cascades d'activation intra-cellulaires prédominent. Tout d'abord la voie RISK (*Reperfusion Injury Signaling Kinase*) qui est activée par un récepteur couplé à une protéine G aboutissant entre autres à l'activation de la PI3K et à la phosphorylation d'Akt et Erk1/2. La deuxième voie est la voie SAFE (*Survival Activating Factor Enhancement*) qui est activée par le TNFα et va aboutir à l'activation de plusieurs facteurs de transcription par le biais de STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) qui vont notamment agir sur les mitochondries. Enfin, la troisième voie

recoupe la première et implique le NO ainsi que la protéine kinase G. Elle peut être activée entre autres par les peptides natriurétiques et débouche sur l'activation de Akt.

1.2.1.1.2. Post-conditionnement

Le principal inconvénient du pré-conditionnement est son absence d'applicabilité à la pratique clinique. En effet, le principe même de la technique nécessite de réaliser le conditionnement dans les minutes précédant la survenue d'un infarctus, évènement impossible à prévoir et anticiper. Pour pallier à cette absence de possibilité de translation, Vinten-Johansen et collaborateurs ont émis l'hypothèse que la reperfusion graduelle pouvait apporter le même bénéfice[41]. Il s'agit du post-conditionnement qui consiste en la réalisation d'épisodes répétés d'ischémie brève par gonflement d'un ballon dans les minutes suivant la réouverture de l'artère. La capacité du post-conditionnement à diminuer la taille de l'infarctus a été démontré dans plusieurs espèces y compris chez l'Homme mais les études cliniques n'ont pas montré d'effet probant[42,43].

1.2.1.1.3. Per-conditionnement à distance

Pour essayer de combiner les avantages du pré-conditionnement avec la faisabilité du post-conditionnement, une autre approche a été développée. Il s'agit du per-conditionnement à distance qui consiste à appliquer des périodes d'ischémie brèves et répétées dans une zone autre que la zone ischémique (en général un des membres)[43]. Certaines des voies de signalisation activées lors du per-conditionnement à distance pourraient être communes à celles du pré- et du post-conditionnement permettant d'obtenir un bénéfice sur la taille de l'infarctus[40,44]. D'autres voies sont également impliquées (voie neuronale, action des micro-ARN contenus dans les exosomes…) [45]. Néanmoins, les résultats des grandes études sont encore une fois décevants en termes de bénéfice clinique[46,47].

1.2.1.2. Décharge ventriculaire gauche

Une des stratégies mécaniques de réduction de la taille de l'infarctus est d'utiliser des dispositifs d'assistance ventriculaire gauche pour diminuer la charge ventriculaire gauche, la contrainte pariétale et la consommation ventriculaire gauche en oxygène. Deux types de

dispositifs ont été testées jusqu'à présents chez l'animal. Il s'agit de l'«*Extra Corporal Membran Oxygenation »* (ECMO) et de la pombe co-axiale avec visse d'Archimède (Impella®)[48-52]. Ces deux dispositifs permettent de réduire la taille de la nécrose myocardique lorsque le ventricule gauche est déchargé avant la reperfusion. Néanmoins, le caractère invasif de ces 2 dispositifs rend la translation de ces techniques difficile.

1.2.2. Stratégie pharmacologique

1.2.2.1. Ciclosporine A

Comme décrit précédemment, l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale est un des phénomènes majeurs impliqué dans la survenue des lésions de reperfusion. Par conséquent, il semble raisonnable de penser que l'inhibition de l'ouverture du pore de transition pourrait permettre une diminution des lésions de reperfusion. Une des stratégies proposée pour atteindrez ce but repose sur l'inhibition d'un de ses modulateurs, la cyclophiline D. Dans des modèles animaux, l'inhibition génétique ou pharmacologique de la cyclophiline D diminue les lésions de reperfusion. D'un point de vue translationnel, la ciclosporine A est un inhibiteur de la cyclophiline D. Ce médicament déjà utilisé et commercialisé chez l'Homme comme immunosuppresseur dans les greffes d'organes notamment a donc pu être facilement évalué dans la prévention des lésions d'ischémie reperfusion. Si les résultats de l'étude de phase II étaient prometteurs avec une diminution de la taille d'infarctus (mesurée par IRM et par l'élévation des enzymes)[53], les résultats d'une étude de phase III randomisée multicentrique en double aveugle sont négatifs[54]. En effet la ciclosporine administrée per-reperfusion ne réduisait pas l'incidence des évènements cardio-vasculaires. Néanmoins cette voie n'est pas complétement enterrée puisque des inhibiteurs plus sélectifs de la cyclophiline D sont actuellement en développement.

1.2.2.2. β-bloquants

Stratégie de choix avant l'ère de la reperfusion, les β-bloquants connaissent actuellement un regain d'intérêt à la phase aiguë d'infarctus. En effet, plusieurs études récentes ont démontré que l'administration de métoprolol en phase aiguë d'infarctus permet de diminuer la taille de la nécrose[55,56]. De plus, il semble que le bénéfice est d'autant plus important que le métoprolol est administré précocement. Le mécanisme par lequel le métoprolol diminue la taille de l'infarctus est probablement lié à plusieurs phénomènes.

D'une part, le métoprolol pourrait réduire les dommages liés à l'ischémie en diminuant la consommation myocardique d'oxygène. D'autre part le métoprolol diminue les lésions de reperfusion en diminuant les interactions plaquettes polynucléaires-neutrophiles à la reperfusion par une action directe sur ces derniers dont il va inhiber la migration et les modifications de structures[57].

1.2.2.3. Agonistes de GLP-1

Les agonistes de GLP-1 au premier rang desquels l'exénatide, ont montré leur capacité à diminuer la taille de l'infarctus dans des modèles animaux mais également chez l'Homme[58-61]. Pour obtenir cet effet, l'administration d'exénatide doit être débuté 15 minutes avant la reperfusion et poursuivie plusieurs heures après la reperfusion. Plusieurs mécanismes sont potentiellement impliqués dans les effets cardioprotecteurs de l'exénatide. Tout d'abord, l'exénatide va entraîner un passage du métabolisme cardiaque des acides gras vers le métabolisme du glucose. Le métabolisme du glucose étant plus efficace en termes de consommation d'oxygène, ce changement de métabolisme entrainera une diminution de la consommation myocardique en oxygène. Par ailleurs, l'exénatide va potentiellement réduire l'apoptose des cardiomyocytes ainsi que le stress oxydant. En effet, Il a été observé un effet cardioprotecteur de la GLP-1 sur des cœurs de rats par le biais d'une activation des kinases protectrices PI3K/Akt, p42/44, PKA et P70s6K.

1.2.2.4. Autres

Comme le montre le tableau 1, plusieurs autres stratégies ont été testées chez l'Homme avec comme principal point commun, l'échec de réduction de la taille de l'infarctus dans des larges populations humaines. Parmi ces stratégies, il convient de citer les substances vasodilatatrices telles que l'adénosine, les dérivés nitrés et les inhibiteurs calciques.

1.2.3. Stratégies non mécaniques et non pharmacologiques

Il convient de citer parmi ces stratégies l'hypothermie dont les effets sur la taille de l'infarctus sont nets lorsque cette hypothermie est induite en amont de la reperfusion[62]. Néanmoins les contraintes médicales (nécessité d'une anesthésie générale) et techniques (nécessité de refroidissement pré-hospitalier) de cette approche rendent sa translation pour l'heure difficile.

Agent	Study	Outcome
Hyaluronidase	Prethrombolytic era	No effect on infarct size
Calcium channel blocker	SPRINT II; Goldbourt et al (1993)[13]	Increased mortality
Free radical scavenger, human superoxide dismutase	Flaherty et al (1994)[14]	No improvement in left ventricular function
Antioxidant-trimetazidine	ESPRIM; ESPRIM Group (1994)[15]	No effect on mortality or clinical outcomes
Fluosol	TAMI-9; Wall et al (1994)[16]	No decrease infarct size or increase in left ventricular function
Rheoth RX-polaxamer 188	EMIP-FR; EMIP FR Group (2000)[17]	No effect on death, shock, or reinfarction
White blood cell inhibitor: Anti-CD18 monoclonal antibody	FESTIVAL; Rusnak et al (2001)[18]	No decrease in infarct size
Na^+/H^+ exchange inhibitor	ESCAMI; Zeymer et al (2001)[19] CASTEMI; Bar et al (2006)[20]	No effect on infarct size, clinical outcomes, left ventricular ejection fraction
Complement inhibitors	COMPLY Trial; Mahaffey et al (2003)[21] APEX Trial; Armstrong and Granger (2007)[22]	No decrease in infarct size or decrease in mortality
Magnesium	Magnesium in Coronaries Trial Investigators (2002)[23]	No effect on mortality, heart failure, or ventricular tachycardia
Nicorandil	Kitakaze et al (2007)[24]	No effect on mortality or infarct size
Cold perfusion	CHILL-MI; Erlinge et al (2014)[25]	No effect on infarct size or left ventricular ejection fraction
Sodium nitrite	NIAMI; Siddiqi et al (2014)[26]	No decrease in infarct size, no effect on left ventricular ejection fraction
MPTP inhibitor	MITOCARE; Atar et al (2014)[27]	No effect on infarct size or left ventricular ejection fraction
Cyclosporine	CIRCUS; Cung et al (2015)[28]	No effect on deaths or heart failure

Tableau 1 : Principales stratégies cardioprotectrices pharmacologiques testées chez l'Homme. D'après Leffer et collaborateurs[7]. Références présentées : [54,63-77]

2. Infarctus constitué

Dans l'infarctus constitué, les traitements vont avoir comme principal objectif de lutter contre la survenue et les conséquences du remodelage inverse.

2.1. β-bloquants

Les β-bloquants sont des antagonistes compétitifs qui vont se fixer sur les récepteurs β-adrénergique à la place des catécholamines. Leur utilisation a par conséquent été longtemps contre-indiquée dans l'insuffisance cardiaque en raison de leurs propriétés inotropes, chronotropes et lusitropes négatives. Cependant, la stimulation permanente des récepteurs β-adrénergique nécessaire pour maintenir le débit cardiaque va aboutir à une dérégulation et une désensibilisation de ces récepteurs, aboutissant à une nouvelle augmentation de la stimulation sympathique. L'hypothèse a donc été émise que les β-bloquants pouvaient stopper ce cercle vicieux. Dans cette indication, ce sont des β-bloquants avec activité vasodilatatrice (anti-α1-adrénergique, carvedilol ou *via* le NO, nébivolol) ou des β-bloquants sélectifs des récepteurs β -1-adrénergiques (bisoprolol) qui ont été testés . Ces molécules ont permis une réduction de 35% de la mortalité et de 20% du taux d'hospitalisation[78] .

2.2. Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et antagonistes du récepteur AT1 de l'angiotensine II

Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion et les antagonistes du récepteur AT_1 de l'angiotensine II vont s'opposer aux actions de l'angiotensine II qui a une activité vasoconstrictrice importante et favorise la rétention hydro-sodée en induisant la libération d'aldostérone. L'inhibition de l'action de l'angiotensine II va également diminuer la sécrétion de noradrénaline ainsi que réduire la stimulation et la croissance des fibroblastes. Ces molécules vont donc avoir plusieurs intérêts en pratique. Leur action vasodilatatrice artérielle et veineuse va permettre une diminution à la fois de la post-charge et de la pré-charge, et ralentir ainsi le développement de l'hypertrophie et de la dilatation myocardique. De plus, leur action sur les fibroblastes va permettre une diminution de la fibrose myocardique. Au total, par cette diminution de la fibrose et de l'hypertrophie/dilatation

ventriculaire gauche, ces molécules vont permettre une diminution du remodelage inverse d'autant plus importante qu'ils sont débutés précocement[79]. Il convient de noter que les antagonistes du récepteur AT_1 de l'angiotensine II n'ont pas démontré de façon cohérente une diminution de la mortalité et sont réservés aux patients ne tolérant pas les IEC. Récemment, un nouveau traitement (LCZ696) associant un antagoniste du récepteur de l'angiotensine II (valsartan) et un inhibiteur de la néprilysine (sacubitril) a montré une supériorité par rapport aux inhibiteurs de l'enzyme de conversion en termes de diminution de la mortalité et des hospitalisations[80]. Cette association est donc maintenant recommandée chez les patients restants symptomatiques alors qu'ils sont traités par des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine.

2.3. Anti-aldostérone

La spironolactone et l'éplérénone bloquent le récepteur de l'aldostérone et inhibent donc les effets de cette dernière. Ils vont avoir une action anti-fibrosante, diminuer les concentrations noradrénaline circulante et augmenter la production de NO endothéliale[81]. Les anti-aldostérones sont associés à une diminution de mortalité dans l'insuffisance cardiaque[82].

CHAPITRE 3 : THERAPIE CELLULAIRE CARDIAQUE

1. Définition

Le principe de la thérapie cellulaire cardiaque est d'introduire dans le muscle cardiaque lésée des cellules multi- ou pluri-potentes ayant des capacités de prolifération, de différentiation et de sécrétion permettant d'améliorer l'architecture et la fonction de ce cœur. L'idée initiale était que ces cellules allaient s'ancrer dans le muscle lésé, proliférer puis se différencier notamment en cardiomyocytes et en cellules vasculaires permettant de « régénerer » le muscle cardiaque. On sait maintenant que ce mécanisme n'a pour l'instant pas lieu (ou peu) et que les résultats obtenus actuellement sont liés à d'autres phénomènes.

Les cellules utilisées en thérapie cellulaire sont des cellules souches. Ces cellules ont comme caractéristiques des propriétés d'auto-renouvellement et de différentiation en plusieurs lignées cellulaires permettant de reformer *in vivo* du tissu fonctionnel. Les propriétés d'auto-renouvellement sont définies par la capacité de la cellule à se diviser en obtenant au moins une cellule fille identique à la cellule mère, conservant ainsi toutes ses propriétés. Concernant les capacités de différenciation, elles sont généralement guidées par l'environnement. La présence de facteurs de croissances, cytokines ou autre va modifier l'expression génique de la cellule aboutissant à une modification de son phénotype[83].

En thérapie cellulaire cardiaque, les caractéristiques que l'on attend des cellules utilisées sont les suivantes :

- être sans danger, c'est-à-dire dans le cas présent, ne pas provoquer de tumeur ou d'arythmie ;
- améliorer la fonction cardiaque ;
- créer du tissu musculaire et vasculaire fonctionnel ;
- être facile à cultiver, cultivable en grands nombres et délivrables par des méthodes les moins invasives possible ;

- être disponible en routine (intérêt de la thérapie allogénique) ;
- ne pas provoquer de réaction immunitaire ;
- ne pas être sujettes à des problèmes éthiques éventuels.

2. Types cellulaires utilisés

Plusieurs types cellulaires ont été utilisés pour la thérapie cellulaire jusqu'à présent, avec des avancées variables dans le développement et les bénéfices obtenus.

2.1. Cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires sont issues de la masse cellulaire profonde de l'embryon au stade blastocyte et sont les cellules souches modèles. Elles sont toti-potentes, peuvent se renouveler et être expandues. Elles sont ainsi capables de se différencier en n'importe quelle cellule de l'organisme et donc en cardiomyocytes à l'aide de protocoles définis[84]. Il a été démontré dans des modèles animaux que les cellules cardiaques formées à partir de cellules souches embryonnaires vont s'intégrer architecturalement mais aussi électriquement dans le cœur du receveur[85,86]. De plus ces cellules souches embryonnaires vont également agir sur le myocarde ischémique et améliorer sa structure et sa fonction. Néanmoins le développement clinique des cellules souches embryonnaires n'en est qu'à ses débuts pour plusieurs raisons. Premièrement, des considérations éthiques liées à leur provenance ont longtemps freiné leur développement. De plus, leur caractère toti-potent est à double tranchant puisque ces cellules pourraient être responsables de la formation de tumeurs et notamment de tératomes lorsqu'elles sont injectées dans le myocarde. Enfin, comme toutes les thérapies allogéniques, il existe un risque de rejet de ces cellules par l'organisme hôte.

Deux principales études réalisées chez le gros animal ont fait date. La première a été publiée il y a une dizaine d'année et impliquait l'injection de cellules souches embryonnaires murines différenciées vers un phénotype cardiomyogénique chez des moutons[86]. La différence de fraction d'éjection mesurée 1 mois après injection de ces cellules était de 16,5% (P=0.02) entre les animaux traités et les animaux contrôle. Plus récemment des cardiomyocytes dérivés de cellules souches embryonnaires humaines ont été produits en

grande quantité puis injectés chez des primates quelques jours après l'induction d'un infarctus reperfusé[85]. Les résultats ont montré que ces cardiomyocytes étaient capables de repeupler la zone infarcie et de former du nouveau tissu musculaire fonctionnel. De plus, il n'existait pas de signe de rejet mais les singes recevaient un traitement immunosuppresseur. Ces deux études ont confirmé les résultats obtenus chez le petit animal. Néanmoins, il convient de noter que dans une de ces études réalisée chez le rat, la formation de tératomes était observée après traitement.

2.2. Cellules souches pluripotentes induites (IPSc)

Il a été démontré il y a une dizaine d'année, que des cellules somatiques peuvent être reprogrammées en cellules toti-potentes grâce à l'utilisation de cocktails de facteurs de transcription inverse[87]. Ces cellules appelées cellules souches pluri-potentes induites ont les mêmes propriétés de pluri-potence que les cellules souches embryonnaires et peuvent être différenciées en tous types cellulaires et notamment en cardiomyocytes[88]. Ces cellules ont par rapport aux cellules souches embryonnaires l'avantage de s'affranchir des considérations éthiques et offrent la possibilité de faire des thérapeutiques autologues. Néanmoins, certaines contraintes freinent pour l'instant l'expansion de cette technique. Le premier est le temps très long (4 mois) et le rendement faible pour obtenir des cellules souches pluri-potentes induites à partir d'un patient. De plus le risque de tératome est toujours présent (puisque lié à la pluri-potence), auquel s'ajoute celui de mutagénèse liée aux manipulations génétiques. Par ailleurs, la différenciation en cardiomyocytes est difficile et souvent décevante puisque l'on observe une population cellulaire hétérogène ne comprenant pas que des cardiomyocytes. Enfin, il faut noter le coup très élevé de ces approches.

2.3. Myoblastes squelettiques

Les myoblastes squelettiques sont les cellules progénitrices impliquées dans la régénération du muscle squelettique. Ces cellules sont dérivées des cellules satellites, une population de cellules musculaires progénitrices située sous la membrane basale des fibres musculaires. Lors d'une lésion musculaire, ces cellules satellites prolifèrent puis se différencient en myotubes et en nouvelles fibres musculaires, régénérant ainsi le muscle.

Il n'est donc pas surprenant que ces cellules aient été parmi les premières à être étudiées comme moyen potentiel de régénération cardiaque. En effet, ces myoblastes squelettiques ont un phénotype contractile, peuvent se différencier en myotubes *in vitro* et ont donc la capacité de régénérer du muscle. De plus elles peuvent être facilement obtenues par prélèvement autologue et sont résistantes à l'ischémie[89]. Elles peuvent donc potentiellement survivre dans le milieu hostile dans lequel elles sont amenées à être injectées. La capacité des myoblastes à réparer le muscle cardiaque et améliorer sa fonction a été démontrée dans des modèles de petits[90,91] et gros animaux d'infarctus[92-94] mais également dans des modèles de cardiomyopathie dilatée non ischémique[95]. Leur effet a été attribué à une action sur la matrice extra-cellulaire (diminution de la fibrose par augmentation de la dégradation du collagène et diminution de sa synthèse) ainsi qu'à une stimulation de la prolifération endogène des cardiomyocytes[95,96]. Après ces étapes rigoureuses de développement pré-clinique, les myoblastes squelettiques ont été les premières cellules à être testées en clinique humaine, dans la cardiopathie dilatée d'origine ischémique. Si les résultats des études préliminaires étaient plutôt encourageants[97,98], la première étude randomisée contre placebo (MAGIC) étudiant les effets de l'injection de myoblastes squelettiques par voie intra-myocardique au cours d'une chirurgie cardiaque a jeté un froid sur les espoirs portés par cette thérapie[99]. Outre l'absence de bénéfice clinique conduisant à l'arrêt prématuré de l'étude, une tendance en faveur d'une incidence plus élevée d'arythmies ventriculaires était observée, questionnant par conséquent la sécurité de ces cellules. Plusieurs études ont par la suite rassuré sur la securité de ces cellules mais sans apporter de preuve supplémentaire d'une éventuelle efficacité, sonnant ainsi le glas de l'utilisation des myoblastes squelettiques[83].

2.4. Cellules dérivées de la moelle osseuse (hors cellules stromales mésenchymateuses)

Le développement et l'utilisation des cellules dérivées de moelle osseuse ont été accélérés et amplifiés par l'accessibilité relativement facile de la moelle osseuse et l'expérience importante en termes de transplantation de moelle osseuse dans les indications hématologiques. De plus, la possibilité d'obtenir de très grandes quantités de cellules de la moelle (non triées) permet leur utilisation éventuelle sans pré-traitement ou expansion préalable, autorisant donc leur utilisation très précocement après l'infarctus.

La moelle osseuse contient une population hétérogène de cellules incluant des cellules progénitrices hématopoïétiques, endothéliales et des cellules stromales mésenchymateuses (MSCs). La population la plus étudiée jusqu'à présent est la population de cellules de moelle osseuse mononuclées. Il convient de noter que cette population de cellules contient très peu de cellules souches (2-4% de cellules progénitrices hématopoïétiques et endothéliales ; 0.1% de MSCs) et contient essentiellement des cellules hématopoïétiques à différents stades de maturation[100]. La fraction de cellules souches présentes peut être augmentée par un tri des cellules en fonction des marqueurs de surface (CD133+, CD34+ ou encore ckit+). Les résultats de l'utilisation de ces cellules dans des modèles pré-cliniques de gros animaux sont plutôt décevants[101,102]. En effet, chez le mouton et le porc en insuffisance cardiaque post-infarctus, ces cellules ne produisent pas d'amélioration de la fonction ventriculaire gauche.

En termes de translation clinique humaine, les cellules mononuclées de la moelle osseuse sont les cellules ayant été de loin les plus utilisées chez l'Homme. Elles le sont telles qu'elles, triées ou enrichies en progéniteurs et l'ont le plus souvent été en post-infarctus proche[103,104]. Ces nombreuses études ont permis de dégager deux messages importants. Premièrement, la perfusion de cellules souches par une artère récemment réouverte est sûre, que ce soit en aigu (pas d'aggravation des lésions ischémiques, pas d'arythmie) ou à plus long terme (pas d'augmentation de l'incidence de la resténose intra-stent qui était à craindre notamment avec l'utilisation de progéniteurs endothéliaux). Deuxièmement, l'efficacité a été jusqu'ici limitée et inconsistante. En effet, si un grand nombre de petites études ont montré un bénéfice sur la fraction d'éjection et les volumes ventriculaires, les études randomisées en double aveugle avec des critères cliniques dits « durs » ont jusqu'ici été majoritairement négatives.

2.5. Cellules stromales mésenchymateuses

Outre la moelle osseuse, les cellules stromales mésenchymateuses (MSCs) peuvent être isolées à partir de tissu adipeux. Ces cellules peuvent se différencier en cellules de la lignée mésenchymateuse telles que les cardiomyocytes ou les myoblastes squelettiques. Néanmoins leur différentiation *in vivo* en cardiomyocytes est très limitée et leur effet principal est de nature paracrine avec la sécrétion de multiples facteurs agissant sur les

cellules résidentes afin d'augmenter leur survie, leur prolifération et leur différentiation. Leur caractère immuno-privilégié permet une utilisation relativement simple en thérapie allogénique. Chez le rat porteur de cardiomyopathies ischémiques et non ischémiques, il a été montré que les MSCs amélioraient la fonction cardiaque, augmentaient l'angiogénèse et diminuaient la fibrose myocardique[105-108]. Dans les modèles pré-cliniques porcins, les MSCs ont montré leur capacité à améliorer la fonction cardiaque, diminuer l'étendue de la cicatrice d'infarctus et augmenter la densité vasculaire[109-115]. La plupart des études actuelles utilisent des MSCs non triées, c'est-à-dire la couche de cellules adhérentes obtenues après leur mise en culture. Cette population comprend plusieurs types de MSCs exprimant généralement les antigènes de surface CD105, CD90, CD166 et Sro1.

2.6. Cellules d'origine cardiaque

Le cœur a longtemps été considéré comme un organe sans capacité de renouvellement. Il a été prouvé que ce concept n'était pas exact et que les cardiomyocytes subissaient un renouvellement (0,5-1% par an) et qu'environ 40% du cœur adulte était composé de cardiomyocytes qui en étaient issus[116]. A partir de ce constat, plusieurs populations de cellules cardiaques progénitrices ont été identifiées en fonction de leurs antigènes de surface. Parmi elles, on peut citer les cellules exprimant c-Kit (ou CD117, récepteur du facteur de cellule souche)[117-119], celles exprimant Sca-1+ (stem cell antigen 1)[120], les cardiosphères et les cellules dérivés des cardiosphères. Toutes ces cellules présentent comme caractéristiques communes d'être des cellules résidentes du cœur, de pouvoir être obtenues par biopsie endomyocardique et d'avoir la capacité de se différencier en cardiomyocytes mais également en d'autres types cellulaires comme les cellules endothéliales. Il est possible que ces cellules progénitrices résidentes aient pour fonction de compenser la perte de cardiomyocytes durant la vie (en association avec un autre mécanisme impliquant la reprogrammation de cardiomyocytes adultes). Néanmoins la très faible proportion de ces cellules progénitrices présentes dans le cœur (environ 1/10000 cardiomyocytes) explique pourquoi ces cellules sont insuffisantes pour réparer des dommages massifs tels qu'ils surviennent lors d'un infarctus du myocarde par exemple. Néanmoins, ces cellules cardiaques résidentes semblent programmées pour réparer le cœur, et leur isolement puis expansion *ex-vivo* avant leur réinjection est une stratégie

thérapeutique attractive pour traiter les dommages cardiaques. Nos travaux de thèse ont porté sur l'une de ces populations cellulaires et ses dérivés, à savoir les cardiosphères et cellules dérivées des cardiosphères (CDCs), dont les principales caractéristiques et propriétés vont faire l'objet d'un paragraphe dédié.

3. Thérapie cellulaire autologue et allogénique

A l'origine et pendant de nombreuses années, la thérapie cellulaire n'a été qu'autologue. Les cellules étaient prélevées chez le patient (biopsie de moelle, biopsie endomyocardique ou autres), éventuellement triées ou expandues *in-vitro*, puis réinjectées à distance. Cette technique a comme principal avantage de s'affranchir de toutes considérations immunologiques quant à un éventuel rejet. Néanmoins la thérapie cellulaire autologue présente au moins deux inconvénients majeurs. Le premier est la présence d'un délai entre le prélèvement des cellules et leur injection. Ce délai est par exemple de 2 à 3 semaines pour les cellules stromales mésenchymateuses et supérieur à 3 semaines pour les cellules dérivées des cardiosphères. Ce temps nécessaire à l'isolement de la population d'intérêt et à son expansion empêche toute possibilité de traitement en phase précoce pendant le post-infarctus. Le deuxième inconvénient est la variabilité inter-individuelle majeure des thérapeutiques reçues par chaque patient. En effet, il a été démontré que les cellules obtenues chez différents patients peuvent être très différentes en termes de sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance et par conséquent en termes d'efficacité thérapeutique[121]. Ainsi dans les études de thérapie cellulaire autologue, on peut, en forçant le trait, présumer que chaque patient du groupe thérapie cellulaire reçoit un traitement différent, introduisant de fait une variabilité importante de l'effet thérapeutique éventuel, et limitant ainsi la puissance de l'étude et la possibilité de mettre en évidence une différence entre les groupes.

Pour pallier à ces inconvénients, le concept de thérapie cellulaire allogénique a été introduit il y a quelques années. Ce changement de stratégie a été facilité par la mise en évidence du caractère immuno-privilégié de certaines populations cellulaires (notamment les cellules stromales mésenchymateuses et les CDCs) lié à leurs propriétés immunomodulatrices[122]. Il a en effet été démontré dans plusieurs études pré-cliniques

réalisées sur des rongeurs puis sur des porcs que la thérapie cellulaire allogénique par cellules stromales mésenchymateuses ou CDCs n'induisait quasiment pas de réponse immunitaire et ce, même en l'absence de traitement immunosuppresseur[112,115,123-126]. Ainsi des études utilisant la thérapie cellulaire allogénique ont été mises en route chez l'Homme, avec pour espoir de gagner en reproductibilité des traitements administrés et donc en puissance statistique. Par ailleurs, la thérapie cellulaire allogénique permet d'avoir un produit prêt à l'emploi et donc à utiliser dès que souhaité. Cela a permis la mise en route d'études pré-cliniques dans la phase aiguë de l'infarctus ayant pour objectif de cibler les lésions de reperfusion[127,128].

4. Modes d'administration

4.1. Voie intra-coronaire

La voie d'injection intra-coronaire est l'une des voies d'administration les plus simples à utiliser en salle de cathétérisme cardiaque. En effet, cette voie a été utilisée chez des milliers de patients et sa sûreté est maintenant bien établie[129]. De plus, l'accès aux artères coronaires est relativement aisé et peut être répété en cas de nécessité d'injection multiple. Pour toutes ces raisons, l'injection intra-coronaire est une voie de choix pour l'administration des thérapies cellulaires. Cette injection était initialement réalisée lors d'interruptions du flux coronaire avec des cycles de 2 minutes d'occlusion coronaire par un ballon coaxial[130]. Les cellules sont injectées dans la lumière du ballon pendant ces phases d'occlusion coronaire afin d'éviter un lavage trop rapide par le flux sanguin. Ces périodes d'occlusion sont entrecoupées de phase de reperfusion de 3 minutes. Il a été démontré depuis que l'injection en continu dans un microcathéter sans occlusion coronaire était comparable en termes de rétention et de bénéfice thérapeutique[131].

Le pourcentage de rétention intra-myocardique avec l'administration intra-coronaire semble être plus faible qu'avec les injections intra-myocardiques directes, néanmoins les différentes études ne sont pas unanimes[132,133]. De plus, la corrélation entre l'importance de la rétention et l'intensité de l'effet reste controversée. En revanche, cette voie est attractive dans le post-infarctus précoce en raison des signaux émis par cette zone qui vont avoir tendance à attirer les cellules injectées. Enfin, il convient de noter que dans le cadre du

traitement de pathologies myocardiques diffuses, l'injection intra-coronaire des trois vaisseaux coronaires peut être réalisée sans danger comme démontré dans un travail satellite de cette thèse[131].

4.2. Injection intra-myocardique par voie trans-endocardique

L'injection par voie trans-endocardique est réalisée par voie endovasculaire grâce à un cathéter déflectable muni à son extrémité distale d'une aiguille creuse permettant d'injecter par un orifice situé à l'autre extrémité du cathéter. Avant de réaliser des injections, les zones à injecter sont repérées par la réalisation d'une cartographie exhaustive du ventricule gauche. Cette cartographie est réalisée au moyen d'un cathéter permettant d'enregistrer d'une part la dépolarisation myocardique (en uni- ou bipôlaire) et d'autre part le déplacement myocardique en systole, permettant ainsi d'identifier les zones saines, les zones infarcies et la zone bordante, cette dernière étant habituellement la zone choisie pour l'injection. En effet les injections dans la zone saine sont le plus souvent inutiles car trop éloignées des tissus lésé, et les injections en zone infarcie n'ont pas d'efficacité en raison d'une part du faible nombre de cellules restantes à « sauver » et d'autre part de l'environnement très hostile rendant encore plus délicate la survie des cellules injectées. Le système NOGA a été utilisé dans plusieurs études ces 15 dernières années[133]. La procédure est plutôt sûre malgré deux risques principaux qui sont la tamponnade par perforation ventriculaire gauche et le risque d'arythmie. Pour ces raisons la répétition de cette procédure est discutable. Concernant l'efficacité, le choix entre l'injection intra-coronaire ou l'injection intra-myocardique trans-endocardique reste actuellement une affaire de préférence et d'habitude des équipes. En effet les résultats des petites études réalisées sont contradictoires. Le faible nombre de patients traités jusqu'à présent, ainsi que les différents protocoles et types cellulaires testés rendent toutes comparaisons ou conclusions prématurées. A l'heure où les plus larges études de thérapie cellulaire incluent uniquement quelques centaines de patients, la question reste loin d'être résolue.

4.3. Abord chirurgical

L'injection des cellules au cours d'une chirurgie thoracique est un des premiers modes d'administration à avoir été utilisé en raison de son évidence. Initialement réalisée

par des injections disséminées dans ou autour de la zone à traiter, la délivrance et la survie des cellules ont été optimisées par la suite grâce à l'administration de biomatériaux. Ces techniques d'administration permettent une bonne survie des cellules mais leur utilisation est limitée par la nécessité d'une indication de chirurgie cardiaque, cette technique lourde ne pouvant être réalisée dans le cas contraire.

4.4. Voie intra-veineuse cardiaque

Certaines équipes ont injecté des cellules par voie rétrograde veineuse coronaire[134]. Cette technique se fait par la cathétérisation du sinus coronaire via un abord veineux. Les cellules sont injectées soit en flux libre, soit en hyperpression en occluant la veine en amont et en aval de l'injection. L'hyperpression permet théoriquement d'accroître l'extravasation des cellules à travers la paroi veineuse. Cependant ces procédés semblent en cours d'abandon, les résultats n'étant pas supérieurs à ceux des autres approches.

4.5. Voie intra-veineuse périphérique

L'injection intra-veineuse périphérique a également été testée. Si certaines études récentes montrent une amélioration fonctionnelle[135,136], d'autres décrivent une extravasation et une rétention intra-cardiaque quasi nulle, principalement à cause de la rétention pulmonaire[137-139].

5. Principaux résultats dans l'infarctus du myocarde et la cardiopathie ischémique

Les données concernant les cardiosphères, cellules dérivées des cardiosphères et les autres thérapies cellulaires d'origine cardiaque seront présentées dans un chapitre dédié.

5.1. Infarctus du myocarde à la phase aiguë

5.1.1. Cellules mononuclées de moelle osseuse

La première observation d'une amélioration de la fonction ventriculaire gauche après l'administration précoce (105±29 heures) de cellules souches a été le fait de l'étude TOPCARE-MI publiée en 2002 qui a évaluée les effets de l'administration de cellules

mononuclées de moelle ou de cellules progénitrices circulantes[140]. Cette étude préliminaire incluant un faible nombre de patients (n=19) a montré que cette administration de cellules souches était associée à une amélioration de la fraction d'éjection avoisinant 10% par rapport aux patients contrôles (groupe de patients appariés) et une amélioration de la réserve coronaire. Ces résultats prometteurs ont entraîné la réalisation de l'étude BOOST (*Bone Marrow Transfer to Enhance ST-Elevation Infarct Regeneration*) qui a randomisé 60 patients entre un traitement médical standard et l'administration de cellules souches mononuclées de moelle dans les jours suivant un infarctus revascularisé[141]. Dans le groupe recevant les cellules, la fraction d'éjection était significativement accrue à 6 mois mais cette amélioration n'était plus observée lors du suivi à long terme, sauf chez les patients les plus graves (très large infarctus ou dysfonction ventriculaire gauche avant traitement). Cette étude a été suivie par l'étude REPAIR-MI (*Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction*) qui a randomisé 37 patients entre une thérapie cellulaire par des cellules mononuclées de moelle ou un placebo[142,143]. Une amélioration plus importante de la fraction d'éjection était observée à 6 mois. Ces résultats favorables étaient préservés à 2 ans de suivi et étaient associés à une diminution du nombre d'évènements[144,145]. Comme dans l'étude BOOST, les patients les plus sévères semblaient bénéficier le plus de la thérapie cellulaire. Malgré ces résultats prometteurs, plusieurs études ultérieures n'ont pas retrouvé de bénéfice associé à l'utilisation des cellules souches mononuclées de moelle dans les suites d'un infarctus aigu. Si l'étude de Janssens et collaborateurs montrait un bénéfice sur la taille de l'infarctus et la perfusion myocardique malgré l'absence d'effet sur la fraction d'éjection[145], plusieurs études, dont celle de Lunde et collaborateurs ayant inclus 100 patients, étaient totalement négatives[146]. De même, l'étude BONAMI réalisée en France par Roncalli et collaborateurs sur 101 patients était négative aussi bien sur les critères de fonction ventriculaire gauche que sur la taille d'infarctus[147], tout comme les études TIME et Late-TIME ayant testé l'injection intra-coronaire de cellules mononuclées de moelle respectivement quelques jours et 2 à 3 semaines après un infarctus[148,149]. Au final, le nombre d'études négatives avec les cellules mononuclées de moelle osseuse est supérieur à celui des études positives.

5.1.2. Cellules de moelle osseuse sélectionnées et cellules stromales mésenchymateuses

Concernant les cellules de moelle sélectionnées, plusieurs études ont évalué la fraction de cellules CD34+. Tendera et collaborateurs ont étudié les effets de l'injection intra-coronaire de cellules CD34+ chez des patients en post-infarctus montrant une fraction d'éjection du ventricule gauche inférieure à 40%[150]. Ils n'ont observé aucune différence pour ce paramètre ou la survenue d'évènements entre les deux groupes. Plus récemment l'étude Preserve-AMI a randomisé 161 patients entre cellules CD34+ et placebo[151]. Le critère de jugement principal était la perfusion myocardique à 6 mois et aucune amélioration significative n'a été détectée. Cependant, après ajustement sur la durée d'ischémie, un effet dose dépendant de la thérapie cellulaire était observé sur la taille de l'infarctus et l'évolution de la fraction d'éjection.

La première étude ayant évalué les MSCs a été publiée en 2004 par Chen et collaborateurs[152]. Ils ont randomisé 69 patients entre injection intra-coronaire de MSCs et celle de sérum physiologique dans les 12 heures suivant un infarctus revascularisé et ont montré une augmentation significative de la fraction d'éjection à 3 et 6 mois (18% à 6 mois contre 5% chez les contrôles) qui était associée à une amélioration de la perfusion myocardique. Par la suite Hare et collaborateurs ont testé l'administration de MSCs par voie intra-veineuse en comparaison au placebo chez des patients ayant eu un infarctus du myocarde revascularisé avec succès[153]. L'administration des cellules était sans risque mais la fraction d'éjection n'était pas améliorée dans l'étude. Seules des analyses en sous-groupes portant uniquement sur les patients avec un infarctus antérieur permettait d'objectiver une amélioration de la fraction d'éjection. Ces deux études ont utilisé des MSCs dérivées de moelle osseuse. D'autres études ont utilisé des MSCs dérivées de tissus adipeux. Houtgraff et collaborateurs ont étudié la faisabilité de l'injection intra-coronaire de MSCs dérivées d'adipocytes dans les 24 heures suivant un infarctus antérieur revascularisé. Quatorze patients ont été randomisés entre les cellules et un placebo[154]. L'injection intra-coronaire a été bien tolérée par les 9 patients recevant les cellules. Par ailleurs, dans cette étude préliminaire de faisabilité, la taille de l'infarctus et la perfusion myocardique s'améliorait significativement chez les 9 patients traités par MSCs mais pas chez les 5 patients traités par placebo. Néanmoins, étant donné le très faible échantillon de cette étude, ces résultats sont

à prendre avec précautions, et une étude de plus grande ampleur est actuellement en cours (Advance study, NCT01216995). Plus récemment, Gao et collaborateurs ont évalué l'injection intra-coronaire de MSCs dérivés de sang de cordon ombilical[155]. Chez 116 patients randomisés en 1 :1, la fraction d'éjection et la perfusion myocardique étaient améliorées par la thérapie cellulaire à 4 mois de l'injection. Concernant la fraction d'éjection, le bénéfice était conservé jusqu'à 18 mois après traitement.

Toutes ces études convergent pour donner un signal positif en faveur de la thérapie cellulaire par MSCs en post infarctus précoce. Il convient néanmoins de noter deux choses. Premièrement, toutes ces études sont des études préliminaires de phase II ayant inclus un faible nombre de malades et n'étudiant à aucun moment des critères cliniques dits « durs ». Elles n'étudient que des marqueurs pronostics ou mécanistiques tels que la fraction d'éjection ou la perfusion myocardique. Deuxièmement, toutes ces études ont inclus les patients précocement en post infarctus mais toujours au minimum 6 heures après la revascularisation. Les mécanismes mis en jeu dans ce contexte pourraient potentiellement n'être pas liés à la prévention des lésions d'ischémie reperfusion, mais plutôt à la prévention du remodelage inverse et à la myogenèse et angiogenèse.

5.1.3. Infarctus constitué et insuffisance cardiaque post infarctus

L'hypothèse initiale de « régénération myocardique » permise par les cellules injectées a fait de l'insuffisance cardiaque post-infarctus une indication de choix pour les études de thérapie cellulaires.

Les premières études ont utilisé les myoblastes squelettiques en raison de leur facilité d'obtention et des résultats pré-cliniques prometteurs. Néanmoins les résultats négatifs de la première grande étude randomisée ainsi que les effets pro-arythmogènes suspectés ont diminué l'enthousiasme concernant l'utilisation de ces cellules[99]. Plusieurs études ont par la suite été rassurantes concernant l'arythmogénicité de ces cellules mais aucune n'a mis en évidence de bénéfice associé à leur utilisation.

Concernant les cellules issues de la moelle osseuse, une des premières études a été publiée par Perrin et collaborateurs qui ont inclus 21 patients recevant une injection trans-endocardique de cellules mononuclées de moelle ou de placebo[156]. Il y avait chez les

patients traités par les cellules une amélioration de presque 10% de la fraction d'éjection comparé au placebo. Suite à ces résultats rassurants sur le plan de la sécurité et prometteurs sur l'efficacité, deux études plus larges ont été menées. Dans la première, Assmus et collaborateurs ont randomisé 92 patients présentant une cardiopathie dilatée post-infarctus[157]. Ils ont reçu soit des cellules progénitrices circulantes, soit des cellules mononuclées de la moelle soit un placebo, par voie intra-coronaire. Les résultats ont mis en évidence une augmentation modeste mais significative de la fraction d'éjection après l'administration de cellules mononuclées de la moelle osseuse, amélioration qui n'était pas observée avec les cellules progénitrices circulantes ou le placebo. Cependant, ces résultats n'ont pas été confirmés par une deuxième étude publiée plusieurs années plus tard. En effet, l'étude FOCUS-CCTRN a randomisé 92 patients entre une thérapie cellulaire par des cellules mononuclées de la moelle et le placebo (2 :1) injectés par voie trans-endocardique[158]. Les résultats à 6 mois n'ont montré aucune différence significative que ce soit sur le remodelage ventriculaire, la taille d'infarctus, la perfusion myocardique ou les symptômes. Plusieurs méta-analyses vinrent par la suite confirmer ces résultats en ne montrant pas de bénéfice sur la fraction d'éjection avec l'utilisation des cellules mononuclées de moelle comparées au placebo.

Plusieurs études ont également étudié les MSCs dérivés de moelle osseuse. En 2014, Heldman et collaborateurs ont comparé les effets de l'injection trans-endocardique de cellules mononuclées de la moelle, de MSCs et de placebo chez 59 patients[159]. La taille de l'infarctus, la cinétique segmentaire du ventricule gauche et le test de marche de 6 minutes étaient améliorés uniquement chez les patients ayant reçu des MSCs. En revanche, le taux d'évènement était le même dans les 3 groupes. Etant donné les bénéfices potentiels de la thérapie allogénique décrits précédemment, des MSCs autologues et allogéniques ont été comparées dans l'étude POSEIDON[160]. Ces deux types cellulaires ont été comparés chez 30 patients (15 par groupe) sans groupe placebo. Les deux types cellulaires étaient associés à une diminution de la taille de l'infarctus mais seules les MSCs autologues amélioraient les symptômes. En 2014, Perrin et collaborateurs ont évalués les MSCs dérivés de tissus adipeux chez 27 patients (21 traités par cellules, 6 contrôles) ayant une cardiopathie dilatée post-infarctus[161]. Dans cette étude, la tolérance à l'effort, la masse ventriculaire gauche mais pas la fraction d'éjection étaient améliorés après thérapie cellulaire. Récemment une des plus

larges études de thérapie cellulaire a été publiée. L'étude CHART-1 a testé des MSCs modifiées vers un phénotype cardiopoiétique[162]. Cent cinquante-sept patients ont reçu les cellules par voie trans-endocardique et ont été comparés à 158 contrôles randomisés. Cette étude était négative pour le critère de jugement principal qui était un critère composite incluant les évènements, la fraction d'éjection et des scores de symptômes.

Au total, ces nombreuses études permettent de dégager deux messages importants. Le premier est que l'administration de cellules souches, qu'elle soit réalisée par voie intra-coronaire ou trans-endocardique semble être sans danger puisque plus de 1000 patients ont été traités jusqu'à présent sans évènement indésirable. Le deuxième est que les MSCs semblent être potentiellement plus prometteuses que les cellules mononuclées de la moelle.

Une seule étude a évalué des cellules souches cardiaques autres que les CDCs chez des patients[163]. Les cellules injectées dans cette étude sont une population comprenant uniquement des cellules c-Kit positive purifiées. Vingt-trois patients ont été traités dans cette étude, 16 par cellules c-Kit+ et 7 par placebo. Tous ces patients ont bénéficié d'un pontage aorto-coronarien au cours duquel l'auricule droit a été prélevé pour obtention des cellules souches. Les cellules ont été mises en cultures puis la fraction c-kit+ isolée. Ces cellules ont ensuite été injectées par voie intra-coronaire environ 4 mois après le pontage. Les résultats de cette étude ont été très rassurants en termes de sécurité et prometteurs en termes d'efficacité avec une amélioration de la fraction d'éjection du ventricule gauche et une diminution de la taille de la cicatrice d'infarctus chez les patients traités par cellules souches mais pas chez les patients traités par placebo. De plus, sur un plan fonctionnel, la classe NYHA ainsi que le score de qualité de vie de l'insuffisance cardiaque étaient significativement améliorés par la thérapie cellulaire.

6. Cardiosphères et cellules dérivées des cardiosphères

6.1. Historique

La première description des cardiosphères date de 2004. Messina et collaborateurs ont montré que l'on pouvait isoler à partir de biopsies cardiaques une population cellulaire hétérogène, formée d'une part de cellules souches cardiaques exprimant c-kit et Sca-1 et, d'autre part, d'une population de cellules CD34+ et CD31+ correspondant possiblement à des cellules progénitrices endothéliales et d'une population exprimant les marqueurs de cellules mésenchymateuses CD90 et CD105[164]. Lorsque ces cellules sont mises en culture en suspension dans un milieu comprenant initialement du facteur de croissance des fibroblastes, du facteur de croissance épidermique, de la cardiotrophine-1, de la thrombine et du B27 comme substitut de sérum, elles s'organisent spontanément en groupements multicellulaires sphériques appelés cardiosphères. Ces sphères s'organisent autour des cellules c-kit, qui se situent au centre et dont la proportion augmente avec la durée de prolifération cellulaire, les autres cellules s'organisant en périphérie[8,165]. La population cellulaire monocouche obtenue après la mise en culture de ces cardiosphères sur un milieu adhérent (fibronectine) a été appelée cellules dérivées des cardiosphères (CDCs, *cardiosphere derived cells*). Il a été démontré que ces cellules ont des propriétés de clonogénicité, de renouvellement spontané et de muli-potentialité, rejoignant ainsi la définition de cellules souches. De plus la capacité de ces cellules à se différencier en cardiomyocytes a été montrée de plusieurs façons. Tout d'abord les marquages immuno-histochimiques ont révélé l'expression de protéines spécifiques du sarcomère telles que la chaîne lourde de la myosine ou la troponine I[166]. Plus important, l'observation de cardiosphères battantes (ce qui n'avait été observé qu'avec les cellules embryonnaires) a achevé de démontrer la différenciation possible en cardiomyocytes[164].

6.2. Méthodes d'obtention et culture cellulaire

Les cardiosphères et cellules dérivées des cardiosphères sont obtenues à partir de fragments cardiaques (Figure 5). Initialement, les premières cellules obtenues l'ont été à partir de fragments obtenus chirurgicalement, rendant très difficile l'application clinique de cette technique en thérapeutique autologue[164]. Une autre technique a donc été développée,

permettant d'obtenir les cellules à partir de biopsies ventriculaires droites réalisées par voie per-cutanée, de façon similaire à la réalisation des biopsies à visée diagnostique ou de suivi chez les patients transplantés cardiaques[167].

Une fois obtenues, ces fragments sont disséqués pour éliminer les gros fragments de tissu conjonctif puis hachés avant de subir une digestion enzymatique partielle par collagénase. Ces « explants » sont ensuite mis en culture dans des boîtes de cultures couvertes de fibronectine. Après plusieurs jours, on assiste à la formation d'une mono-couche de cellules ressemblant à des cellules stromales, appelées cellules dérivées des explants. Arrivées à confluence, ces cellules sont collectées par digestion enzymatique à la trypsine puis mises en suspension dans des boîtes couvertes de poly-D lysine. Quelques jours après, les cellules s'organisent en cardiosphères. Ces cardiosphères sont récupérées alors que les cellules restant adhérentes à la poly-D lysine sont jetées. Ces cardiosphères sont ensuite mises en culture dans des boîtes couvertes de fibronectine pour donner naissance à une mono-couche de CDCs en quelques jours.

Initialement relativement complexes, les milieux de cultures utilisées pour cultiver ces cellules à chaque étape se sont simplifiés et uniformisés avec le temps. Actuellement le milieu utilisé est composée d' « Iscove's Modified Dulbecco's Medium » (Invitrogen, Carlsbad, California), associé à 20% de sérum de veau foetal, 1% de pénicilline ou streptomycine, 1% de L-glutamine et 0,1 mM de 2-mercaptoethanol.

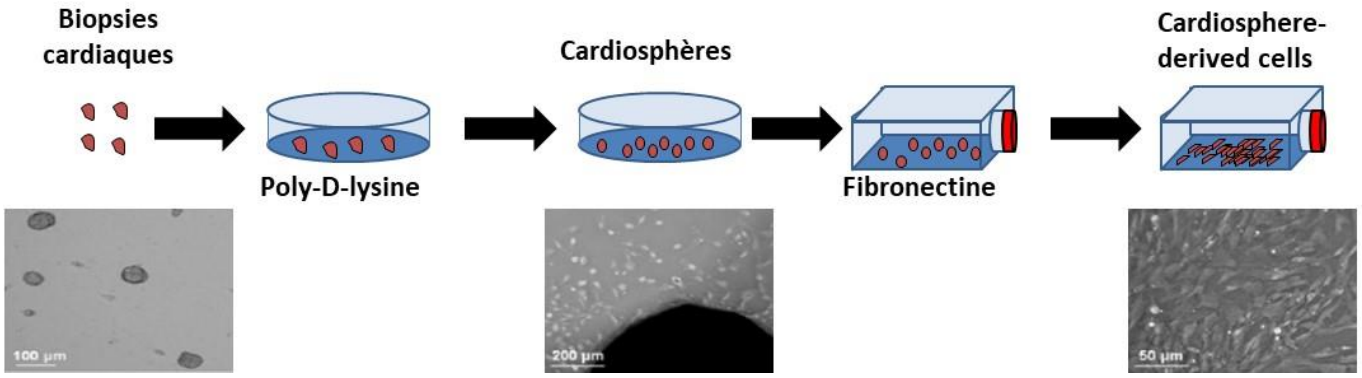


Figure 5 : Méthode d'isolement des cardiosphères et des CDCs

6.3. Etudes pré-cliniques impliquant les cardiosphères et cellules dérivées des cardiosphères

6.3.1. Preuve de concept

La première description de l'utilisation des CDCs dans un modèle animal a été faite par Smith et collaborateurs en 2007[8]. Dans cette étude validant par ailleurs le protocole de production, ces CDCs ont été administrées chez des souris SCID en post infarctus immédiat. Ces souris étaient ensuite suivies pendant 20 jours. La fonction ventriculaire gauche était évaluée par échographie et la taille de l'infarctus par histologie. Outre la confirmation du phénotype des cardiosphères et des CDCs et de leur capacité à se différencier en cardiomyocytes dans des conditions particulières, cette étude a pour la première fois mis en évidence les possibilités d'amélioration de la fraction d'éjection et de réduction de la cicatrice d'infarctus liée à l'administration de CDCs. En effet, dans cette étude, les souris traitées avaient après 20 jours une fraction d'éjection à 42±3% contre 25±2% chez les souris contrôles. En parallèle, le pourcentage de zone viable au sein de l'infarctus était plus important chez les souris traitées par CDCs que chez les souris contrôle. Ces effets étaient liés aux propriétés propres des CDCs puisque qu'il existait également un groupe traité par des fibroblastes dont les résultats étaient superposables à ceux des souris contrôles.

Les résultats de cette étude ont motivé la mise en route d'une étude pré-clinique sur un modèle porcin (Figure 6)[130]. Cette étude publiée dans Circulation en 2009 par Johnston et collaborateurs avait plusieurs objectifs. D'une part optimiser le mode d'administration des CDCs et choisir la dose utilisée avant le transfert chez l'Homme, et d'autre part confirmer la preuve de concept obtenue chez la souris. Plusieurs informations ont été obtenues dans cette étude. Tout d'abord, il était nécessaire d'ajouter de l'héparine aux cellules avant leur injection intra-coronaire en raison d'une élévation de la troponine très importante en cas d'injection sans héparine. En ce qui concerne le choix de la dose, des doses croissantes de CDCs ont été administrées par voie intra-coronaire avec une quantification concomitante du nombre de cellules « greffées » dans le myocarde et de la troponine pour évaluer le risque lié à l'injection. Il a été démontré qu'à partir de 25 millions de cellules, le risque d'infarctus lié à l'injection des cellules augmentait de façon importante et ce pour un bénéfice en termes de « greffe » limité. La greffe à long terme a également été étudiée et des cellules marquées ont été retrouvées 8 semaines après une injection de 10 millions de cellules.

Après avoir optimisé les conditions d'administration et démontré la capacité de « greffe » des cellules, une étude pré-clinique randomisée a été réalisée. Un infarctus a été créé chez des porcs puis, 4 semaines après, les animaux ont été randomisés pour recevoir le placebo ou 300000 CDCs/kg. Une IRM a été réalisée avant l'administration du traitement puis les animaux ont été suivi pendant 8 semaines et euthanasiés après la réalisation d'une deuxième IRM. Des courbes pressions volumes ont également été réalisées. Les résultats ont confirmé ceux obtenus chez le petit animal. Il n'existait une diminution significative de la taille de l'infarctus que chez les animaux traités par CDCs. De plus, la contraction et la relaxation ventriculaires mesurées respectivement par la dP/dtmax et la dP/dtmin étaient significativement plus importantes chez les animaux traités. Ces résultats ont conduit lancement de l'étude de Phase II CADUCEUS[168].

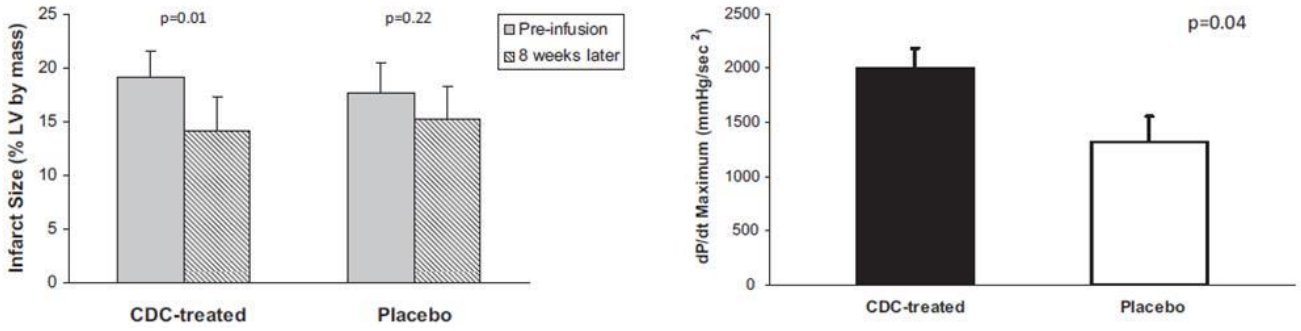


Figure 6 : Principaux résultats de l'étude de Jonhston et collaborateurs ayant étudié les CDCs dans l'infarctus constitué chez le porc. La taille de l'infarctus diminue chez les animaux traités par CDCs mais pas chez les animaux contrôles (panneau de gauche). La fonction ventriculaire gauche systolique s'améliore chez les animaux traités par CDCs mais pas chez les animaux contrôles (panneau de droite). D'après Johnston et collaborateurs[130].

6.3.2. Comparaison cardiosphère-CDCs

Dans une perspective translationnelle, le développement des CDCs a été privilégié et ce pour plusieurs raisons. Tout d'abord, les CDCs sont de nature plus homogène et sont produites de façon plus reproductible que les cardiosphères. En effet, la variabilité de leur taille et très limitée comparativement aux cardiosphères. De plus, étant des cellules uniques, leur phénotypage, l'étude de leur viabilité et leur quantification sont nettement plus aisés. Par ailleurs, la voie intra-coronaire a été privilégiée et il a été présumé que les CDCs, de par leur taille inférieure, seraient plus simples et plus sûres à injecter par cette voie.

Néanmoins, plusieurs études réalisées sur des modèles animaux suggèrent que les cardiosphères pourraient être plus intéressantes à injecter. En effet, il a été démontré que les cardiosphères secrètent quantitativement plus de facteurs de croissance que les CDCs. Cela a été démontré pour de nombreux facteurs de croissances notamment VEGF, HGF et IGF 1, facteurs qui sont impliqués dans la survie cellulaire et la prolifération vasculaire[8,165]. De plus, l'expression des marqueurs de cellules souches (c-Kit, SOX2, Nanog) est plus importante à l'état de cardiosphère que de CDCs, tout comme l'expression des gènes impliqués dans le phénotype souche des cellules[8,169,170]. Enfin, les molécules d'adhésion et d'interaction avec la matrice extracellulaire sont secrétées en plus grand nombre par les cardiosphères que les CDCs[165,170]. Cette sécrétion plus importante a pour conséquence directe, une rétention plus importante des cardiosphères par rapport aux CDCs à 3 semaines (5 fois plus dans un modèle de rongeur). Cette rétention plus importante est également la conséquence de l'organisation tridimensionnelle pluri-cellulaire puisque lorsque les cardiosphères sont dissociées juste avant injection, leur rétention redevient faible et comparable à celle des CDCs[165,169]. D'un point de vue fonctionnel, les cardiosphères et les CDCs ont été comparées dans un modèle d'infarctus chez la souris. Les résultats ont confirmé les premiers résultats obtenus *in-vitro*. Ainsi, les cardiosphères permettent une augmentation plus importante de la fraction d'éjection après injection dans un modèle d'infarctus que les CDCs. En effet, l'augmentation relative de fraction d'éjection du ventricule gauche est de 30% avec les cardiosphères contre 10% avec les CDCs ou les cardiosphères dissociées[165,169]. Pour consolider la preuve de concept, les CDCs et les cardiosphères ont été comparées dans un modèle d'infarctus chez le porc[171]. Leur myocarde a été infarci, puis, 4-5 semaines plus tard, les animaux ont reçu des CDCs ou des cardiosphères via une injection intra-myocardique (20 injections au total réalisées à thorax ouvert). Les animaux ont ensuite été suivis pendant 8 semaines. Les résultats ont montré que les CDCs et les cardiosphères permettaient de prévenir la dégradation de la fraction d'éjection alors que le placebo ne le permettait pas. Là encore, plusieurs résultats suggéraient une efficacité plus importante des cardiosphères comparativement au CDCs. En effet, les volumes ventriculaires gauches étaient significativement mieux préservés avec le traitement par les cardiosphères. En parallèle, plusieurs indicateurs de fonction étaient améliorés de façon plus importante par les cardiosphères, tels que l'élastance et l'épaississement systolique du myocarde, aboutissant à une pression télé-diastolique moins

élevée dans le groupe traité par cardiosphères. Ces différentes études confirment la supériorité des cardiosphères par rapport aux CDCs mais avec, à l'heure actuelle un inconvénient majeur qui est la nécessité d'une injection par voie chirurgicale ne rendant pas éligibles aux cardiosphères tous les patients.

Une étude a également testé l'injection via le système NOGA, confirmant la rétention plus importante des cardiosphères que des CDCs après injection mais avec des résultats plus décevants en termes de fonction ventriculaire gauche[172].

6.3.3. Comparaison CDCs, cardiosphères et autres types cellulaires

Peu d'études ont comparé les différents types cellulaires entre eux jusqu'à présent. De plus une des critiques majeures concernant ce type d'étude est qu'elles ne sont en général pas réalisées par des laboratoires dits « neutres » rendant les résultats potentiellement discutables. En effet, la nécessité d'une expertise particulière pour chaque type cellulaire rend ces comparaisons difficiles à réaliser. Ces résultats méritent néanmoins d'être discutés.

Neanmoins, au cours d'une étude, quatre types cellulaires (CDCs, MSCs dérivées de moelle osseuse, MSCs derivées de tissu adipeux et cellules mononuclées de moelle osseuse) ont été comparés, tout d'abord *in vitro* puis, *in vivo*[173]. Dans un premier temps, les cellules ont été comparées sur leurs capacités de sécrétion de facteurs de croissance potentiellement impliqués dans l'effet de ces cellules. Les secrétions d'angiopoietine 2, de βFGF, d'HGF, d'IGF-1, de SDF-1 et de VEGF ont été comparées. Si pour l'IGF-1 et l'angiopoietine 2, les MSCs dérivées d'adipocytes font presque aussi bien que les CDCs, les CDCs ont une sécrétion nettement plus importante que les autres types cellulaires pour tous les autres facteurs. Il convient de plus de noter que les cellules mononuclées de moelle ont des capacités sécrétrices très limitées, ceci pouvant en partie expliquer les résultats cliniques décevants avec ces cellules. Dans un second temps, les capacités de différenciation myogénique et de capacité d'angiogenèse des cellules ont été comparées. Pour ce faire, l'expression de troponine après 7 jours de culture d'une part, et la formation de tubes d'autre part ont été quantifiées. Encore une fois, si pour la formation de tubes, les MSCs dérivés de tissu adipeux (et à un moindre degré les MSCs dérivées de moelle osseuse) ont des résultats légèrement inférieurs à ceux des CDCs, en ce qui concerne la différentiation

myogénique mesurée par l'expression de troponine, celle-ci atteint quasiment 10% avec les CDCs alors qu'elle reste négligeable (<1%) avec les autres types cellulaires. Il convient à nouveau de noter les très mauvais résultats des cellules mononuclées de la moelle qui ne permettent pas la formation de tubes et ne présentent aucune différentiation myogénique. Ces types cellulaires ont ensuite été comparés *in vivo* en étant administrés chez des souris après un infarctus du myocarde. Tout d'abord la rétention et la différentiation des cellules ont été comparées par immunohistochimie et PCR. Bien que les niveaux soient faibles, le nombre de cellules humaines trouvées à 3 semaines chez ces souris est nettement plus important avec les CDCs qu'avec les autres types cellulaires, quelle que soit la méthode de quantification. La diminution d'apoptose *in vivo* a ensuite été comparée et a montré que si tous les types cellulaires diminuent l'apoptose des cardiomyocytes *in vivo*, cette diminution est encore une fois plus importante avec les CDCs. Enfin, les capacités des différentes cellules à diminuer la taille de l'infarctus et à augmenter la fraction d'éjection ont été comparées avec les mêmes résultats. Si tous les types cellulaires permettent une diminution de la taille de la zone infarcie, celle-ci est plus importante avec les CDCs et elle ne s'accompagne d'une augmentation significative de la fraction d'éjection du ventricule gauche qu'avec les CDCs. En conclusion, cette étude montre une supériorité biologique et fonctionnelle des CDCs comparées aux MSCs et aux cellules mononuclées de moelle. Il faut néanmoins noter que cette étude a été réalisée dans un laboratoire de référence dans l'utilisation des CDCs, ce paramètre pouvant être à l'origine d'un conflit d'intérêt.

Les MSCs dérivées de moelle osseuse et les CDCs ont également été comparées dans un modèle de myocarde hibernant chez les porcs[115]. Ces deux types cellulaires ont été administrés par voie intra-coronaire et l'amélioration fonctionnelle ainsi que la formation de nouveaux vaisseaux et de cardiomyocytes ont été comparées. Les résultats ont montré un bénéfice fonctionnel similaire. De même, la genèse de nouveaux vaisseaux et la diminution de l'hypertrophie cardiomyocytaire étaient comparables. Seule la prolifération de cardiomyocytes était plus importante avec les CDCs, mais sans différence de nombre total de nouveaux cardiomyocytes *in fine*. Au total, cette étude réalisée en aveugle est plutôt en faveur d'une équivalence d'effet entre les MSCs et les CDCS.

Une dernière étude a comparé les MSCs dérivées de la moelle osseuse à des cellules progénitrices cardiaques[114]. Il ne s'agissait pas de CDCs mais d'une fraction de cellules c-Kit

positive appelée *Cardiac Stem Cells*. L'objectif initial de cette étude était d'évaluer l'efficacité de l'association de MSCs et de cellules souches cardiaques, le rationnel étant que les interactions entre ces deux types cellulaires permettraient un bénéfice plus important que l'utilisation d'un seul des types cellulaires. Dans le cadre de cette étude, les MSCs, les cellules c-Kit+ et l'association des deux ont été comparées au placebo. Les résultats ont montré des résultats quasiment identiques pour les deux types cellulaires en termes de réduction de la taille de l'infarctus, de préservation des volumes et d'amélioration de la fraction éjection. Par ailleurs l'évaluation hémodynamique des performances systoliques mais aussi diastoliques du ventricule gauche montrait une amélioration équivalente dans les 2 groupes. Il convient de noter que dans cette étude (injection chirurgicale trans-épicardique) et dans une autre publication du même laboratoire (injection trans-endocardique par NOGA)[112], l'association des deux types cellulaires (MSCs et Cardiac Stem Cells c-Kit+) permettait une diminution plus importante de la taille de l'infarctus ainsi qu'une amélioration fonctionnelle plus conséquente.

En résumé, peu d'études ont comparé les CDCs aux autres types cellulaires. Dans toutes les études réalisées, ces cellules ont été comparées aux MSCs, et, dans la grande majorité des cas, une équivalence dans les résultats obtenus avec chacun de ces types cellulaires.

6.3.4. Thérapie cellulaire allogénique et post-conditionnement cellulaire

6.3.4.1. Thérapie cellulaire allogénique

Les premières études de validation animale des CDCs et cardiosphères décrites précédemment l'ont été avec des cellules autologues. Or, comme détaillé auparavant, la thérapie cellulaire autologue expose à des variations importantes d'effet, liées à l'altération potentielle des capacités régénératives des cellules chez des patients âgés aux multiples comorbidités[121]. De plus, cette thérapie nécessite un délai avant injection lié à l'isolement, la culture et le conditionnement des cellules, avec le risque rare mais existant d'impossibilité d'expansion des cellules du patient. Enfin, en termes de translation et de contrainte réglementaire, la thérapie cellulaire autologue est nettement plus compliquée puisque toutes les étapes de contrôle doivent être réalisées pour chaque lot de cellules donc pour chaque patient traité. Ce n'est pas le cas de la thérapie cellulaire allogénique dans laquelle

une banque de cellules est réalisée, permettant la production d'un grand nombre de lots thérapeutiques homogènes.

Par conséquent plusieurs études ont testé la thérapie cellulaire allogénique avec les cardiosphères et les CDCs. Les deux premiers travaux ont étudié respectivement les CDCs et les cardiosphères dans un modèle de rat[123,126]. Les plans expérimentaux des 2 études sont quasiment similaires. Un infarctus a été réalisé chez des rats par une ligature permanente de l'artère inter ventriculaire antérieure. Les animaux ont ensuite été randomisés entre quatre types de traitement : un placebo, des cellules (CDCs ou cardiosphères) syngéniques (même race de rat) mimant la thérapie cellulaire autologue, des cellules allogéniques (race de rat différente) ou des cellules xénogéniques (cellules humaines). Les réactions immunitaires cellulaire et humorale ainsi que l'efficacité du traitement ont été évaluées. Les résultats des deux études sont similaires. Concernant l'efficacité de la thérapie cellulaire, le bénéfice sur la diminution de la taille d'infarctus et l'amélioration de fonction ventriculaire gauche est similaire avec les thérapies cellulaires allogénique et syngénique. En revanche, la thérapie cellulaire xénogénique n'a pas d'efficacité avec des tailles d'infarctus et une fonction ventriculaire gauche similaires au placebo. Concernant la sécurité, l'infiltration de cellules inflammatoires au site d'injection est identique chez les animaux traités par les thérapies cellulaires syngéniques et allogéniques alors qu'elle est significativement plus élevée chez les rats traités avec des cellules humaines. Parallèlement, la production de cytokines pro-inflammatoires est également identique entre les groupes syngénique et allogénique et est encore une fois plus élevée dans le groupe xénogénique. Enfin, la prolifération lymphocytaire en présence des cellules injectées est de la même façon significativement plus importante chez les animaux traités par thérapie xenogénique que chez les animaux traités par thérapie allogénique ou syngénique. Au total, les résultats de ces deux études sont rassurants concernant la sécurité d'utilisation des cellules allogéniques. De plus, il semble que l'efficacité de cette thérapie soit équivalente à celle de la thérapie autologue.

Ces résultats obtenus dans des modèles de rongeurs nécessitaient confirmation dans un modèle de gros animal. Cela a été réalisé dans deux études, l'une publiée par Malliaras et collaborateurs et ayant étudiée des CDCs et l'autre publiée par Yee et collaborateurs et ayant étudié des cardiosphères[124,172]. Dans ces deux études, les thérapies autologues et allogénique n'ont pas été directement comparées. Seule la comparaison des groupes

placebo vs thérapie allogénique a été réalisée. L'efficacité de la thérapie allogénique et la réaction immunitaire induite par ces approches ont été évaluées. Dans les deux cas, des modèles d'infarctus constitué chez le porc ont été utilisés et les animaux suivis pendant 8 semaines après traitement. Il n'y a eu aucune apparition d'anticorps dirigés contre les cellules administrées chez les animaux traités dans les 2 études. En revanche, concernant l'infiltration cellulaire inflammatoire, une discrète infiltration lymphocytaire a été observée chez plusieurs animaux traités par les cellules allogéniques mais sans induire de dommage cardiomyocytaire. Concernant l'efficacité, le bénéfice obtenu sur la diminution de taille de l'infarctus et sur la préservation de la fonction ventriculaire gauche était au moins identique à ce qui est obtenu avec des thérapeutiques autologues. Ces résultats rassurants ont permis d'avancer dans deux axes de recherche, d'une part la mise en route d'une étude de phase II chez l'Homme évaluant la thérapie cellulaire allogénique, et d'autre part des études pré-cliniques de thérapie cellulaire à la phase aiguë d'infarctus.

6.3.4.2. Infarctus du myocarde à la phase aiguë et post-conditionnement cellulaire

Comme décrit précédemment, la prévention et le traitement des lésions d'ischémie reperfusion est pour l'instant l'un des grands échecs de la recherche en cardiologie dans le cadre de l'infarctus. Le développement de la thérapie cellulaire allogénique a permis de tester la thérapie cellulaire dans cette indication.

Concernant la thérapie par CDCs, les études pré-cliniques chez le porc et les études mécanistiques chez le rat ont été réalisées dans le même temps. Sur le plan de l'efficacité, les études ont été réalisées et publiées par Kanazawa et collaborateurs[127,128]. Un infarctus antérieur a été réalisé par une occlusion de l'artère coronaire intra-ventriculaire antérieure (IVA) pendant 1H30 chez des porcs. Puis le cœur a été reperfusé. Le traitement a été administré 30 minutes après le début de la reperfusion. Le rationnel pour un délai de 30 minutes repose sur la nécessité en pratique clinique de réouvrir l'artère et de réaliser une angioplastie avant administration des cellules. Ces cellules (CDCs allogéniques) ont été injectées par voie intra-coronaire par la technique d'interruption de flux. Un groupe SHAM a également été réalisé pour être certain qu'un éventuel bénéfice observé n'était pas lié à du post-conditionnement ischémique. Les principaux critères évalués ont été la taille de l'infarctus et l'étendue de l'obstruction micro-vasculaire mesurées par histologie à 48 heures

de l'infarctus. Ces deux mesures ont été pour chaque animal indexées à la taille de la zone à risque. Les résultats ont été prometteurs puisque les ratios de la taille de l'infarctus et de l'obstruction micro-vasculaire sur la taille de la zone à risque étaient tous les deux significativement diminués d'environ 20% (diminution absolue) soit des diminutions relatives respectives de 25 et 30% [128]. Cet effet cardioprotecteur a été nommé post-conditionnement cellulaire par les auteurs. Un des facteurs impliqués dans la diminution de la taille de l'infarctus et de l'obstruction microvasculaire était une diminution de l'apoptose cardiomyocytaire mise en évidence par marquage TUNEL. Par ailleurs, ce bénéfice persistait à long terme avec dans une deuxième étude ayant réalisé un suivi à 2 mois, la persistance d'une taille d'infarctus moins importante et d'une fraction d'éjection plus élevée[127].

Les mécanismes impliqués ont été étudiés séparément dans un modèle de rat[174]. La première information de cette étude est qu'un retard trop important du traitement par rapport à la reperfusion (120 minutes chez le rat dans cette étude) fait disparaitre cet effet cardioprotecteur. Concernant les mécanismes responsables de cet effet, la principale population cellulaire impliquée semble constituée de cellules inflammatoires et plus particulièrement les macrophages. En effet, l'infiltration macrophagique dans le myocarde à 48 heures était nettement moins importante chez les rats traités par CDCs que chez les rats traités par le placebo. Par ailleurs, la déplétion macrophagique par le clodronate de sodium faisait disparaître l'effet cardioprotecteur des CDCs, indiquant de façon assez claire l'implication des macrophages dans cet effet cardioprotecteur. Le phénotype de ces macrophages a donc été étudié. Il a été mis en évidence que les macrophages des rats traités par CDCS et par placebo avaient des profils cytokiniques et d'expression génique totalement différents. L'analyse plus précise de l'expression génique et de la synthèse protéique de ces macrophages « traités » par CDCs ainsi que leur comparaison aux traditionnels phénotypes M1 et M2 décrits a permis de montrer que ce phénotype appelé M_{CDCs} n'était ni un phénotype M1 ni un phénotype M2.

6.4. Etudes cliniques impliquant les cellules dérivées des cardiosphères

La seule étude clinique ayant utilisé les CDCs et publiée jusqu'à présent est l'étude CADUCEUS (Figure 7)[168,175]. Dans cette étude de phase II, 31 patients (25 traités au final) ont été randomisés (2 :1) entre un traitement par CDCs autologues injectées par voie intra-

coronaire et un placebo. Les critères de jugements principaux étaient essentiellement des critères de sécurité mais des critères de jugement visant à rechercher un signal d'efficacité étaient également inclus. Il n'y a eu aucune complication des biopsies endomyocardiques. En revanche, il y a eu 3 échecs d'obtention des cellules pour injection : une contamination bactérienne, une anomalie chromosomique et l'obtention d'un nombre de cellules insuffisants chez un patient. Il n'y a eu aucun évènement indésirable dans les 24 heures suivant l'administration. Le flux TIMI n'a pas été modifié par la perfusion et la troponine et les CPK n'ont pas augmenté. En termes d'efficacité, l'étendue de la zone infarcie a diminué significativement (à 6 mois et 12 mois) chez les patients ayant reçu des CDCs mais pas chez les patients traités par placebo. Parallèlement, la quantité de masse myocardique viable a augmenté chez ces patients comparativement aux patients contrôles. En termes de fonction ventriculaire gauche, une amélioration de la cinétique segmentaire était notée. Enfin on notait une tendance à l'augmentation de la distance parcourue lors du test de marche de 6 minutes et du pic de VO2 max chez les patients traités par CDCs. Une analyse plus détaillée des données à 1 an a confirmé l'augmentation de masse viable et a surtout mis en évidence une corrélation entre l'importance de la diminution de la taille de la cicatrice d'infarctus et l'augmentation de la fraction d'éjection chez les patients traités par CDCs, cette corrélation n'existant pas chez les patients recevant de placebo.

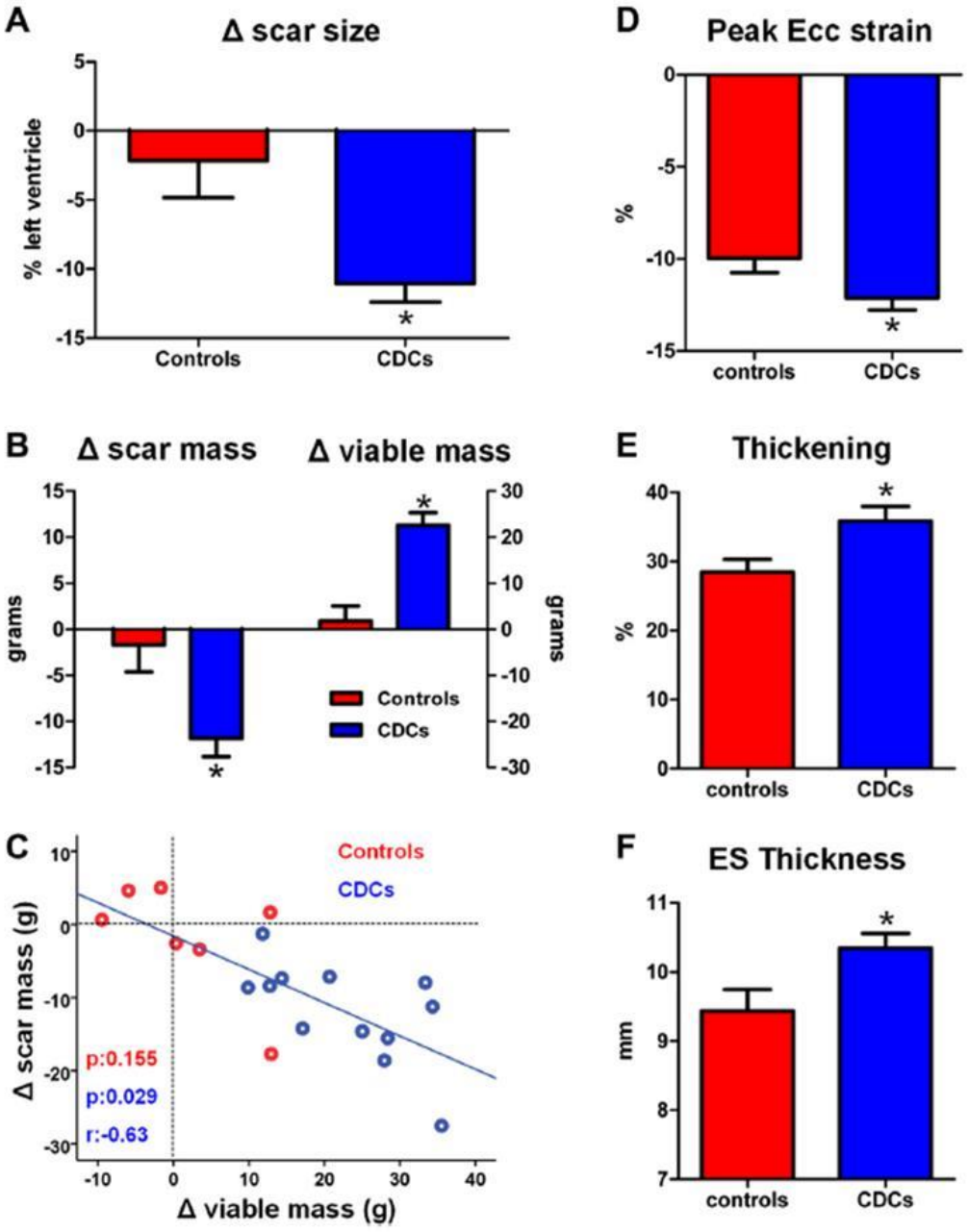


Figure 7 : Principaux résultats de l'étude CADUCEUS. La taille de l'infarctus est diminuée chez les patients traités comparativement au placebo (A). Parallèlement, la masse de l'infarctus diminue également alors que la masse viable augmente (B). Chez les patients traités cette diminution de taille d'infarctus corrèle avec l'augmentation de masse viable (C) aboutissant à une fonction systolique améliorée chez ces patients (D, E et F). D'après Malliaras et collaborateurs[175].

Plusieurs autres études sont actuellement en cours de réalisation avec des thérapies allogéniques. Dans la cardiopathie ischémique, l'étude ALLSTAR étudie la même population

que l'étude CADUCEUS mais avec des cellules allogéniques. Quatorze patients ont été initialement inclus avec des résultats rassurants en termes de sécurité et une diminution de taille de la cicatrice d'infarctus semblant se confirmer. Cette étude a donc été étendue à une phase IIb incluant plusieurs centaines de patients. Dans les autres indications de thérapie cellulaire cardiaque (cf infra), 3 études sont en cours de réalisation ; l'une porte sur la cardiomyopathie dilatée non ischémique, la deuxième sur la cardiopathie associée à la maladie de Duchenne, et la troisième sur l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée. Ces trois études ont en commun une thérapie par CDCs allogéniques injectées dans les 3 vaisseaux coronaires par perfusion sans interruption de flux.

7. Résultats des études dans les autres indications de thérapie cellulaire

Tout le développement pré-clinique et les études préliminaires humaines décrites précédemment concernent l'infarctus du myocarde, soit à sa phase aiguë, soit constitué dans le cadre de l'insuffisance cardiaque post-infarctus. Mais d'autres indications de thérapie cellulaire cardiaque sont à des stades de développement plus ou moins avancés.

7.1. Cardiomyopathie dilatée non ischémique

L'intérêt de la thérapie cellulaire a été évalué dans les cardiomyopathies dilatées non ischémiques. Après plusieurs études prometteuses sur des modèles de rongeurs[176-178], ces thérapies ont été directement testées chez l'Homme en raison d'un accès limité aux modèles pré-cliniques de cardiomyopathie dilatée, les rares modèles étant des modèles canins, chers et difficile de mise en œuvre. De plus, la sécurité de la thérapie cellulaire par voie intra-coronaire ou trans-endocardique ayant été démontrée dans la cardiopathie ischémique, les études pré-cliniques de sécurité étaient moins nécessaires. Ainsi plusieurs études sont en cours de réalisation ou ont été publiés récemment.

Comme pour la cardiopathie ischémique, les cellules mononuclées de moelle osseuse ont été évaluées en premier. Ces cellules ont été évaluées dans au moins trois études dont les résultats sont concordants. Dans l'étude ABCD, 81 patients ont été randomisés entre thérapie cellulaire et placebo[179]. A 3 ans, la fraction d'éjection était améliorée de 5% dans le groupe traité alors qu'elle restait inchangée dans le groupe contrôle. En parallèle, les scores

de qualité de vie étaient également améliorés. Les études TOPCARE-DCM et Regenerate-DCM ont confirmés ces résultats[140,180]. Ces deux études ont inclus respectivement 33 patients (sans groupe contrôle) et 60 patients (répartis en 4 groupes en fonction de l'administration concomitante de G-CSF). Dans ces 2 études, la thérapie cellulaire était associée à une amélioration de la fraction d'éjection de 5% et 3% respectivement, ainsi qu'une amélioration du NT-pro-BNP et des symptômes. En revanche, l'étude MiHeart study ayant randomisée 106 patients était négative[181].

Les cellules progénitrices circulantes ont également été évaluées dans une étude randomisée plus large avec des résultats très prometteurs. Vrtovec et collaborateurs ont randomisé 110 patients entre thérapie cellulaire par voie intra-coronaire et placebo, avec un suivi relativement long (5 ans)[182]. Dans cette étude, la thérapie cellulaire était associée à une augmentation de la fraction d'éjection, maximale à 3 ans (+8%), associée à une amélioration du test de marche de 6 minutes et une baisse du NT-proBNP. De plus, on observait dans cette étude une diminution significative de la mortalité liée principalement à une diminution de la mortalité par insuffisance cardiaque.

Les MSCs ont quant à elles été évaluées dans peu d'études jusqu'à présent. L'étude POSEIDON-DCM a comparé l'administration trans-endocardique de MSCs autologues et allogéniques chez 37 patients. Le traitement allogénique permettait une augmentation significative de la fraction d'éjection de 8% ainsi qu'une amélioration significative également du test de marche, des scores de qualité de vie et une diminution du NT-proBNP[183]. Les améliorations observées avec la thérapie autologue n'étaient pas significatives. La deuxième étude ayant évalué les MSCs dans la cardiopathie dilatée a testé leur administration par voie intra-veineuse chez 22 malades (10 traités par MSCs, et 12 traités par placebo). Si une amélioration du test de marche et des scores de qualité de vie était observée, il n'existait aucune différence en termes de fraction d'éjection et de volume ventriculaire. Néanmoins, l'administration intra-veineuse rend difficile l'interprétation de ces résultats concernant l'efficacité des cellules utilisée étant donné les problèmes de ciblage et de rétention précédemment décrits avec cette approche.

Enfin, les cellules souches cardiaques sont en cours d'évaluation dans l'étude DYNAMIC (phase 2) qui évalue l'administration des CDCs par injection dans les 3 vaisseaux

coronaires dans la cardiomyopathie dilatée. Les résultats préliminaires (14 patients) sont rassurants concernant l'efficacité et suggèrent une amélioration de la fraction d'éjection de 16% associée à une amélioration fonctionnelle (test de marche et questionnaires de qualité de vie).

7.2. Angor réfractaire

En raison des propriétés pro-angiogéniques des cellules souches et de leur capacité à améliorer la perfusion myocardique, la thérapie cellulaire a été testée chez les patients présentant un angor dit réfractaire. Ces patients présentent un angor résistant au traitement médical et sans possibilité de revascularisation en raison de lits d'aval des artères épicardiques très altérés, d'impossibilité technique, ou en raison d'anomalies de la microcirculation.

Dans cette indication, seules les cellules souches médullaires ou circulantes ont été testées. Quatre études ont étudié les cellules mononuclées de la moelle injectées par voie trans-endocardiques (dans 3 de ces études)[184-186], et une étude par voie veineuse rétrograde en cathétérisant le sinus coronaire[187]. Dans ces 4 études, l'injection de cellules mononuclées de moelle améliore la perfusion myocardique mesurée par scintigraphie et ceci est associé à une meilleure qualité de vie mesurée par des scores, par la classe d'angor et par le stade NYHA de dyspnée. Enfin il est également observé une amélioration de la tolérance à l'effort et une diminution du nombre de segment ischémique (études de van Ramshorst et collaborateurs[186] et de Beeres et collaborateurs[184]).

Plusieurs études ont étudié l'injection de cellules CD34+. Deux d'entre elles ont montré que la thérapie cellulaire était associée à une diminution des symptômes angineux et une amélioration de la perfusion respectivement après leur administration par voie trans-endocardique chez 167 patients[188] et intra-coronaire chez 112 patients[189]. En revanche, l'étude RENEW a été arrêtée par le promoteur pour des raisons stratégiques (économiques) après inclusion de 112 patients[190]. Ainsi, le nombre de patients prévus n'ayant pas été inclus, la puissance nécessaire pour montrer un effet n'était pas atteinte.

Enfin, les études REGENT-VSEL et PROGENITOR ont utilisé des cellules CD133+ injectées par voie trans-endocardique sur un faible nombre de patients avec des résultats

différents[191,192]. Si l'étude PROGENITOR montrait une diminution des symptômes angineux et une amélioration de la perfusion[191], l'étude REGENT-VSEL était négative pour tous les critères de jugement (perfusion, fonction ventriculaire gauche et symptômes)[192]. Une autre étude a également fait appel à l'injection de pro-mononcytes et montré une amélioration de la qualité de vie et des symptômes[193].

Deux meta-analyses ont récemment compilé la majorité de ces études avec pour résultats, un bénéfice de la thérapie cellulaire sur les symptômes angineux et la perfusion myocardique, mais également sur la survenue d'évènements cardiaques majeurs[192,194].

8. Mécanisme d'action

8.1. Trans-différentiation des cellules injectées

L'idée initiale de la thérapie cellulaire était que tous les types cellulaires décrits précédemment avaient des capacités plus ou moins marquées de différentiation en cardiomyocytes qu'elles allaient (après s'être ancré et multiplié dans le myocarde) se différencier en cardiomyocytes permettant ainsi une véritable « régénération » cardiaque[195,196]. Néanmoins, plusieurs arguments vont contre cette hypothèse. Tout d'abord, le potentiel de différentiation en cardiomyocytes est très controversé pour certains types cellulaires notamment pour les cellules de moelle osseuse et les cellules CD34+, certaines études décrivant cette différentiation comme possible[197-199] alors que d'autres travaux réfutent cette possibilité[182,200]. Concernant les cellules souches cardiaques, une différentiation cardiomyocytaire est possible mais l'importance de cette différenciation n'est pas suffisamment importante pour expliquer le bénéfice observé[123,201-203]. Néanmoins ce paradigme pourrait être différent avec les cellules souches embryonnaires. En effet, dans un article publié dans Nature en 2014, Chong et collaborateurs ont montré que des cardiomyocytes dérivés de cellules souches embryonnaires humaines injectées par voie trans-épicardique quelques jours après un infarctus chez des singes étaient capables de « remusculariser » le cœur, par greffe et intégration dans le myocarde des cellules humaines injectées[85]. Néanmoins, les mécanismes sont ici différents puisque ce sont des

cardiomyocytes matures issus de ces cellules souches embryonnaires qui ont été directement injectés dans le myocarde.

8.2. Action paracrine

Plusieurs données ont fait suspecter un autre mécanisme à la trans-différentiation des cellules injectées. Tout d'abord, comme décrit précédemment, cette trans-différentiation, si elle semble être possible, est beaucoup trop faible pour expliquer les modifications structurelles observées. De plus, il a été démontré que la survie des cellules après injection est très faible, de l'ordre de 5% à 24 heures après une d'injection intra-coronaire de CDCs, et d'environ 15% lors d'une injection intra-myocardique, jusqu'à devenir quasi nulle quelques semaines après l'injection[124,128,130,172]. Or, le bénéfice clinique observé de cette thérapeutique se prolonge jusqu'à plusieurs mois après l'injection des cellules, rendant très peu plausible le fait que ce bénéfice soit lié à l'ancrage[126,178], la multiplication puis la trans-différentiation des cellules. Enfin, en dehors des cardiomyocytes dérivés de cellules souches embryonnaires, les cellules injectées et les potentiels cardiomyocytes générés ne restaurent pas toujours une architecture normale du receveur[204,205].

En raison des capacités sécrétrices importantes des cellules souches *in vitro*, l'hypothèse d'un mode d'action paracrine a donc été émise[206]. En effet, il a été démontré que l'expression génique des MSCs comprend la transcription de nombreux gènes impliqués dans la résistance à l'apoptose, dans l'angiogenèse et dans le renouvellement de la matrice extracellulaire. De plus, la sécrétion protéique de ces cellules permet de relier les protéines correspondant à ces différents gènes[207-215]. L'étape suivante a été d'utiliser le milieu de culture dans lequel ont été cultivées les cellules et d'analyser ses propriétés. Ce milieu de culture conditionné a tout d'abord été utilisé *in vitro*. Il a été démontré qu'il était capable de protéger les cellules contre l'apoptose et de stimuler la formation de tubes vasculaires[216]. Ces différents résultats indiquent bien la présence de facteurs secrétés par les cellules souches. Ces milieux conditionnés ont ensuite été utilisées *in vivo* dans divers modèles animaux de rongeurs et de porcs[202,213,214,216,217]. On observe une diminution de l'apoptose mesurée dans la zone infarcie ainsi que dans les zones bordantes ainsi qu'une augmentation de la densité vasculaire. De plus, la prolifération cardiomyocytaire est significativement augmentée chez les animaux traités en comparaison aux animaux non traités. Enfin,

l'injection de ce seul milieu conditionné permet d'obtenir un bénéfice sur la taille de l'infarctus et la fonction ventriculaire gauche à la fois dans des modèles de rongeurs et de gros animal.

Par ailleurs, les ARN messagers des principaux facteurs de croissances humains sont exprimés au site d'injection jusqu'à 3 semaines après traitement, et ce malgré l'absence de cellules humaines résiduelles après 3 semaines[202]. De plus, il a été confirmé que les CDCs et les MSCs augmentent l'angiogenèse et la prolifération des cardiomyocytes mais surtout que la grande majorité des vaisseaux et cardiomyocytes ainsi formés le sont à partir de cellules du receveur[110,203,218]. En effet la part de ces néo-vaisseaux et des néo-cardiomyocytes formée par les cellules injectées était autour à 10% du total de néo-vaisseaux et néo-cardiomyocytes formés. Ces nouveaux cardiomyocytes formés le sont d'une part par la stimulation de la prolifération de cardiomyocytes matures, et d'autre part par le recrutement de cellules cardiaques progénitrices.

Ainsi les cellules souches vont donc agir de façon paracrine sur plusieurs types cellulaires et il est maintenant acquis que les cellules injectées vont favoriser la réparation myocardique en agissant sur 6 processus (Figure 8) :

- augmentation de la genèse de nouveaux cardiomyocytes : comme décrit précédemment, plusieurs études ont démontré la capacité des cellules souches (cardiaques ou mésenchymateuses) à stimuler la prolifération des cellules couches cardiaques endogènes mais également des cardiomyocytes matures. Cette stimulation se fait potentiellement via la sécrétion de facteur de croissance tels que l'hepatocyte growth factor et l'insulin growth factor 1[87,110,219-221]. Ces facteurs de croissance vont induire la migration de cellules souches cardiaque puis leur prolifération et leur différentiation en cardiomyocytes et en structures vasculaires ;
- induction de la néo-vascularisation : la plupart des cellules souches sont capables d'induire une néo-vascularisation grâce à la sécrétion de chimiokines (*stromal cell derived factor 1*) et de facteurs de croissance pro-angiogéniques (*vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, tissu growth factor β* et *angiopoietin 1* entre autres)[211,222-224]. Des cellules progénitrices endothéliales

recrutées au site ischémique vont également promouvoir la néo-angiogenèse par la prolifération de cellules endothéliales grâce à la sécrétion de NO synthase[222]. Cette néo-vascularisation sera particulièrement bénéfique dans le cas de l'angor réfractaire en rapport avec des occlusions coronaires chroniques et des pathologies de la micro-circulation ;

- inhibition de l'apoptose[105,206,225-228] ;
- inhibition de l'hypertrophie cardiaque[87,90,198,219,220,229,230] : cependant il est difficile de dire si cette diminution de l'hypertrophie est la conséquence de l'amélioration fonctionnelle cardiaque ou l'un de ses mécanismes ;
- remodelage de la matrice extra-cellulaire : les cellules souches vont modifier la matrice extra-cellulaire de plusieurs façons[30,91,96,231]. Tout d'abord elles vont augmenter le renouvellement de la matrice extra-cellulaire par l'activation de certaines métalloprotéinases matricielles et de certains inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (MMP2, MMP13, TIMP2) et l'inhibition d'autres (MMP9). Par ailleurs, les cellules souches vont inhiber la voie du TGF-β, diminuant par conséquent la prolifération des fibroblastes, leur différentiation en myo-fibroblastes et la synthèse de collagène et donc au total, la fibrose cardiaque ;
- inhibition de l'inflammation : les cellules souches vont être capables de moduler l'inflammation et la réponse immunitaire[127,128,174,231]. En effet, ces cellules lorsqu'injectées dans un milieu très inflammatoires, vont pouvoir diminuer l'infiltration locale de cellules inflammatoires (notamment de macrophages), de modifier le phénotype de ces cellules inflammatoires et enfin de diminuer de façon importante la production locale de cytokines pro-inflammatoires au profit de cytokines plus anti-inflammatoires[174]. Dans des modèles plus chroniques, cette diminution de l'inflammation est étroitement liée à la diminution de la fibrose puisque, la diminution de l'inflammation locale et du recrutement des monocytes entraine la diminution de la sécrétion de TGF-β et par conséquent une diminution de la fibrose[30,231].

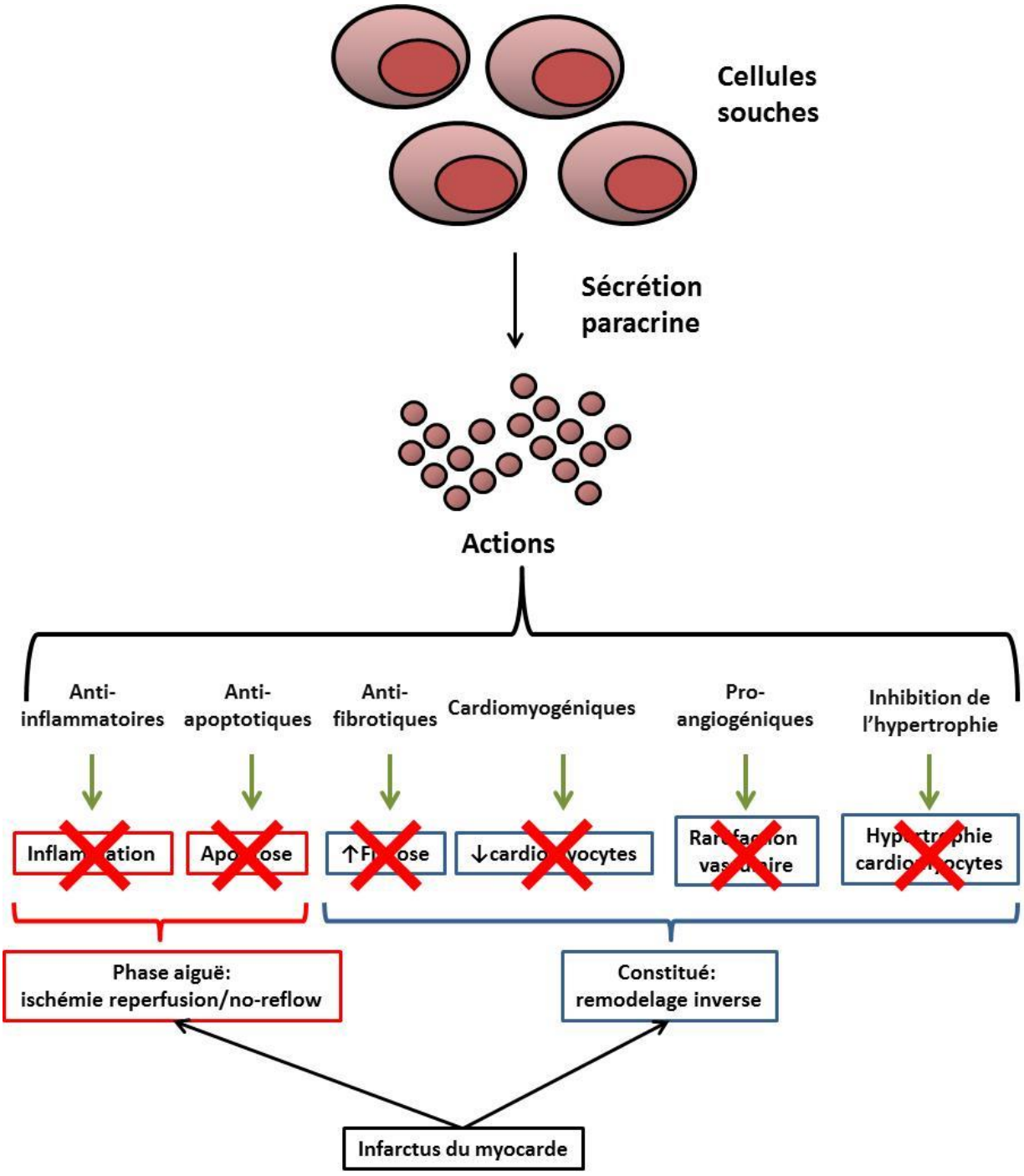


Figure 8 : Représentation schématique des différentes actions paracrines des cellules souches

8.3. Rôle des exosomes

8.3.1. Définition, nomenclatures

Les exosomes ont été définis à l'origine comme des particules formés d'une bicouche lipidique et libérées par les cellules. Cette définition a par la suite été modifiée pour incorporer un critère de taille (les vésicules de 20 nm à 150 nm) et la taille est devenue un critère majeur pour différencier les exosomes des autres particules et notamment des microvésicules[232,233]. Historiquement les exosomes avaient été nommés ainsi en fonction de leur origine ; ainsi, les exosomes secrétés par les cellules tumorales avaient été nommés oncosomes et ceux sécrétés par les cellules dendritiques avaient été appelés dexosomes. Cette terminologie avait abouti à une grande confusion avec au moins 20 termes différents décrivant des particules lipidiques libérées par des cellules sans tenir aucun compte de leur taille, de leur contenu ou de leur origine.

Les vésicules extra-cellulaires ont donc été classées selon leur taille et leur origine. Les exosomes (diamètre 20-150 nm) sont des vésicules extra-cellulaires provenant des endosomes. Les microvésicules (diamètre 50-1000 nm) proviennent de l'évagination de la membrane plasmique de cellules lésées ou stimulées. Les apoptosomes (diamètre 50-5000) proviennent de fragments de cellules subissant une mort programmée. Par ailleurs, les analyses protéomiques ont permis d'identifier de nouveaux marqueurs permettant de classer plus précisément encore ces vésicules[234]. Ainsi, les vésicules extra-cellulaires sont sub-divisées en vésicules larges, moyennes et petites sédimentant respectivement à vitesse de centrifugation faible (2000g), intermédiaire (10000g) et haute (100000g), la dernière fraction étant celle contenant les exosomes. Les petites vésicules extra-cellulaires (<200nm) comprennent des exosomes mais également d'autres populations vésiculaires pouvant être divisées en : 1) exosomes enrichis en marqueurs d'exosomes (CD63, CD81 et CD9) et d'endosomes (syntenin-1, tumour susceptibility gene-101) ; 2) petites vésicules extra-cellulaires négatives pour CD63 et CD 81 mais positive pour CD9 ; 3) petites vésicules extracellulaires négatives pour les 3 marqueurs précédents et 4) petites vésicules extra-cellulaires porteuses de protéines de matrice extra-cellulaires ou de facteurs sériques. Il est important de noter que cette classification complexe est rarement utilisée, et qu'en pratique

quotidienne, il est difficile de différencier les exosomes des autres petites vésicules extra-cellulaires.

8.3.2. Biogénèse et sécrétion

Les exosomes proviennent des endosomes qui naissent d'invaginations de la membrane plasmiques. Celles-ci vont fusionner avec des cargaisons triées dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de golgi pour former des endosomes multivésiculaires ou corps multi-vésiculaires. Ceux-ci contiennent des vésicules intra-luminales, les exosomes qu'ils libèrent dans le milieu extra-cellulaire par fusion avec la membrane plasmique (Figure 9). Ces exosomes vont empaqueter une cargaison spécifique de la cellule qui les produit. Une fois libérés par la cellule pourront grâce à cette cargaison agir de façon paracrine ou endocrine. Le signal sera transmis par contact entre l'exosomes et la membrane cellulaire ou des récepteurs membranaires, par fusion avec la membrane ou par endocytose[232,235].

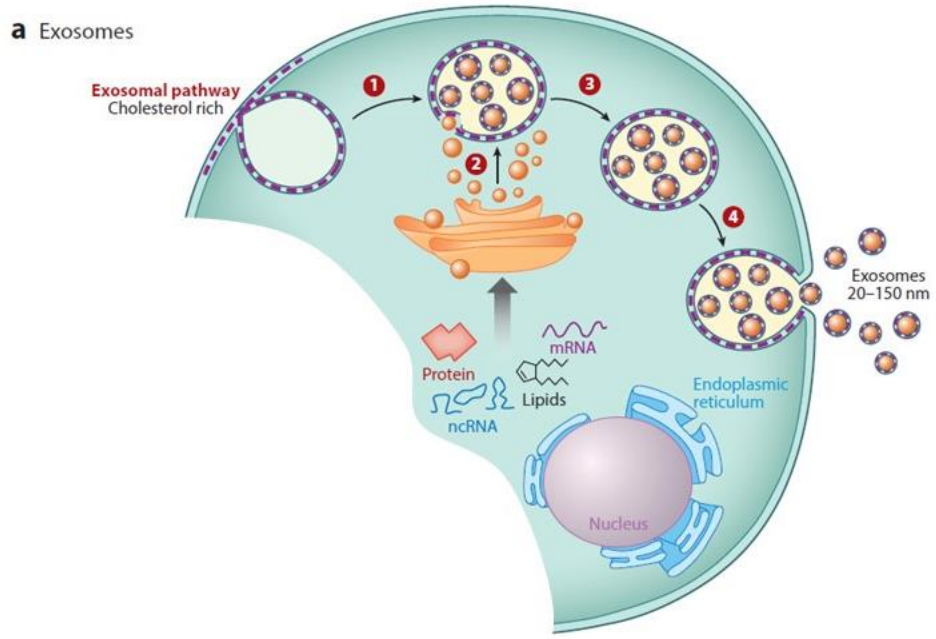


Figure 9 : Genèse et sécrétion des exosomes (Ibrahim et collaborateurs, 2016) (en rouge). Etape1 : Invagination de la membrane plasmique pour former un endosome. Etape 2 : « chargement » du contenu (protéines, ARN) par invagination dans l'endosome formant ainsi un endosome multivésiculaire. Etape 3 : maturation de l'endosome par acidification. Etape 4 : Fusion de l'endosome avec la membrane plasmique sous l'action de stimuli variés, permettant la libération extra-cellulaire des exosomes. D'après Ibrahim et collaborateurs[232].

8.3.3. Composition des exosomes

Les exosomes provenant de différents types cellulaires contiennent des lipides et des protéines membranaires différents, et leur contenu interne est spécifique de la cellule mère (Tableau 2).

8.3.3.1. Lipidiques membranaires

La composition lipidique des exosomes est différente de celle de la membrane plasmique. La membrane des exosomes est plus riche en cholestérol, céramides, phosphoglycérides et sphingolipides notamment, expliquant en partie la grande rigidité de cette membrane comparée à la membrane plasmique[236-238]. Certains de ces lipides sont impliqués dans le trafic des exosomes notamment durant leur synthèse, la reconnaissance de ces exosomes et leur internalisation.

8.3.3.2. Protéines membranaires

La majorité des protéines membranaires sont des protéines de transport et de fusion incluant notamment des tétraspanines (CD63, CD81 et CD9), des protéines (Hspa8, Hsp90), des GTPases (EEF1A1, EEF2) et des protéines endosomales. Les autres protéines présentes sont des protéines du cytosquelette, des protéines de signalisation métaboliques et de transport[239,240]. L'expression relative de toutes ces protéines dépend en grande partie de l'origine des exosomes. Il convient de noter que les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de type 1 sont présents sur tous les exosomes alors que celles du type 2 ne sont présentes que sur les exosomes sécrétés par les cellules présentatrices d'antigènes.

8.3.3.3. Contenu des exosomes

Le contenu interne des exosomes est ce qui conditionne en grande partie leur spécificité. En effet, ce contenu est une véritable « signature » dépendant de la cellule mère et expliquant les propriétés d'exosomes sécrétés par un type cellulaire comparés à ceux provenant de cellules différentes. Ce contenu est composé pour l'essentiel de 2 éléments, des protéines et des ARN, notamment des ARN non codants. Concernant les protéines, les exosomes peuvent contenir des enzymes, des facteurs de transcription et des protéines structurelles[239,240]. Néanmoins, la principale source d'hétérogénéité de signalisation entre les différents exosomes semble être la grande variété d'ARN présents, comprenant non seulement des ARN messagers mais également toutes sortes d'ARN non codants et

notamment des micro-ARN et des ARN de transfert[241-244]. Etant donné qu'il a été démontré que les micro-ARN sont impliqués dans la régulation de nombreux processus biologiques, leur présence dans les exosomes confirme l'implication des exosomes dans la communication inter-cellulaire. Lors de l'interaction des exosomes avec la cellule réceptrice, ces ARN non codants seront capables de modifier le phénotype et l'expression génique de cette cellule cible, aboutissant à une grande variété d'effets possibles en fonction du type d'exosome. Les mécanismes de sélection des ARN lors de la biogénèse des exosomes sont encore mal connus. Il semble que la sélection des protéines implique des interactions avec CD63, Alix et d'autres protéines transmembranaires. De plus, des motifs spécifiques présents sur certains micro-ARN pourraient faciliter leur intégration dans les exosomes par des liaisons avec des protéines chaperonnes. Enfin, des modifications post-transcriptionnelles pourraient également être impliquées dans le tri des micro-ARN. Si ces mécanismes restent encore mal élucidés, il est important de noter que la spécificité du « cocktail » d'ARN contenu dans les exosomes est telle que ces derniers ont pu être utilisés à visée diagnostic ou pronostic dans certaines pathologies notamment tumorales.

8.3.3.4. Méthode d'isolement

La méthode de référence pour l'isolement des exosomes est la centrifugation. D'autres techniques ont émergé ces dernières années parmi lesquelles la filtration, la chromatographie et la séparation à l'aide de billes[232]. Les techniques de centrifugation ont également été modifiées dans certains protocoles avec l'ajout d'un composé lipidique permettant de précipiter les exosomes avant centrifugation.

8.3.3.5. Rôle des exosomes en pathologie cardio-vasculaire

L'implication des exosomes dans la propagation des maladies a précédemment été largement décrite dans les cancers où ils participent à la communication intra-cellulaire favorisant notamment la croissance tumorale, le recrutement de vaisseaux, la résistance à la chimiothérapie et la génèse de métastase[245]. Sur le plan cardio-vasculaire, la description de l'implication des exosomes est plus récente. Des exemples d'implications de certains exosomes dans des processus bénéfiques ou pathologiques sont montrés dans le tableau 2.

Releasing cell type	Molecular mediator(s)	Stimulus	Recipient cell	Biological effect	Ref.
Therapeutic effects					
Rat CM	HSP70, HSP90	Hypoxia	CM	Cytoprotection	22
EC	miR-214	–	EC	Migration, angiogenesis	26
MSC	miR-22	Ischaemic preconditioning	CM	Cardioprotection	32
Human CDC	miR-146a	–	CM, fibroblast	Cardioprotection, anti-fibrosis	11
Human CPC	miR-210, miR-132	–	CM, EC	Cardioprotection, angiogenesis	12
Mouse CPC	miR-292, miR-210, miR-103, miR-17	Hypoxia	EC, fibroblast	Angiogenesis, anti-fibrosis	34
ND (plasma Exo)	HSP70	RIC	CM	Cardioprotection	35
Mouse cardiac cells	miR-144	RIC	CM	Cardioprotection	38
Pathogenic effects					
Mouse CM	Angiotensin II R1	Cardiac pressure overload	CM, EC, VSMC	Angiotensin II responsiveness	24
Human microvasc. EC	ICAM-1	TNF-α	EC	Vascular inflammation	25
Mouse EC	miR-146a	16-kDa N-terminal prolactin fragment	CM	Depressed CM function	27
Cardiac fibroblast	miR-21-3p/miR-21*	Angiotensin II	CM	CM hypertrophy	29
Platelet	Superoxide, NO, peroxynitrite	LPS, NO	EC	Apoptosis	42
CM	miR-320	Hyperglycaemia	EC	Anti-angiogenesis	23

Examples of beneficial or pathogenic effects of exosomes are shown (CM, cardiomyocyte; EC, endothelial cell; HSP, heat shock protein; MSC, mesenchymal stem cell; NO, nitric oxide; VSMC, vascular smooth muscle cell; RIC, remote ischemic preconditioning).

Tableau 2 : Exemples d'effets cardio-vasculaires des exosomes. D'après Barile et collaborateurs[246]. Références présentées :[247-260]

Au cours du développement de différentes cardiopathies, les exosomes jouent un rôle pro-inflammatoire. Par exemple, dans le diabète de type 2, l'hyperglycémie altère la sécrétion d'exosomes par les cardiomyocytes, aboutissant à la sécrétion d'exosomes riches en miR-320, lequel va agir sur les cellules endothéliales et inhiber leur prolifération, leur migration et la formation de néo-vaisseaux[260]. Les exosomes sont également impliqués dans le remodelage cardiaque. En effet, sous l'action de différents stress (hypertension artérielle, ischémie, dysfonction valvulaire…), les cardiomyocytes vont s'hypertrophier. Cette réponse hypertrophique est liée à l'interaction entre les cardiomyocytes et les autres cellules cardiaques telles que les fibroblastes, les cellules inflammatoires et les cellules endothéliales. Le stress cellulaire va modifier la sécrétion des exosomes par les cardiomyocytes et stimuler la production d'exosomes contenant des facteurs pro-inflammatoires et pro-apoptotiques (Hsp60 et TNF-α notamment)[258,261,262]. Cela va entraîner la mort des cardiomyocytes proches, provoquant une augmentation de l'inflammation de

proche en proche, et par un cercle vicieux, une augmentation de l'étendue de la fibrose. Enfin, les exosomes pourraient être impliqués dans l'arythmie. En effet, les exosomes sécrétés par les cardiomyocytes des patients coronariens mais également des rats souffrant d'une ischémie myocardique sont riches en miR-1 et miR-133[263]. Or ces deux micro-ARN modifient le potentiel d'action et la conduction cardiaque par action sur la protéine kinase 2 Calcium/calmoduline dépendante[264].

Mais ces exosomes peuvent également avoir des effets bénéfiques. En effet, il a été démontré qu'une fraction du plasma riche en exosomes protège contre l'ischémie reperfusion. Hsp70 qui est exprimé à la surface des exosomes va se lier au toll-like récepteur 4 présent à la surface des cardiomyocytes, déclenchant ainsi une cascade d'activation favorisant la survie des cardiomyocytes[253]. Lors du conditionnement ischémique, les exosomes sont probablement impliqués dans les effets cardioprotecteurs de cette approche. En effet, lorsque des coeurs de rats isolés sont soumis à des cycles d'ischémie reperfusion, ils sécrètent des exosomes dans le perfusat en plus grande quantité qu'en l'absence de stimulation ; lorsque ces exosomes sont injectés chez un receveur avant la réalisation d'un infarctus, ils exercent un effet cardioprotecteur comparable à celui du pré-conditionnement ischémique, lequel effet disparaît lorsque les vésicules extra-cellulaires sont supprimées du perfusat réinjecté[265]. Par ailleurs, il a été démontré que le post-conditionnement à distance augmente la présence du précurseur de miR-144 dans les exosomes et celle de miR-144 dans le myocarde. L'administration systémique de miR-144 réduit la taille de l'infarctus de façon comparable au post-conditionnement à distance, alors que l'ajout d'un oligonucléotide antisens de miR-144 abolit cet effet[254].

8.3.3.6. Rôle des exosomes dans la thérapie cellulaire

Comme détaillé précédemment, le mode d'action principal des cellules souches est un mode d'action paracrine basé sur la communication intercellulaire. Etant donné le rôle important joué par les exosomes dans la communication inter-cellulaire, il a été émis l'hypothèse que les exosomes pourraient être des acteurs de l'action des cellules souches sur les cellules du receveur. En effet le milieu de culture des cellules, qui a montré être aussi

efficace que les cellules elles-mêmes, contient, outres des facteurs de croissance et des protéines, des exosomes sécrétés par ces cellules.

Dans ce contexte, les premiers exosomes à être étudiés ont été ceux sécrétés par les MSCs. En 2010, Lai et collaborateurs ont démontré que les MSCs dérivés de cellules embryonnaires produisent des exosomes de 50 à 100 nm. Ceux-ci, réduisent les lésions d'ischémie reperfusion dans un modèle de souris[266]. Le même groupe a par la suite démontré que ces exosomes diminuent le stress oxydant dans le cœur suite à l'ischémie reperfusion et permettent une préservation à long terme de la fonction et des volumes ventriculaires gauches[267]. Les propriétés anti-inflammatoires des exosomes sécrétés par les MSCs ont par la suite été démontrées dans d'autres pathologies comme l'hypertension artérielle pulmonaire ou l'ischémie reperfusion rénale[268]. Concomitamment, des travaux ont étudiés les exosomes sécrétés par les cellules hématopoïétiques. Sahoo et collaborateurs ont démontré que les cellules CD34+ sécrètent des vésicules exprimant les marqueurs traditionnels des exosomes tels que le CD63, la phosphatidylsérine et le TSG101[269]. Ces exosomes ont des propriétés pro-angiogéniques, non reproduites par les exosomes de cellules CD34-. Plusieurs micro-ARN (miR-126 et miR-130a) ont été identifiés comme participant à cet effet pro-angiogéniques[270]. Par ailleurs, Mackie et collaborateurs ont modifié génétiquement des cellules CD34+ pour surexprimer Sonic Hedgehog (SHH) un médiateur connu de l'angiogenèse. Les cellules obtenues avaient des propriétés pro-angiogéniques plus importantes, liées à un enrichissement de leurs exosomes en SHH[271]. Au total, ces données suggèrent fortement que les propriétés pro-angiogéniques des cellules CD34+ sont liées au contenu des exosomes qu'elles sécrètent.

Concernant les cellules souches cardiaques, une première étude publiée par Ibrahim et collaborateurs a démontré le rôle primordial des exosomes dans le mécanisme d'action de la thérapie cellulaire[251]. Les exosomes produits par les CDCs ont été isolés puis évalués *in vitro* puis *in vivo*. *In vivo*, ces exosomes sont capables de stimuler la synthèse de tubes vasculaires, de protéger les cellules contre l'apoptose et de stimuler la prolifération des cardiomyocytes néonataux, alors que les exosomes dérivés de fibroblastes utilisés comme contrôle ne le peuvent pas. Ces exosomes sécrétés par les CDCs ont ensuite été comparés *in vivo* à un contrôle (exosomes de fibroblastes). Administrés à la phase aiguë, les exosomes de CDCs diminuent la taille de l'infarctus et augmentent la masse viable à 30 jours, tout en

augmentant l'épaisseur myocardique de la zone infarcie comparativement aux exosomes de fibroblastes. Dans un modèle d'infarctus constitué, un bénéfice était également observé avec une amélioration absolue de 15% de la fraction d'éjection et une diminution relative de 50% de la taille de la cicatrice d'infarctus, le tout étant associé à une augmentation de la densité vasculaire. Dans un deuxième temps, des CDCs ont été traitées avec une molécule inhibant la libération des exosomes (GW4869). Ces CDCs ne libérant pas d'exosomes perdent *in vitro* leurs propiétés anti-apoptotiques, et *in vivo* leur effet en post-infarctus. En effet, la diminution de la taille de la cicatrice et l'amélioration de la fraction d'éjection ne se produisent qu'avec les CDCs non traitées par GW4869, démontrant ainsi que les exosomes sont nécessaires à l'action des cellules CDCs. Ensuite, les micro-ARN exprimés dans les exosomes de CDCs ont été comparé à ceux des exosomes contrôles sécrétés par des fibroblastes. Plusieurs micro-ARNs sont sur- ou sous-exprimés dans les exosomes de CDCs par rapport aux exosomes de fibroblastes, le plus sur-exprimé étant miR-146a. Les auteurs se sont donc intéressés à ce microARN. Ils ont démontré que miR-146a est cardioprotecteur puisque sa suppression augmente la taille de l'infarctus et l'importance de la dysfonction ventriculaire gauche et que la réadministration d'un miR-146 recombinant permet de retrouver la taille d'infarctus et la dysfonction ventriculaire gauche des animaux contrôles. De plus, l'administration de miR-146a dans des modèles aigu et chronique d'infarctus permet de reproduire une partie du bénéfice des CDCs et de leurs exosomes. Dans un modèle aigu, miR-146a a les mêmes effets, avec une diminution de la taille de l'infarctus et un moindre remodelage inverse ; en revanche dans le modèle chronique, les effets de mi-146a reproduisent de façon très incomplète les effets des CDCs puisque seule l'augmentation de la masse viable est observée sans augmentation significative de la fraction d'éjection. Ces dernières données suggèrent que les effets liés aux exosomes sont probablement liés à un cocktail d'ARNs non codants et pas seulement à un seul micro-ARN.

La deuxième mise en évidence du rôle mécanistique des exosomes dans la thérapie cellulaire par les cellules souches cardiaques a été publiée dans le même temps qu'Ibrahim et collaborateurs et a utilisé des cellules progénitrices cardiaques obtenues à partir de l'auricule droit[250]. Barile et collaborateurs ont isolé les vésicules extra-cellulaires sécrétées par ces cellules et montré que la grande majorité de ces vésicules sont des exosomes sur des critères à la fois de taille et de marqueurs de surface, et que ces exosomes ont *in vitro* des

propriétés anti-apoptotiques et pro-angiogéniques. Ils ont ensuite démontré que ces exosomes sont internalisés par les cardiomyocytes lors de l'incubation de ces derniers avec les vésicules extra-cellulaires sécrétées par les cellules progénitrices cardiaques. Cette internalisation a pour conséquence l'augmentation importante de l'expression de plusieurs micro-ARN par les cardiomyocytes parmi lesquels figurent miR-210 et miR-132. L'analyse des propriétés de ces 2 micro-ARN *in vitro* a permis de mettre en évidence leurs propriétés anti-apoptotiques et pro-angiogéniques, confirmant ainsi que les exosomes transportent des micro-ARN aux propriétés diverses. Les exosomes de ces cellules progénitrices cardiaques ont ensuite été évalués *in vivo* dans des modèles d'infarctus chez des rats. Il a ainsi été observé une amélioration de la fraction d'éjection et du remodelage inverse dans des proportions similaires à celle observée après administration des cellules elles-mêmes. De plus ces exosomes diminuent la taille de l'infarctus et augmentent la masse viable. Tous ces effets bénéfiques étaient associés à une augmentation de la densité vasculaire et une diminution de l'apoptose.

En résumé, ces deux études montrent que : 1) les exosomes sont suffisants pour réeproduire le bénéfice observé avec les cellules souches ; 2) l'effet de la thérapie cellulaire est aboli lorsque la sécrétion des exosomes est inhibé ; 3) ces exosomes sont internalisés par les cellules receveuses et 4) ces exosomes sont porteurs de microARN dont les propriétés sont cohérentes avec les effets observés *in vitro* et *in vivo*. Il est donc très probable que les exosomes soient les principaux médiateurs de l'action des cellules souches.

OBJECTIFS DE LA THESE

Comme décrit précédemment, les cellules souches d'origine cardiaques et notamment les CDCs semblent avoir des propriétés intéressantes en termes de réparation myocardique en post infarctus. Néanmoins, plusieurs questions se posent concernant ces cellules et notamment concernant leurs dérivés, les cardiosphères d'une part dont l'efficacité pourrait être supérieure à celle des cellules isolées, et les exosomes d'autre part, qui sont des matériaux acellulaires dont l'efficacité pourrait être superposable à celle de la thérapie cellulaire. Deux études ont donc été réalisées dans ce travail, évaluant respectivement les cardiosphères et les exosomes.

Notre premier travail s'est intéressé à l'étude de l'effet des cardiosphères au cours de l'infarctus du myocarde. Les cardiosphères sont, comme décrit précédemment, des groupements tri-dimensionnels multi-cellulaires comprenant des cellules de plusieurs types. *In vitro* ces cardiosphères semblent avoir des propriétés sécrétrices et de survie, supérieures à celles des CDCs, ces propriétés étant directement liées à leur structure tridimensionnelle. De plus des études suggèrent que ces cardiosphères pourraient, *in vivo,* exercer des effets bénéfiques supérieurs aux CDCs, comme le montrent les résultats d'études réalisées dans un modèle de rongeur et dans un modèle de gros animal utilisant l'administration au cours d'une chirurgie thoracique. Néanmoins, le développement et l'utilisation des cardiosphères ont jusqu'à présent été freinés par la nécessité théorique de leur d'administration par voie intra-myocardique, leur diamètre important rendant l'administration intra-coronaire potentiellement dangereuse alors que l'administration trans-endocardique pourrait exposer au risque d'accident vasculaire cérébral en cas d'embolisation de ces cardiosphères.

Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que d'une part l'optimisation et la standardisation des conditions de culture des cardiosphères pourraient permettre d'homogénéiser et de limiter leur taille, et d'autre part que l'optimisation des conditions d'injection des cardiosphères ainsi générées pourraient autoriser une délivrance par voie intra-coronaire sans risque. Notre objectif a donc été d'évaluer le bénéfice de ces cardiosphères dans un modèle d'infarctus constitué. Outre l'évaluation pré-clinique des cardiosphères, cette étude a permis d'étudier la taille maximale et le nombre maximal de particules pouvant être injectées dans la circulation coronaire sans risque.

Notre deuxième travail s'est intéressé aux exosomes. Comme décrit précédemment, les exosomes ont un rôle majeur dans les effets de la thérapie cellulaire et des études préliminaires dans des modèles de rongeurs suggèrent que l'administration des exosomes seuls pourrait remplacer l'administration des cellules. Les exosomes pourraient avoir des avantages majeurs par rapport aux cellules. Le premier avantage est immunologique ; en effet, les exosomes sont des matériaux acellulaires et sont porteurs de moins de molécules HLA que les cellules. Cela pourrait permettre une réaction immunologique moindre dans le cas de la thérapie allogénique et d'envisager la répétition de leur administration. Le deuxième avantage est dans leur préparation. En effet, les exosomes sont des particules résistantes dont la conservation est probablement beaucoup plus aisée que celle des cellules. Ainsi les doses pourraient être facilement mobilisables (contrairement aux cellules qui sont conservée dans l'azote liquide) permettant ainsi d'en faire une utilisation rapide et non programmée. Enfin, la compréhension du rôle des exosomes dans les effets de la thérapie cellulaire pourrait amener à modifier du profil et de la composition des exosomes pour augmenter leur efficacité. Néanmoins, il convient d'abord de s'assurer 1) de la faisabilité de l'administration des exosomes par voie per-cutanée et, 2) de leur efficacité dans la cardioprotection et la prévention du remodelage inverse. Notre deuxième objectif a donc été d'évaluer dans deux modèles d'infarctus chez le porc (modèle aigu d'ischémie reperfusion et modèle d'infarctus constitué remodelant) la faisabilité et l'efficacité de l'administration des exosomes dérivés de CDCs.

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 4 : MATERIEL ET METHODES

1. Culture cellulaire

1.1. Isolation et cultures des CDCs

Les CDCs ont été obtenues selon une technique maintenant largement décrite et validée dans plusieurs laboratoires à travers le monde (Figure 5)[8]. Des fragments de cœurs de porcs ou d'Homme sont coupés en petits fragments. Une digestion enzymatique est réalisée et les fragments restants mis en culture dans des boîtes recouvertes de fibronectine. Ces fragments donnent naissance à une population cellulaire adhérente appelée EDCs (*explant derived cells*). Après 15 jours, les EDCs sont mises en culture en milieu non adhérent. Quelques jours plus tard, ces cellules s'organisent spontanément en groupement pluricellulaires tridimensionnels appelés cardiosphères. Celles-ci sont recueillies (à 72 heures) puis mises en cultures sur de la fibronectine. Elles s'organisent alors en une couche monocellulaire de cellules appelées CDCs.

1.2. Obtention des cardiosphères et optimisation des conditions de culture

Toutes les expériences utilisant des cardiosphères ont été réalisées avec des cardiosphères secondaires de porcs. Celles-ci ont été obtenues par la mise en culture de CDCs au 5^{e} passage dans un milieu non adhérent. Comme l'objectif était d'injecter ces cardiosphères par voie intra-coronaire, la taille maximale des cardiosphères synthétisées pouvait être un problème. En effet, des cardiosphères de taille trop importante pourraient être responsable d'une embolisation micro-vasculaire importante risquant de majorer les lésions ou de créer de nouvelles lésions ischémiques.

Les conditions de culture des cardiosphères ont donc été optimisées dans le but d'obtenir un pourcentage minimal de cardiosphères de plus de 150 µm (risque d'obstruction microvasculaire sévère) et un pourcentage élevé de cardiosphères de plus de 50 µm (afin de limiter au maximum l'injection de cellules uniques). Dans ce but, nous avons comparé 5 concentrations de mise en culture différentes (0,25M, 0,5M, 0,75M, 1M et 1,5M de CDCs

mises en culture) et 4 durées de culture (24h, 48h, 72h et 96h). La taille, le nombre et la distribution des cardiosphères obtenues pour chacune des 20 conditions de cultures ont été déterminés grâce à un compteur de particules.

Enfin, avant administration *in vivo*, l'intégrité des cardiosphères après passage dans le cathéter d'injection a été vérifiée. Pour ce faire, les cardiosphères ont été analysées par compteur de particules avant et après leur passage dans le cathéter d'injection (Finecross, Terumo, Tokyo, Japan) afin de vérifier l'absence de d'altération ou de destruction des cardiosphères au moment l'injection.

1.3. Isolement et caractérisation des exosomes

Des CDCs humaines au 5e passage (provenant d'un unique donneur sain) ont été cultivées jusqu'à confluence dans un milieu de culture spécifique (IMDM, Iscove's Modified Dulbecco's Medium). Lorsque la confluence était atteinte, le milieu était ensuite privé de serum de veau fœtal afin de « stresser » les cellules (Figure 10). Après 15 jours, le milieu conditionné contenant les exosomes était collecté puis filtré à travers un filtre de 450nm afin d'éliminer les débris cellulaires. Les exosomes étaient ensuite isolés via une ultrafiltration au cours d'une centrifugation (Amicon Ultra, *100kDa molecular weight cut-off*, Millipore) suivie d'une précipitation dans du poly-éthylène glycol (PEG) à 25%. Enfin, l'ensemble était centrifugé 30 minutes à 2000g et le culot contenant les exosomes était resupendu dans de l'IMDM pour injection (10mL pour l'injection intra-coronaire et 2mL pour l'injection intra-myocardique). La concentration en protéine était mesurée par le test de Bradford et la suspension finale était analysée avec un système de comptage de nanoparticules (NTA, NanoSight Ltd., Amesbury, Wiltshire, United Kingdom) pour déterminer le nombre de particules et leur taille. Toutes les doses ont été déterminées et définies par la concentration en protéines.

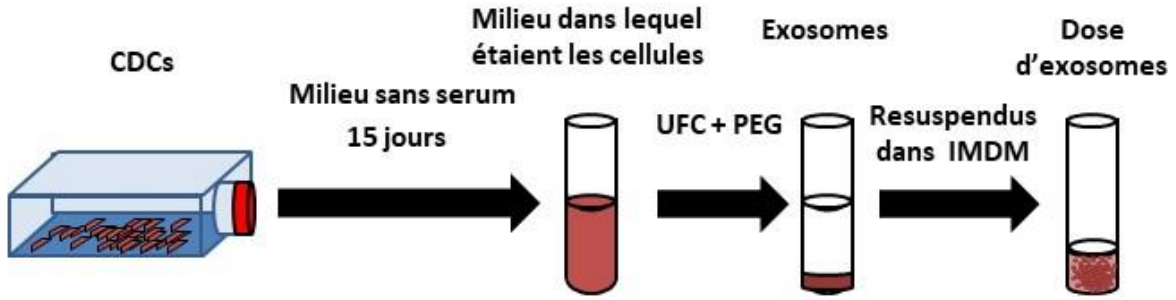


Figure 10 : Isolation des exosomes sécrétés par les CDCs. (UFC : Ultra-filtration par centrifugation ; IMDM : Iscove's Modified Dulbecco's Medium).

2. Modèles animaux

Toutes les expériences ont été réalisées chez des porcs miniatures (Yucatan) dans un laboratoire accrédité par l'American Association for Accreditation of Laboratory Animals.

Après une induction par acepromazine (0.25 mg/kg), ketamine (20 mg/kg) et propofol (0.83 mg/kg) la sédation a été entretenu par isoflurane à 1-3% et les animaux ont été ventilés pendant la procédure. L'analgésie a été assurée par administration de carprofen (4 mg/kg) et injection intra-musculaire de buprenorphine (0.1 mg/kg). Toutes les procédures intra-vasculaires ont été réalisées sous héparine à dose adaptée pour obtenir un ACT>250.

2.1. Modèle d'infarctus à sa phase aigu

2.1.1. Création de l'infarctus

Un modèle aigu d'infarctus a été réalisé pour étudier l'influence des dérivés cellulaires sur la taille de l'infarctus, les lésions de reperfusion et l'étendu de l'obstruction micro-vasculaire. Deux désilets de 8 et 10 F ont été introduits respectivement dans la carotide et la jugulaire interne. Le tronc commun a été canulé par une sonde d'angioplastie puis un guide a été avancé jusqu'à l'artère inter-ventriculaire antérieure (IVA) distale. L'infarctus a ensuite été réalisé par gonflement d'un ballon d'angioplastie dans l'IVA juste en

aval de la 1e diagonale. Après 90 minutes d'occlusion, le ballon a été dégonflé pour permettre la reperfusion. Juste après, une ventriculographie (incidence OAD 30) a été réalisée pour évaluer la fonction ventriculaire gauche.

2.1.2. Euthanasie et recueil des critères de jugements

Les animaux ont été euthanasiés 48 heures après la reperfusion. Un désilet de 8F a été introduit dans l'artère carotide afin de permettre la réalisation d'une ventriculographie et l'accès aux artères coronaires. Une thoracotomie latérale a ensuite été réalisée et un cathéter a été introduit dans l'oreillette gauche.

Pour mettre en évidence les zones dites de « no-reflow », 50 mL de thioflavine T (solution à 2%, PBS) ont été injectés sur 1 minute dans l'oreillette gauche. Ensuite un ballon d'angioplastie a été gonflé au site de l'occlusion coronaire ayant induit l'infarctus pour permettre l'identification de la zone à risque. Une solution de violet de gentiane à 1.8% (avec 40mL de PBS et 10mL d'éthanol) a été injecté sur 1 minute dans l'oreillette gauche permettant de marquer tout le cœur en violet sauf la zone précédemment ischémique dite zone à risque (artère occluse) (Figure 12).

Puis les animaux ont été euthanasiés par injection de thiopental et le cœur a été prélevé. Il a ensuite été sectionné en sections de 1cm d'épaisseur dont les 2 faces ont été photographiées sous une lampe à UV. Lors de la visualisation sous lampe à UV la thioflavine apparaît fluorescente (Figure 12). Ainsi, les zones correctement perfusées recevant le la thioflavine apparaissent fluorescentes, alors que les zones d'obstruction micro-vasculaire qui ne sont pas perfusées ne reçoivent pas la thioflavine et apparaissent donc noires. Les sections ont ensuite été incubées pendant 15 min dans du chlorure de triphényltétrazolium (TTC) à 5% dans l'obscurité pour marquer la zone infarcie. Celle –ci apparaît blanche alors que les tissus sains apparaissent rouge brique (Figure 12). Les 2 faces de chaque tranche ont été photographiées en lumière blanche. Enfin, chaque section a été pesée puis les cœurs ont été conservés dans du formol à 10%.

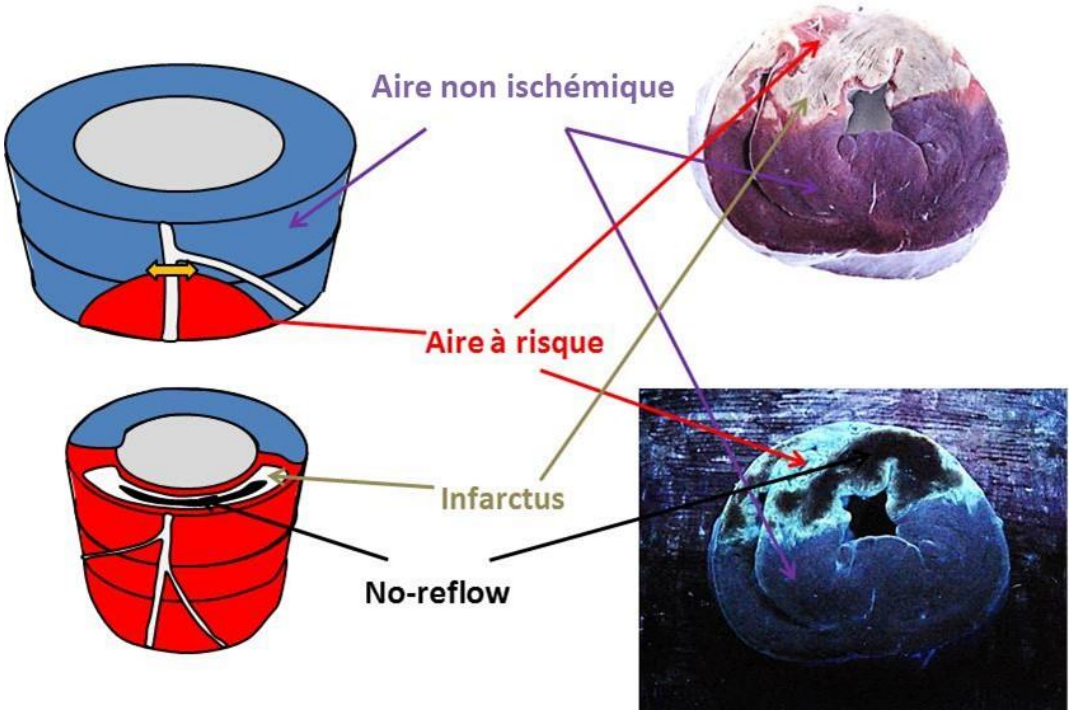


Figure 11 : représentation schématique et photo représentative des aires à risque et non ischémique, de la zone infarcie et de la zone d'obstruction micro-vasculaire dite de « no-reflow ».

2.2. Modèle d'infarctus constitué

Un modèle d'infarctus constitué a été réalisé afin d'évaluer l'action des dérivés cellulaires sur le remodelage inverse et l'évolution de la zone cicatricielle.

Dans cette configuration, l'IVA a été occluse en aval de la première diagonale par un ballon d'angioplastie pendant deux heures et trente minutes selon la même procédure que précédemment décrite à la différence près que l'artère a été occluse pendant 2h30. Puis l'artère a été réouverte et les animaux réveillés.

Quatre semaines plus tard, une IRM a été réalisée afin d'évaluer les caractéristiques de fonction ventriculaire gauche et de la fibrose cicatricielle. Puis les animaux ont été anesthésiés à nouveaux et le traitement a été administré.

Quatre semaines plus tard, une nouvelle IRM a été réalisée, puis les animaux ont été euthanasiés. Les cœurs ont été prélevés et analysés comme décrit ci-dessus pour

l'identification et la quantification de la zone infarcie. Les cœurs ont ensuite été conservés dans du formol à 10% pour analyse histologique ultérieure.

2.3. Méthodes d'administration des cardiosphères et exosomes

2.3.1. Voie intra-coronaire

Les injections intra-coronaires ont été réalisées sans interruption de flux contrairement à ce qui avait été réalisé précédemment dans le laboratoire d'accueil. En effet nous avions démontré que l'interruption du flux n'était pas nécessaire à l'efficacité de la thérapie cellulaire ni à la rétention des cellules. Un microcathéter (Finecross, Terumo) a été avancé sous contrôle angiographique jusqu'en aval de la première diagonale puis le traitement a été administré par une perfusion continue lente (1mL/min). Les injections de dérivés cellulaires ont été précédées et suivies de purges de la ligne d'administration par du sérum physiologique hépariné. Le flux artériel a ensuite été contrôlé par l'injection de produit de contraste iodé.

2.3.2. Injection intra-myocardique par voie épicardique

L'administration d'exosomes par injections intra-myocardiques (modèle à thorax ouvert) a été évaluée. Dans le modèle d'infarctus aigu, ces injections ont été réalisées par voie chirurgicale. Cette approche voie chirurgicale a été choisie par la nécessité d'un traitement rapide (30 minutes après après la reperfusion), ce délai ne laissant pas suffisamment de temps pour la réalisation d'une cartographie et d'injections à l'aide du système NOGA.

Pour ce modèle, une sternotomie médiane a été réalisée à la reperfusion. La zone infarcie a été repérée visuellement par sa pâleur et son induration, et 12 à 15 injections ont été réalisées par une aiguille de 25 gauges (Figure 12). Le thorax a ensuite été refermé et l'animal réveillé.

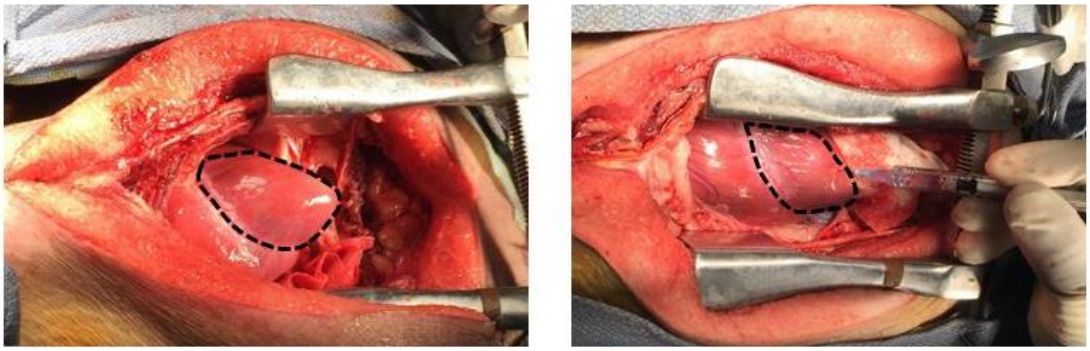


Figure 12 : Visualisation de la zone infarcie (délimitée par les pointillés) et injection intra-myocardique par voie chirurgicale après sternotomie médiane

2.3.3. Injection intra-myocardique trans-endocardique

Les injections intra-myocardiques ont été réalisées à l'aide du cathéter Myostar après avoir réalisé une cartographie électro-anatomique du ventricule gauche par le système de navigation intra-cardiaque NOGA (Biosense Webster, Inc., Diamond Bar, CA). Soixante-quinze à 100 points ont été enregistrés dans le ventricule gauche afin d'obtenir une cartographie exhaustive et d'identifier la zone infarcie. Après l'obtention de cette cartographie, 10 à 15 injections ont été réalisées dans la zone péri-infarctus. Etant donné qu'une étude réalisée dans le laboratoire a montré que les seuils utilisés chez l'Homme aboutissaient à des injections trop éloignées de la zone infarcie, des seuils plus bas ont été utilisés pour définir la zone péri-infarctus ou bordante[172]. Cette zone a été définie par un voltage unipolaire compris entre 4 et 7 mV. Pour vérifier que ces seuils étaient adaptés, un animal a été injecté dans ces zones avec du violet de gentiane 4 semaines après la réalisation de l'infarctus et la localisation du colorant a été comparé à la localisation de l'infarctus.

3. Plan expérimental

3.1. Evaluation des cardiosphères

3.1.1. Evaluation de la dose maximale injectable

Après avoir optimisé les conditions de culture des cardiosphères, nous avons déterminé la dose maximale injectable de cardiosphères. Pour ce faire, des doses croissantes de cardiosphères ont été injectées chez des porcs sains selon les conditions d'injection intra-coronaire décrites précédemment. Toutes les doses ont été exprimées en nombre de cellules uniques utilisées pour la production des cardiosphères. Les animaux ont reçu $12,5x10^6$, $25x10^6$ et $50X10^6$ équivalents de cellules uniques soient respectivement environ $3,25\times10^5$, $6,5\times10^5$, and $1,3\times10^6$ particules multicellulaires. La sécurité de l'injection a été évaluée par la survenue d'évènement indésirables pendant l'injection (arythmie, hypotension, dissection coronaire…), le score TIMI après injection, la fraction d'éjection du ventricule gauche mesurée par ventriculographie avant et après injection et l'élévation de la troponine I 24 heures après injection.

3.1.2. Etude d'efficacité pré-clinique randomisée en double aveugle

Le modèle d'infarctus constitué a été utilisé pour l'étude d'efficacité. Trois semaines après l'infarctus, les animaux ont été randomisés pour recevoir une injection de cardiosphères par voie intra-coronaire ($50X10^6$ équivalents de cellules uniques, $1,3\times10^6$ particules multicellulaires) ou le placebo (PBS). La pression télédiastolique du ventricule gauche a été mesurée après l'injection et au sacrifice. Les animaux ont été euthanasiés 1 mois après l'injection. Toutes les analyses ont été faites en aveugle du traitement.

3.2. Evaluation des effets de l'administration des exosomes

3.2.1. Infarctus en phase aigu

Un infarctus du myocarde a été créé chez 22 porcs comme précédemment décrit. Trente minutes après le début de la reperfusion, les animaux ont été randomisés pour recevoir des exosomes par voie intra-coronaire (15mg injecté pendant 30 minutes, n=6), une injection intra-myocardique d'exosomes (15 mg divisés en 10 injections, n=4, ou 7,5mg, n=5 soit un total de n=9) ou une injection intra-coronaire de placébo (IMDM, n=7). En cours de protocole, la dose de 15 mg par voie intra-myocardique a été remplacée par 7,5 mg du fait d'une efficacité similaire (Figure 13). Un animal du groupe contrôle et un animal du groupe intra-coronaire sont décédés précocement et par conséquent 6/7 et 5/6 animaux ont été analysés au final. Les doses d'exosomes ont été déterminées à partir d'études antérieures réalisées sur des rongeurs.

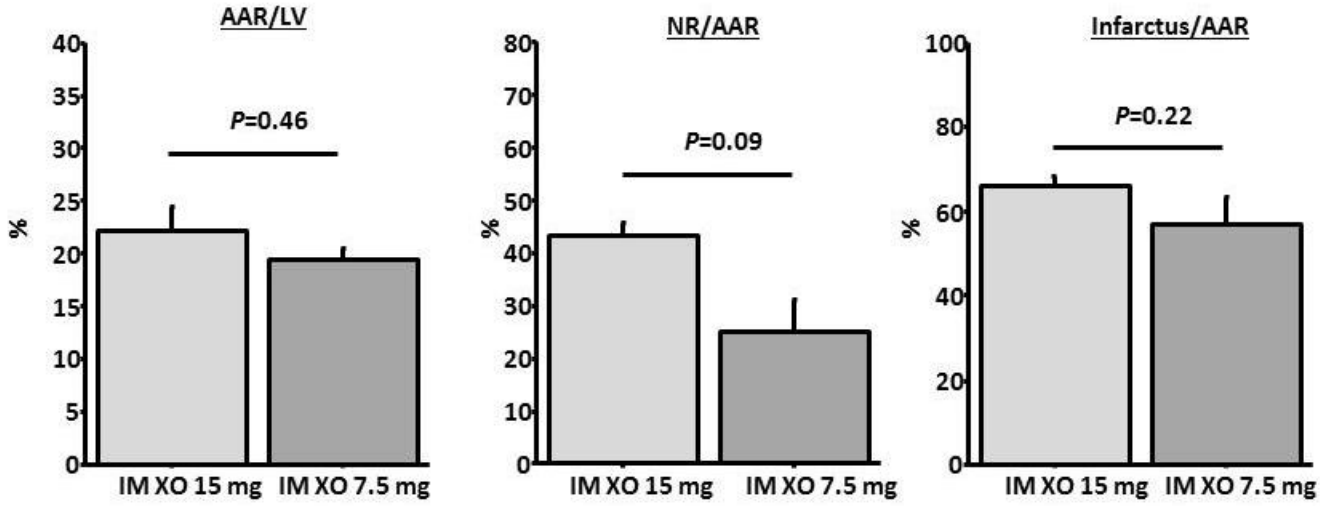


Figure 13 : Efficacité identique des doses de 15mg et 7.5mg d'exosomes administrées par voie intra-myocardique. Pour une même aire à risque (panneau de gauche), l'étendu du no-reflow (panneau du milieu) et la taille de l'infarctus (panneau de droite) sont identiques. (AAR : aire à risque ; VG : ventricule gauche, NR : no-reflow ; IM : intra-myocardique ; XO : exosomes).

3.2.2. Evaluation de la rétention intra-cardiaque des exosomes

Pour étudier l'extravasation et la rétention des exosomes avec les 2 méthodes d'administration, 2 animaux ont fait l'objet d'une occlusion coronaire de 90 minutes suivie de 30 minutes de reperfusion. Puis des doses identiques d'exosomes (7,5 mg de protéines) marqués avec un fluorochrome infra-rouge (Xenolight, PerkinElmer, Waltham, MA) ont été injectées par voie intra-coronaire chez un animal et par voie intra-myocardique chez un autre. Les animaux ont été euthanasiés 2h30 plus tard. Les cœurs ont été prélevés puis placés dans un système de bioluminescence (Xenogen IVIS spectrum, Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA) pour détecter l'éventuelle présence d'exosomes marqués. Pour minimiser le risque de biais, les deux doses d'exosomes ont été issues de la même dose de 15mg séparée en 2 et les images des deux cœurs ont été réalisées en même temps pour avoir des paramètres d'intensité d'excitation et d'échelle identiques.

3.2.3. Etude d'efficacité pré-clinique randomisée dans un modèle d'infarctus constitué

Un infarctus a été créé chez 13 porcs par l'occlusion de IVA après la 1^{e} diagonale pendant 2h30 comme décrit précédemment. Quatre semaines après, 12 animaux ont été randomisés entre un traitement par exosomes (7,5mg de protéines, n=6) ou le placebo (IMDM, n=6), administrés par voie intra-myocardique par le système NOGA. Les animaux ont été suivis pendant 1 mois supplémentaire puis ont été euthanasiés. Pour confirmer l'inefficacité de l'injection intra-coronaire d'exosomes, 4 animaux supplémentaires ont été traités par une injection intra-coronaire d'exosomes (7,5mg de protéines). Les animaux ont également été suivis 1 mois supplémentaire puis euthanasiés.

4. Imagerie par résonnance magnétique (IRM)

Toutes les IRM ont été acquises sur une IRM 3 Tesla (Siemens MAGNETOM Verio, Erlangen, Germany). La masse de la cicatrice myocardique et sa taille (masse de la cicatrice / masse ventriculaire gauche), la masse viable (masse ventriculaire gauche – masse de la cicatrice), les volumes ventriculaires gauches, la fraction d'éjection ainsi que la cinétique et la perfusion segmentaire ont été analysées à l'aide du logiciel de traitement Cvi42 (Circle Cardiovascular Imaging Inc., Calgary, Canada). Toutes les analyses ont été réalisées en aveugle du traitement. Tous les volumes ont été indexés à la surface corporelle (SC) calculée selon la formule $SC=0.121 \times poids^{0.575}$.

Des tranches de 6 mm ont été acquises en petit axe de la valve mitrale à l'apex. Les volumes et fonctions segmentaires et globales du ventricule gauche ont été analysés sur des acquisitions réalisées dans des conditions hémodynamiques stables, en apnée et synchronisées à l'ECG. Le volume d'éjection systolique a été calculé à partir des volumes ventriculaires et utilisé pour calculer le débit cardiaque selon la formule Qc=débit cardiaque x fréquence cardiaque. La cinétique segmentaire a été analysée par la mesure de l'épaississement télé-systolique et les résultats ont été donnés selon la segmentation à 17 segments de l'AHA. La zone infarcie a été définie par la zone vascularisée par l'IVA en aval de la 1^{e} diagonale soient les segments antéro-apical, septo-apical, antéro-septal moyen et antérieur moyen. La déformation circonférentielle globale a été calculée à l'aide d'un système de détection automatique de contour.

La masse et la taille de la cicatrice d'infarctus ont été mesurées sur les séquences de rehaussement tardif acquises 8 min après une injection de gadolinium. La zone infarcie a été définie par la technique de largeur à mi-hauteur, c'est-à-dire en incluant tous les pixels ayant une intensité supérieure à 50% de l'intensité maximale.

La perfusion myocardique a été mesurée sur les séquences de premier passage réalisées juste après l'injection de gadolinium. Trois coupes petit axe médio-ventriculaires ont été acquises tous les 2 à 4 battements. La pente d'augmentation de l'intensité dans tissu (correspondant à l'arrivée du gadolinium dans le tissu) a été mesurée puis indexée à l'intensité du signal de la cavité ventriculaire. Chaque coupe petit axe a été divisée en 6

segments et les segments infarcis ont été identifiées par comparaison à la coupe correspondante en rehaussement tardif.

5. Mesure de réserve coronaire

La réserve coronaire a été mesurée par la mesure du débit sanguin coronaire à l'état de base puis en hyperhémie maximale. Ces mesures ont été réalisées avant l'injection et avant l'euthanasie. Un guide intra-coronaire de doppler Flowwire® (Volcano Corporation, San Diego, CA, USA). Après injection de 0,2mg de trinitrine, le guide a été avancé dans l'IVA moyenne après la première diagonale. Le pic de vitesse a été mesuré à l'état de base puis en hyperhémie provoquée par l'injection intra-coronaire de 60µg d'adénosine. La réserve de flux coronaire a été calculée par le ratio de la vélocité maximale en hyperhémie par la vélocité à l'état de base (moyenne de 3 battements consécutifs). Deux mesures successives ont au minimum été réalisées pour chaque animal.

6. Histologie

Des fragments des zones infarcies (2 lames par cœur), non infarcie (2 lames par cœur) et bordante (4 lames par cœur) ont été sectionnés puis inclus en paraffine. Les blocs obtenus ont été coupés en sections de 4µm d'épaisseur. La zone bordante a été définie comme la zone située à la limite entre la zone infarcie et la zone saine et contenant donc à la fois des zones viables et cicatricielles. La fibrose a été quantifiée initialement par une coloration trichrome de Masson puis la technique a été changée pour du rouge Sirius en raison d'un meilleur contraste. La réaction immunitaire a été quantifiée sur des lames colorées par coloration d'hématoxyline-éosine. L'infiltration cellulaire a été quantifiée selon la classification de l'International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). Pour quantifier la densité vasculaire, des lames ont été marquées avec l'Isolectine B4 (Invitrogen I21411) et l'actine musculaire lisse α. Les artérioles ont été identifiées comme les vaisseaux positifs pour l'Isolectine B4 et l'actine musculaire lisse α alors que les capillaires ont été

identifiés comme les vaisseaux positifs uniquement pour l'Isolectine B4. Pour la surface transverse des cardiomyocytes, les lames ont été immunomarquées par l'agglutinine de germe de blé (Invitrogen) et l'actinine sarcomérique α (ab9465 Abcam). La surface transverse n'était mesurée que si les 3 critères suivants étaient présents : section complète, noyau visible au centre du cardiomyocyte et parois cellulaires intactes. L'apoptose, l'infiltration leucocytaire et la prolifération cellulaire ont été identifiées respectivement par les marquages TUNEL, CD45 et Ki67 respectivement, associés dans chaque cas aux marquages par l'agglutinine de germe de blé (Invitrogen) et l'actinine sarcomerique α (ab9465 Abcam). Des anticorps secondaires fluorescents conjugués ont été utilisés dans tous les cas (Molecular Probes) et toutes les lames ont été marquées au DAPI (Molecula probes). Toutes les lames ont été examinées au moyen d'un microscope confocal et analysées par Image J.

7. Quantification de la réponse immunitaire

Pour évaluer l'intensité de la réponse immunitaire après l'injection de matériel allo- voire xénogénique, des prélèvements de serum ont été réalisés chez tous les animaux au moment du sacrifice. Des anticorps circulant IgG anti-donneur ont été recherchés par cytométrie de flux. Le témoin positif a été un porc injecté en sous cutané avec 190 millions de cellules mononuclées circulantes.

8. Analyses statistiques

Les variables continues sont présentées dans les formats moyenne ± déviation standard dans le texte et moyenne ± erreur standard dans les figures. Pour les variables nominales, les valeurs absolues et les pourcentages sont indiqués. Les groupes indépendants ont été comparés par les tests non paramétriques de Mann-Whitney pour les comparaisons de 2 groupes et de Kruskal-Wallis pour les comparaisons de plus de 2 groupes. Les analyses pairées ont été réalisées par le test non paramétrique de rang de Wilcoxon. Les variables

nominales ont été comparées par le test du Chi^2. Toutes les valeurs de P sont bilatérales et une valeur de P inférieure à 0,05 a été considérée comme significative.

Basée sur les études précédentes, nous avons assumé que la différence de diminution de la masse de la cicatrice serait de 1,2 grammes (déviation standard à 0,65 grammes) et que la différence de diminution de fraction d'éjection du ventricule gauche serait de 4% (déviation standard à 2%) dans les études d'infarctus remodelant. Pour mettre en évidence ces différences avec une puissance de 90% et un risque alpha de 5%, 6 animaux devaient être inclus dans chaque groupe.

CHAPITRE 5 : EVALUATION DES CARDIOSPHERES DANS UN MODELE D'INFARCTUS CONSTITUE

Ce travail a fait l'objet de la publication suivante :

Gallet R, Tseliou E, Dawkins J, Middleton R, Valle J, Angert D, Kreke M, Smith R, Marban L, Marban E. Intracoronary delivery of self-assembling heart-derived microtissues ("cardiospheres") for prevention of adverse remodeling in a pig model of convalescent myocardial infarction. **Circ Cardiovasc Interv**. 2015 May;8(5)

1. Contexte

Des données préliminaires suggèrent que les cardiosphères pourraient être plus efficaces que les CDCs. Néanmoins, le développement et l'utilisation des cardiosphères ont jusqu'à présent été freinés par la nécessité (théorique) d'une administration par voie intra-myocardique, leur diamètre important rendant l'administration intra-coronaire potentiellement dangereuse alors que l'administration trans-endocardique pourrait exposer au risque d'accident vasculaire cérébral en cas d'embolisation de ces cardiosphères.

2. Objectifs

Nous avons émis l'hypothèse que d'une part une optimisation et une standardisation des conditions de culture des cardiosphères pourraient permettre d'homogénéiser et de limiter leur taille, et d'autre part que l'optimisation des conditions d'injection des cardiosphères ainsi générées pourrait autoriser une délivrance par voie intra-coronaire sans risque, et ainsi d'évaluer le bénéfice de ces cardiosphères dans un modèle d'infarctus constitué. Outre l'évaluation pré-clinique des cardiosphères, cette étude devrait permettre d'étudier la taille maximale et le nombre maximal de particules pouvant être injectées dans la circulation coronaire sans risque.

3. Plan expérimental

Le plan expérimental est présent sur la Figure 14. Une première étude a d'abord été réalisée afin de déterminer la dose maximale injectable de cardiosphères. Dans un deuxième temps, une étude randomisée en double aveugle contre placebo a été réalisée afin d'évaluer l'efficacité des cardiosphères injectées. Vingt-six animaux ont été utilisés pour ces études ; 7 ont fait l'objet de l'étude complète de faisabilité et 14 de celle d'efficacité. Trois animaux sont morts, 2 après création de l'infarctus et 1 après injection de placebo. Deux animaux ont été exclus en raison de problèmes techniques durant la création de l'infarctus (1 dégonflement du ballon entraînant un infarctus de mauvaise qualité et une dissection de l'IVA).

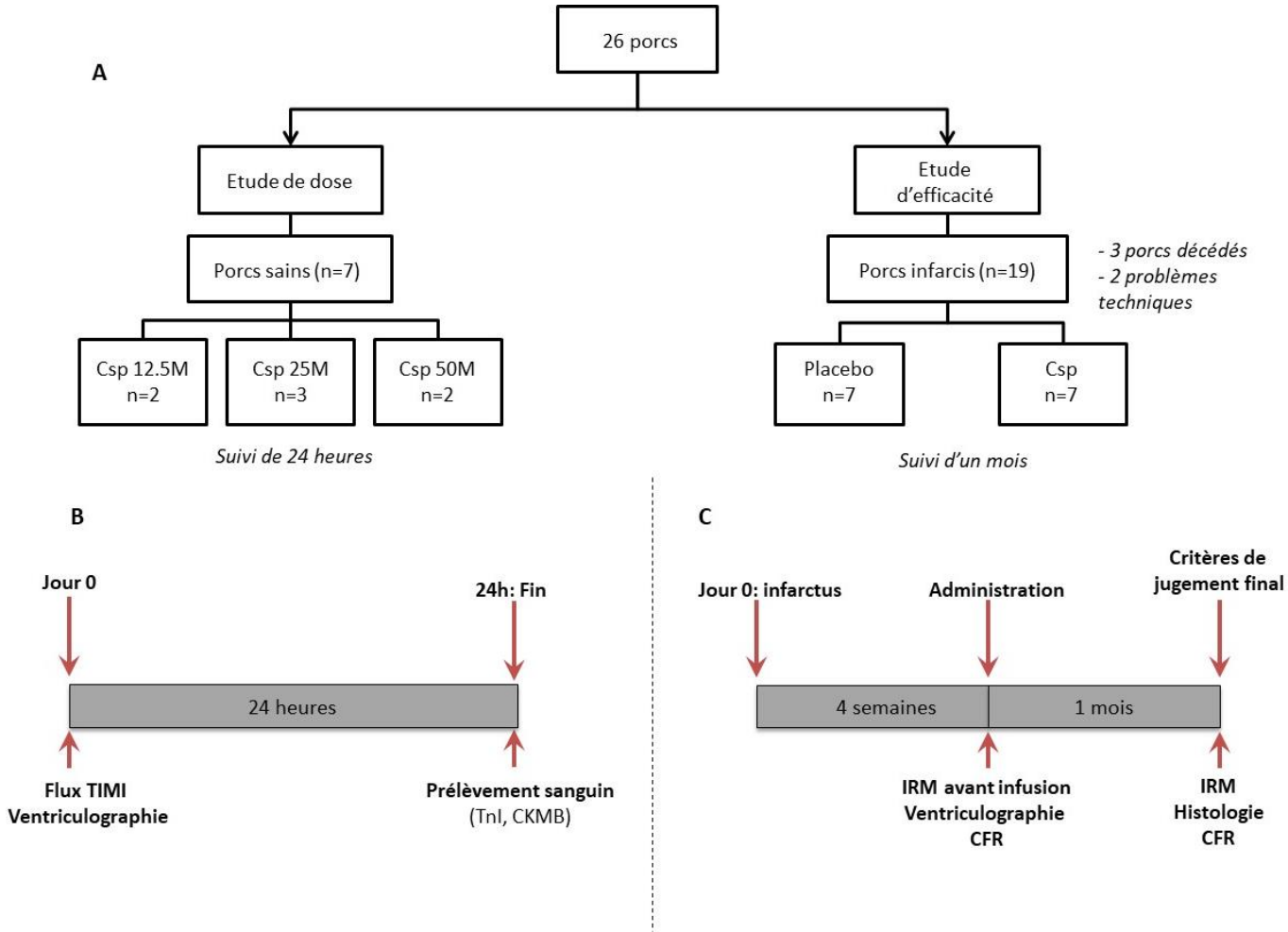


Figure 14 : Schéma des études de dose et d'efficacité ayant évalué les cardiosphères. (CFR : Coronary flow reserve ; Csp : Cardiosphères)

4. Résultats

4.1. Optimisation des conditions de culture des cardiosphères

La Figure 15A résume le protocole expérimental.

La Figure 15B illustre la distribution de la taille des cardiosphères avec différentes concentration de cellules et durées de culture. L'augmentation de la concentration cellulaire était associée à une plus grande proportion de cardiosphères dont la taille était supérieure à 50 µm (Figure 15C), alors que l'augmentation du temps de culture engendrait une plus grande proportion de très grosses cardiosphères (>150µm, Figure 15D). Nous avons donc estimé qu'une forte concentration de cellules dans le milieu de culture ($1,5\times10^6$ CDCs dans des boîtes de culture de 75 cm^2, soit 20×10^3 CDCs/cm2) et un temps de culture court (48 heures) étaient probablement les conditions optimales de culture pour l'injection intra-coronaire de cardiosphères. Des photos de ces cardiosphères de petite, moyenne et grande taille sont présentées en figure 15E. Le nombre et la taille des cardiosphères obtenus avec la mise en culture de $12,5x10^6$ CDCs dans ces conditions sont illustrés dans la Figure 16A.

Ces cardiosphères ont ensuite été injectées *in vitro* dans le cathéter d'administration afin d'estimer leur rétention/destruction lors du passage dans le cathéter (Figure 16B). Nous avons observé une diminution de 5±9% du nombre total de cardiosphères et de 10% environ pour les cardiosphères supérieures à 50µm (Figure 16C). Ainsi pour les études *in vivo*, nous avons décidé d'augmenter de 10% les doses injectées afin de compenser les pertes liées au cathéter. De façon favorable, nous avons observé que la perte liée au passage dans le cathéter augmentait de façon importante avec la taille des particules, atteignant environ 70% pour les plus grosses particules (>150µm), apportant par conséquent une sécurité supplémentaire contre l'obstruction micro-vasculaire.

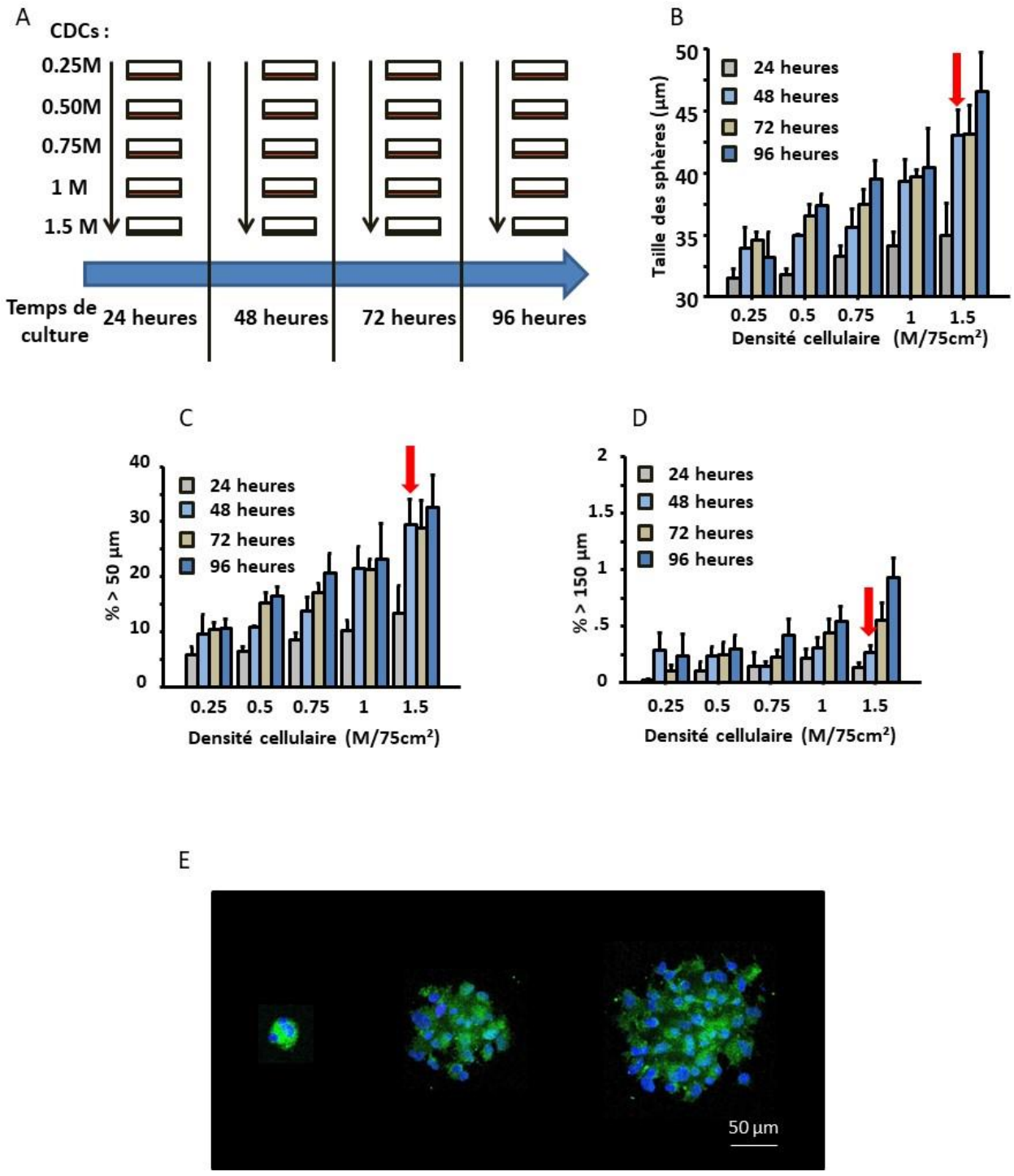


Figure 15 : (A) Représentation du protocole utilisé pour optimiser la taille de cardiosphère par optimisation des conditions de culture. (B) Taille des cardiosphères obtenues en fonction des conditions de cultures. L'augmentation de la densité de CDCs mises en culture augmente la proportion de cardiosphères > 50µm (C) alors que l'augmentation de la durée de culture augmente la proportion de cardiosphères > 150µm. Une densité de 1.5M/ boîte de 75cm² a été choisie (flèche rouge). (E) Représentation de petite, moyenne et très grosse cardiosphères. (CDC : cardiosphere derived cells)

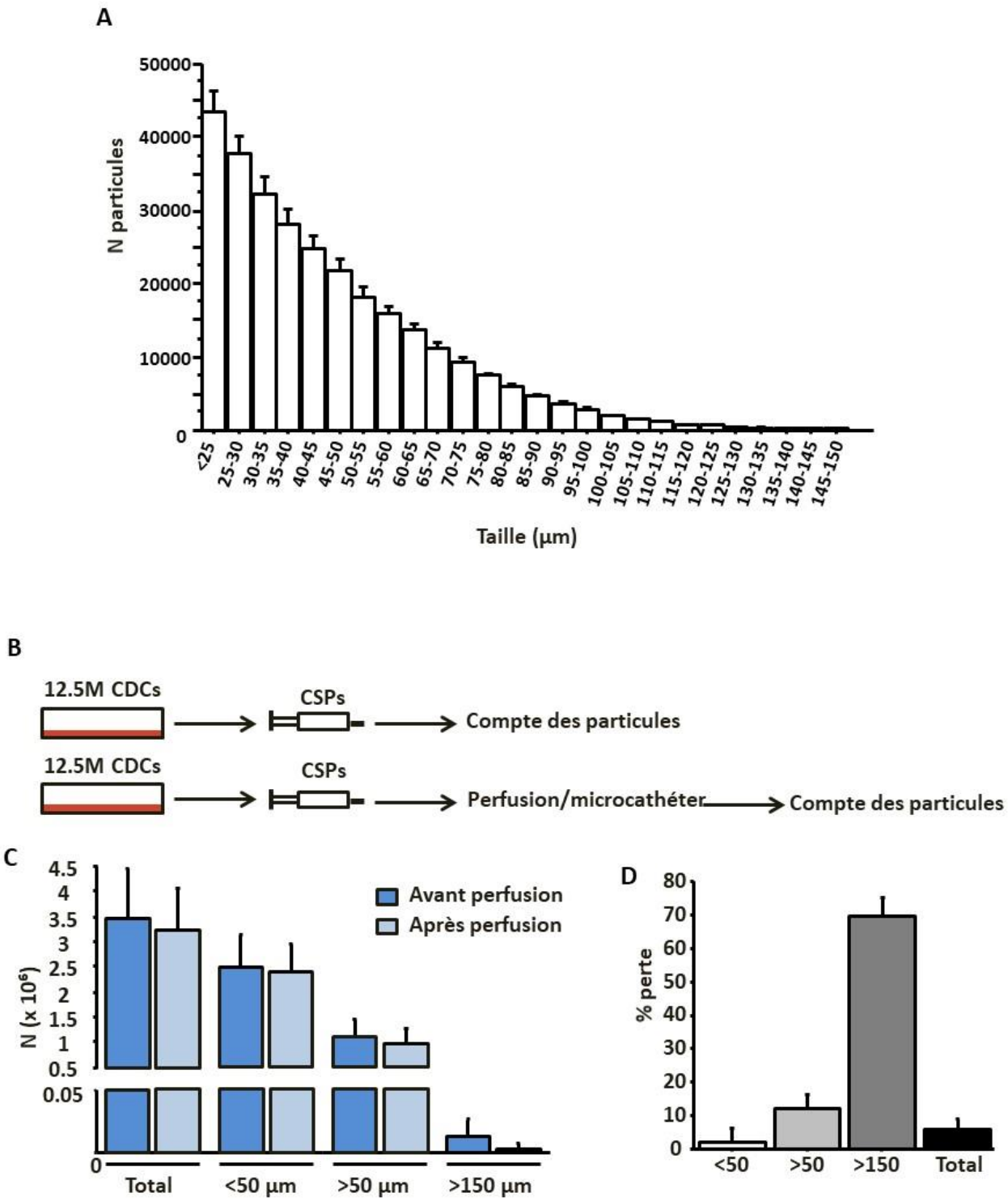


Figure 16 : (A) Distribution de la taille des cardiosphères obtenues à partir de 12,5x10^6 CDCs cultivées selon les conditions de cultures choisies précédemment. (B) Schéma du protocole utilisé pour évaluer la perte de cardiosphères lors de l'injection dans le microcathéter. (C) Nombre de cardiosphères comptées avant et après injection à travers le microcathéter et (D) proportion perdue en fonction de la taille des cardiosphères. Les cardiosphères de petite taille sont très peu modifiées par l'injection dans le cathéter alors que les cardiosphères de très grosse taille (>150µm) diminuent de façon importante. (CDC : cardiosphere derived cells)

4.2. Faisabilité et sécurité de l'injection de cardiosphères

Des doses croissantes de cardiosphères cultivées dans les conditions précédemment déterminées ont ensuite été injectées chez des porcs sains. Les porcs ont reçu $12,5x10^6$ (n=2), $25x10^6$ (n=3) et $50x10^6$ (n=2) équivalents de cellules uniques. Aucune arythmie n'a été observée. Après l'injection, le flux sanguin coronaire évalué par le score TIMI et la fraction d'éjection du ventricule gauche mesurée par ventriculographie n'étaient pas altérés (Figure 17A et B). L'élévation de troponine 24 heures après l'injection était similaire entre les 3 groupes (Figure 17C). Pour confirmer la sécurité, le cœur d'un des animaux injectés avec $50x10^6$ équivalents de cellules uniques a été prélevé à 24 heures et la présence d'un infarctus a été recherchée avec le TTC. Aucune zone de nécrose n'a été observée, ni dans la zone injectée, ni dans les zones non injectées (Figure 17D). Nous avons donc choisi la dose la plus importante ($50x10^6$ équivalents de cellules uniques) pour l'étude d'efficacité pré-clinique randomisée.

La sécurité a ensuite été confirmée chez les animaux ayant eu un infarctus. Après l'administration des cardiosphères ($50x10^6$ équivalents de cellules uniques), aucune altération de la fraction d'éjection n'a été observée comparativement au groupe contrôle (Figure 17F) ; de plus les valeurs de troponine I et de créatine phospho-kinase étaient identiques dans les 2 groupes (Figure 17 G,H). Aucune altération du flux coronaire TIMI n'a été observée chez les animaux contrôles, alors que dans le groupe cardiosphères, le flux est passé de TIMI3 à TIMI2 chez 1 animal sur 7 (Figure 17E). Cette altération du flux était néanmoins très probablement liée à un spasme coronaire, et ce pour 3 raisons : (1) le flux coronaire s'est normalisé immédiatement après l'injection intra-coronaire de dérivés nitrés avec en parallèle, une dilatation du vaisseau épicardique ; (2) il n'y a pas eu d'altération de la fonction ventriculaire gauche et (3) il n'y a pas eu d'élévation de la troponine I. Ces considérations permettent d'exclure une altération du flux coronaire en rapport avec une micro-embolisation diffuse. Aucun autre évènement indésirable n'est survenu après l'injection des cardiosphères, alors que dans le groupe placebo, un porc est décédé d'hypotension artérielle sévère suivie d'un arrêt cardiaque. L'analyse de l'IRM de cet animal a mis en évidence une cicatrice d'infarctus très étendue intéressant les 2 ventricules, et associée à une dysfonction bi-ventriculaire sévère. Par conséquent, seuls 14 animaux ont été analysés au final.

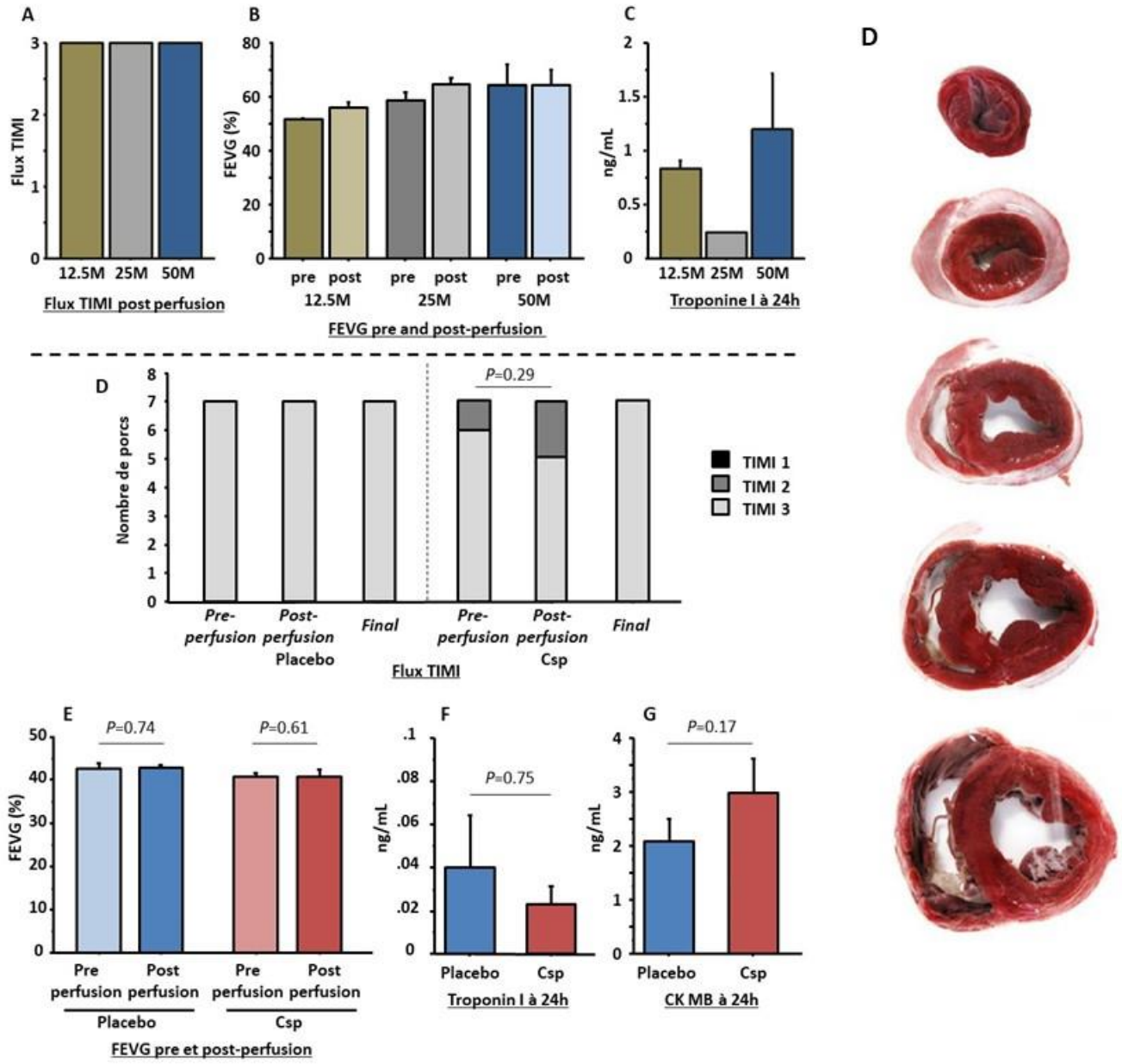


Figure 17 : Après injection de doses croissantes de cardiosphères (12,5x10^6, 25x10^6 et 50x10^6 équivalents de cellules uniques), il n'a pas été observé d'altération du flux TIMI (A) de la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG) (B) ni d'élévation significative de troponine (C). De plus l'analyse histologique du cœur d'un porc injecté avec 50x10^6 équivalents de cellules uniques n'a pas révélé de zone de nécrose myocardique (D). Chez les animaux infarcis, l'injection de 50x10^6 équivalents de cellules uniques a provoqué une altération du flux TIMI chez 1 animal (E), sans altération de la FEVG (F), ni élévation significative de la troponine I (G) ou des CPK (H). (FEVG : fraction d'éjection du ventricule gauche ; Csp : cardiosphères ; CK : creatine kinase).

4.3. Bénéfice de l'administration des cardiosphères

Après avoir démontré la sécurité de l'injection intra-coronaire de $50x10^6$ équivalents de cellules uniques, nous avons réalisé une étude pré-clinique, dans laquelle les animaux étaient randomisés en aveugle entre l'administration de cardiosphères ($50x10^6$ équivalents de cellules uniques, soient $1,3x10^6$ cardiosphères) ou du placebo. Le diamètre moyen des cardiosphères injectées était de 45±23 µm et 30,2±6,8%, 3,4±1,8%, et 0,24±0,17% étaient de taille supérieure à 50 µm, 100µm et 150µm respectivement. La viabilité des cardiosphères injectées était de 92,1±3,9%.

4.3.1. Préservation de la fonction ventriculaire gauche et diminution de la taille de l'infarctus

La figure 18A illustre des exemples d'images IRM en télé-diastole et télé-systole chez un animal du groupe placebo et un animal du groupe cardiosphères. Comme le montrent le tableau 3 et la figure 18A, l'importance de la lésion d'infarctus et la fraction d'éjection du ventricule gauche à l'état de base (4 semaines post-infarctus, avant traitement) était identique dans le 2 groupes. En revanche, un mois après traitement, la fraction d'éjection était préservée chez les animaux traités par cardiosphères (P=0,35 en analyse appariée intra-groupe), alors qu'elle diminuait significativement chez les animaux contrôles (P=0,02 en analyse appariée intra-groupe, et P=0,004 entre les groupes). En parallèle, les volumes indexés télé-diastoliques et télé-diastoliques augmentaient significativement durant le suivi chez les animaux contrôles mais pas chez les animaux traités (Figure 18C). De façon cohérente avec la préservation de la fraction d'éjection, les animaux traités avaient une fonction segmentaire (mesurée par l'épaississement télé-systolique) de la zone infarcie mais également de la zone non infarcie, supérieure à celle des animaux contrôles (Figure 18D et E).

	Placebo	**Csp**	***P***
VTDVG (mL)	75±9	79±11	0,28
VTSVG (mL)	44±6	47±4	0,28
FEVG (%)	41,4±2,3	40,2±2,6	0,28
Masse nécrosée (g)	11,0±2,6	11,5±2,6	0,75
Etendue nécrosée (%)	17,8±2,3	18,1±2,5	0,41
Masse viable (g)	54,4±7,1	51,9±9,3	0,65

Tableau 3 : Caractéristiques IRM des porcs avant traitement (3-4 semaines après infarctus). (Csp : cardiosphères. VTDVG : volume télé-diastolique du ventricule gauche ; VTSVG : volume télé-systolique du ventricule gauche ; FEVG : fraction d'éjection du ventricule gauche).

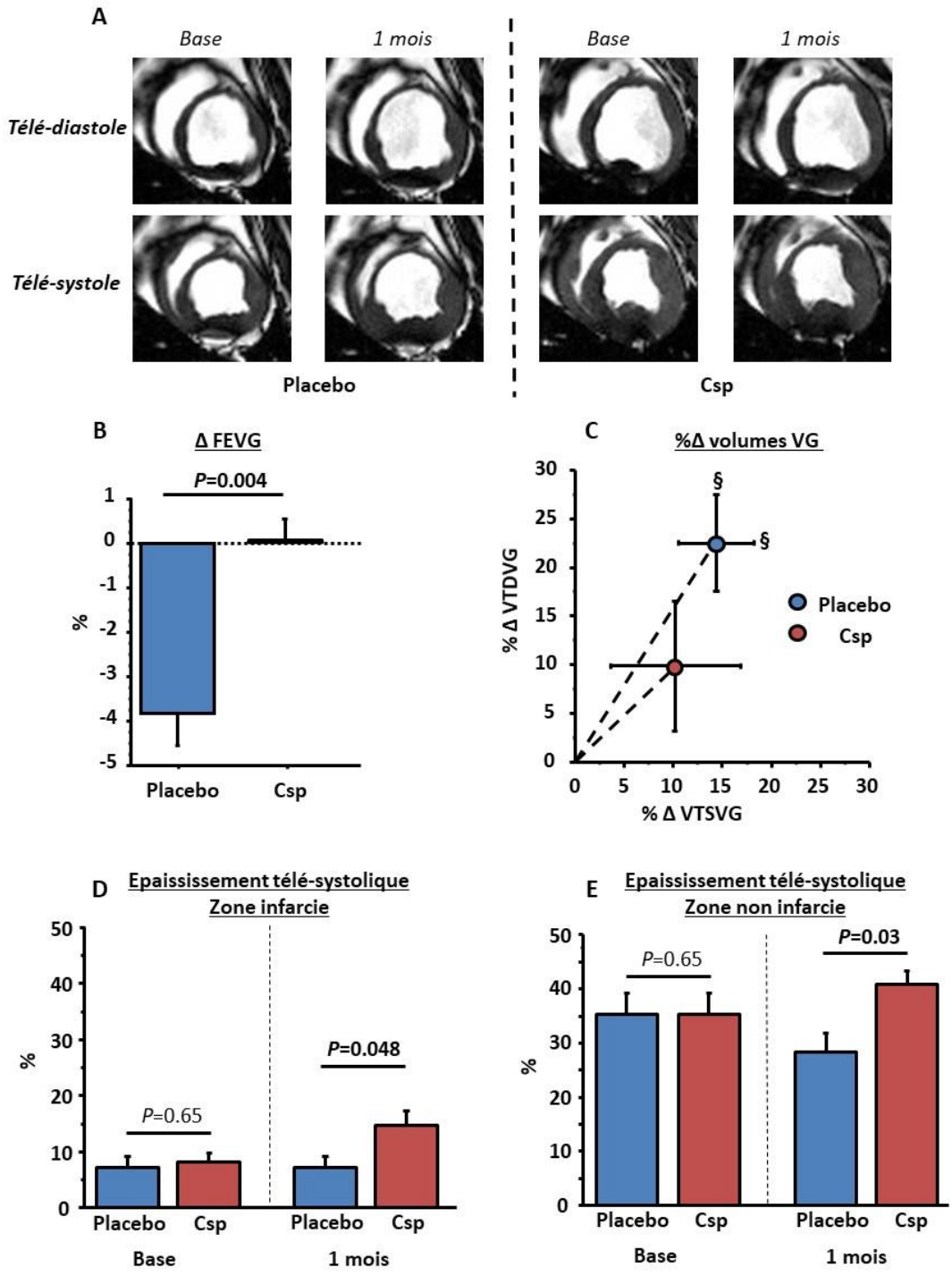


Figure 18 : (A) Images représentatives du ventricule gauche en télé-diastole et télé-systole avant et après traitement chez un porc du groupe placebo et un porc du groupe Cardiosphères. La fraction d'éjection diminue dans le groupe contrôle mais reste inchangée dans le groupe cardiosphères (B) alors que les volumes sont supérieurs dans le groupe placebo (C). La fonction contractile segmentaire des zones infarcie (D) et non infarcie (E) s'améliore chez les animaux traités mais pas chez les contrôles. (Csp : cardiosphères ; VTDVG : volume télé-diastolique du ventricule gauche ; VTSVG : volume télé-systolique du ventricule gauche ; FEVG : fraction d'éjection du ventricule gauche).

L'analyse des séquences de rehaussement tardif (Figure 19A) a montré que la masse de la zone infarcie diminuait significativement chez les animaux traités par cardiosphères (P=0,02 en analyse appariée intra-groupe) mais pas chez les animaux traités par placebo (P=0,18 en analyse appariée intra-groupe, et P=0.002 entre les groupes), et ce, malgré des masse d'infarctus similaires avant traitement (Figure 19B). De manière cohérente, la diminution de la taille de l'infarctus (masse de l'infarctus/masse VG) était significativement plus importante dans le groupe traité que dans le groupe contrôle (Figure 19C). En plus de la diminution de la zone infarcie, nous avons observé une tendance assez forte en faveur d'une augmentation de la masse viable chez les animaux traités par cardiosphères bien que non significative (Figure 19D). Il avait été précédemment démontré que l'augmentation de la masse viable est généralement décalée par rapport à la diminution de masse infarcie et est généralement mise en évidence lors de suivis plus longs, raison pouvant expliquer la non significativité de l'augmentation de masse viable à 1 mois de suivi.

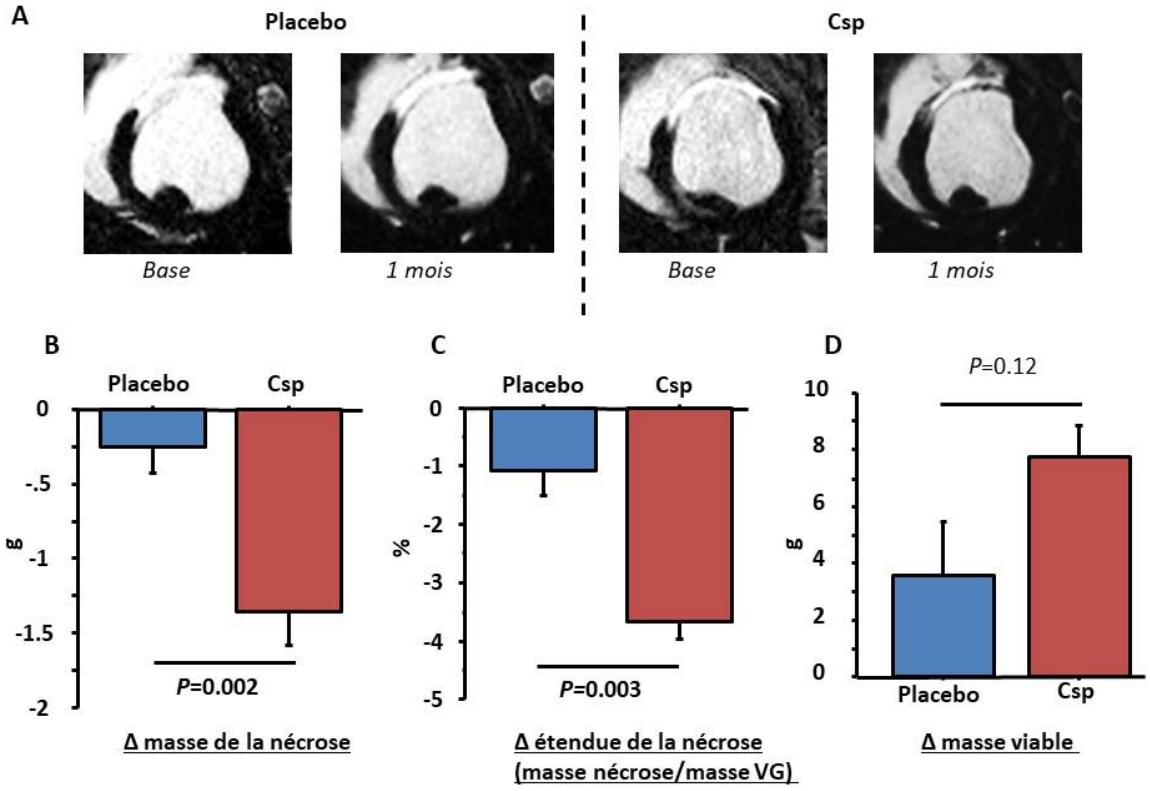


Figure 19 : Image représentative de séquence de rehaussement tardif montrant la cicatrice d'infarctus avant et après traitement chez un porc du groupe placebo et un porc du groupe cardiosphères. Variation de la masse nécrosée (B), de l'étendue de la nécrose (C) et de la masse viable (D). (Csp : cardiosphères)

4.3.2. Amélioration de la perfusion myocardique

La perfusion myocardique a été évaluée par la mesure de la réserve de flux coronaire dans l'IVA et par l'analyse des séquences IRM de premier passage pour quantifier la perfusion dans la zone infarcie. Les mesures ont été réalisées en pré-traitement (respectivement lors de l'angiographie pré-injection et à partir de l'IRM pré-traitement) et à 1 mois post-traitement. La valeur de la réserve coronaire était plus importante à 1 mois post-traitement chez les animaux du groupe cardiosphères que chez les animaux du groupe contrôle alors qu'elles étaient similaires avant traitement (Figure 20A). De la même façon, l'analyse des séquences IRM de premier passage a montré une augmentation significative de la perfusion myocardique à 1 mois chez les animaux traités mais pas chez les contrôles (P=0,02 en analyse appariée intra-groupe dans le groupe cardiosphère contre P=0,18 dans le groupe contrôle, et P=0,13 pour la comparaison entre groupes, Figure 20B).

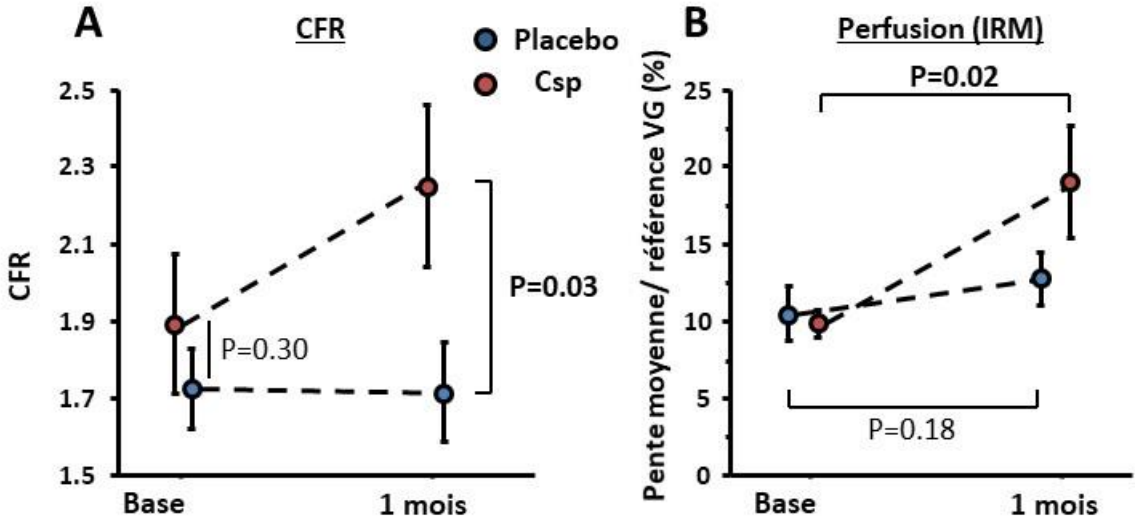


Figure 20 : (A) Variation de la réserve coronaire. La réserve coronaire est significativement plus élevée après traitement chez les animaux traités par cardiosphères que chez les animaux contrôles. (B) Variation de la perfusion myocardique mesurée en IRM (séquences de premier passage). La perfusion myocardique augmente significativement chez les animaux traités mais pas chez les contrôles. (CFR : Coronary flow reserve ; IRM : Imagerie par résonnance magnétique ; Csp : cardiosphères).

4.3.3. Modification histologique : fibrose, densité vasculaire et architecture myocardique

Les résultats fonctionnels décrits précédemment suggèrent une amélioration de la perfusion myocardique associée à l'administration de cardiosphères. Ces résultats ont été confirmés par les analyses histologiques. En effet, la densité artériolaire (vaisseaux positifs pour l'Isolectine et l'α-actine du muscle lisse) était deux fois plus importante dans les zones infarcies et bordantes chez les animaux traités par cardiosphères comparés aux contrôles (Figure 21A), mais similaire dans la zone non infarcie (Figure 21B). De la même façon, la densité capillaire était également plus importante dans la zone péri-infarctus, mais pas dans la zone non infarcie (Figure 21C).

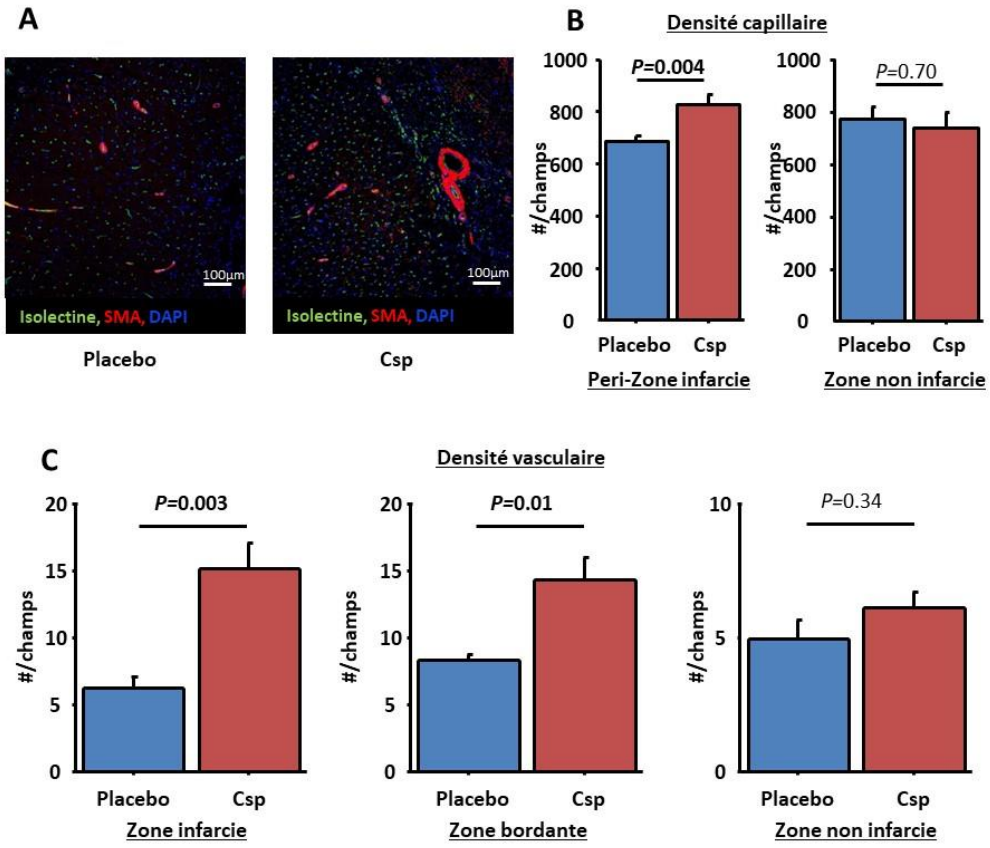


Figure 21 : (A) Images représentatives de la densité vasculaire évaluée par histologie chez un animal recevant des cardiosphères et un animal contrôle (zone bordante). (B) Densité vasculaire dans les zones infarcie, bordante et non infarcie. (C) Densité capillaire dans la zone peri-infarctus et la zone non-infarcie.

Pour confirmer histologiquement la diminution de la taille de la cicatrice d'infarctus observée en IRM, la transmuralité de la cicatrice a été mesurée avec une coloration trichrome de Masson. Puis, le contenu en collagène des zones infarcies, non infarcies et bordantes a été quantifiée en utilisant du rouge Sirius (en raison du meilleur contraste obtenu avec cette coloration pour la quantification de la fibrose des zones bordantes et non infarcie par rapport à la coloration trichrome de Masson, Figure22A1-A4). La transmuralité de la cicatrice était moins importante chez les porcs traités par rapport aux porcs contrôles (Figure 22B). En parallèle, la quantité de collagène présente était moindre chez les animaux traités par cardiosphères et ce, dans les zones infarcies et bordantes, mais également dans les zones non infarcies (Figure 22C-E). Ces différences de contenu en collagène n'étaient pas liées à une hypertrophie cardiomyocytaire compensatrice ; en effet, la surface transverse des cardiomyocytes était identique dans les 2 groupes (Figure 23).

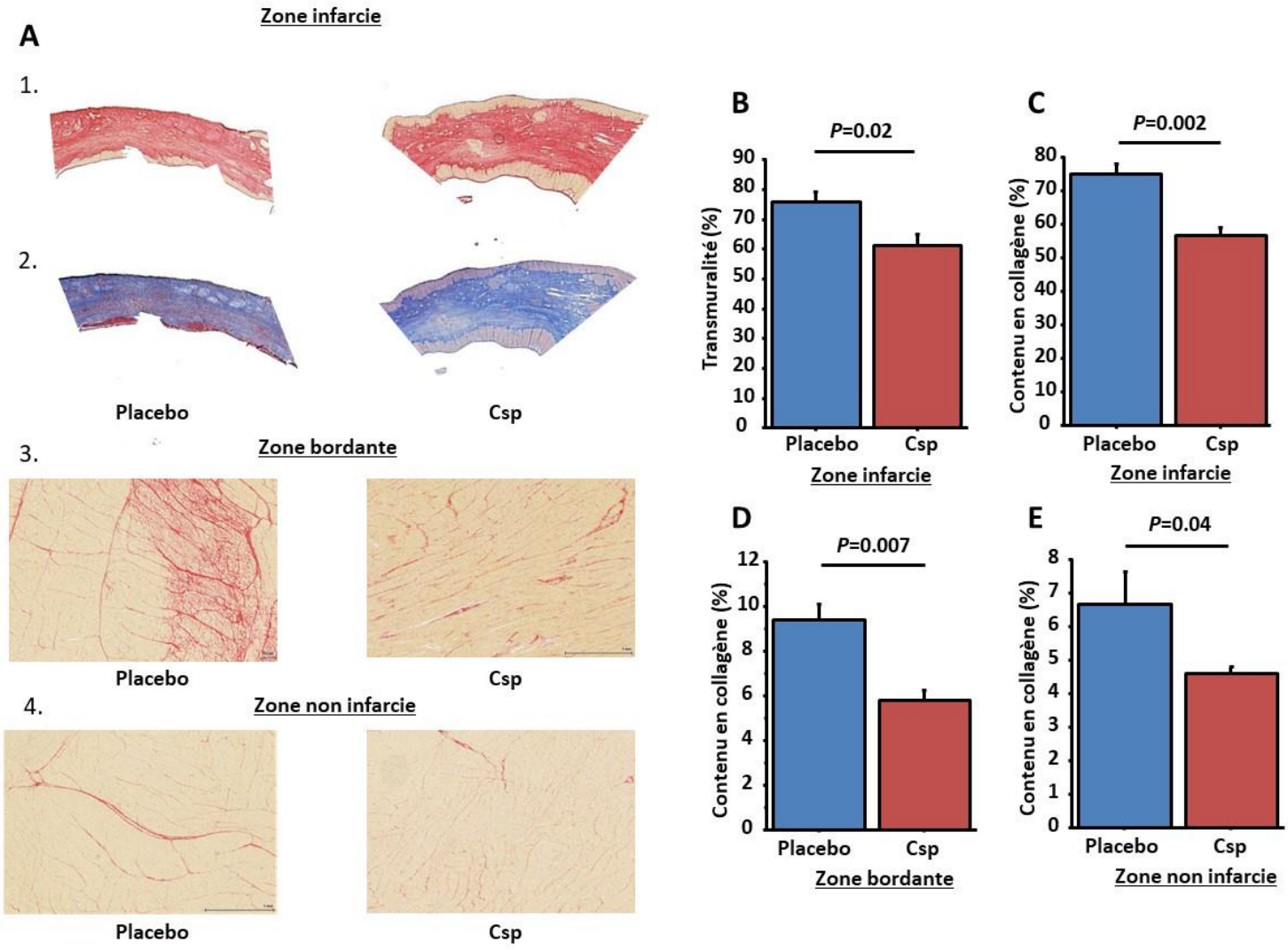


Figure 22 : (A) Coloration de la zone infarcie au rouge Sirius (1) et au trichrome de Masson (2), et de la zone bordante (3) et de la zone non infarcie (4) au rouge Sirius chez un animal contrôle et un animal traité pas cardiosphères. (B) Transmuralité de l'infarctus et contenu en collagène des zones infarcie (C), bordante (D) et non infarcie (E). (Csp : cardiosphères)

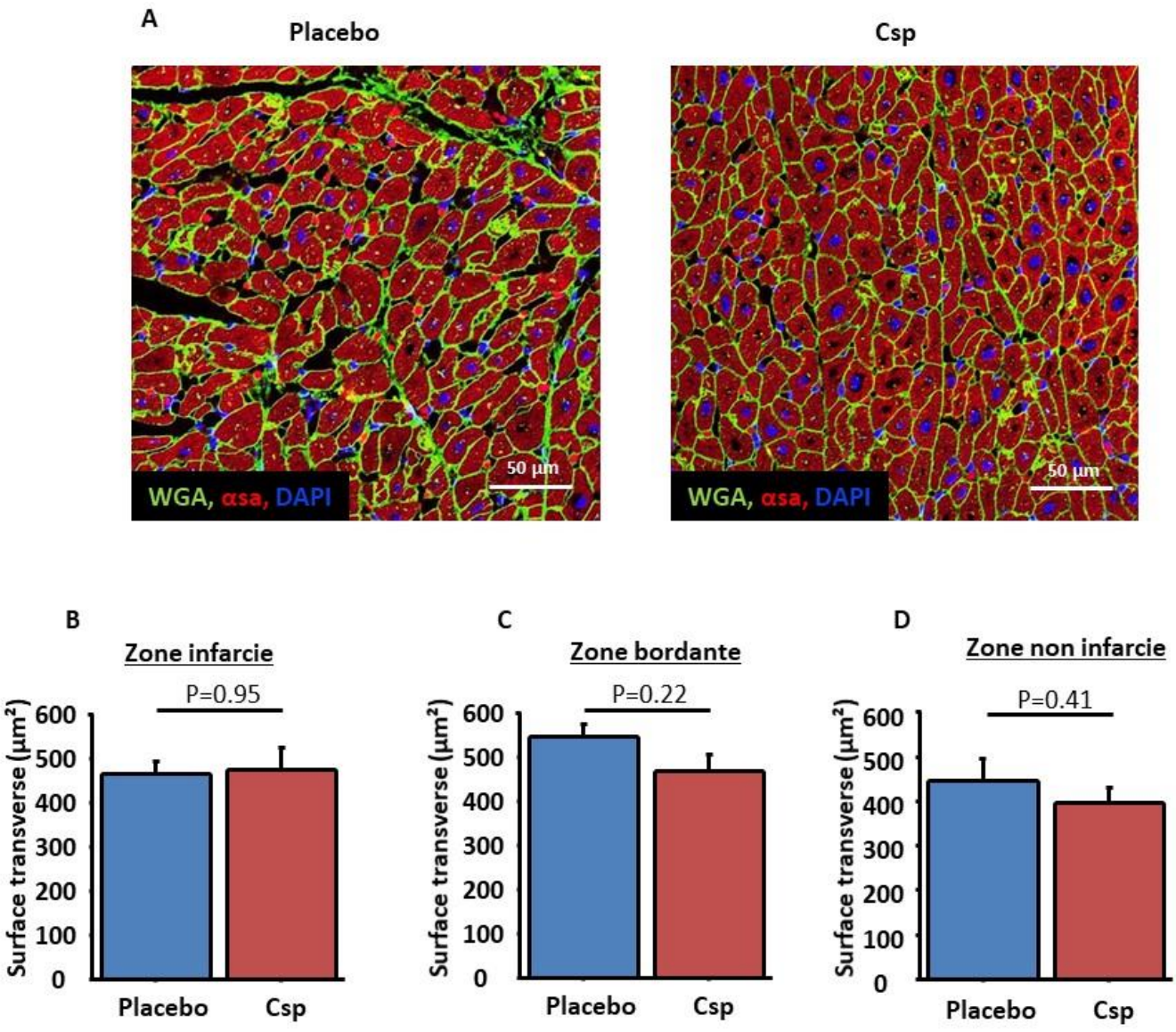


Figure 23 : Images représentatives servant à mesurer la surface transverse des cardiomyocytes (A). Surface transverse des cardiomyocytes dans les zones infarcie (B), bordante (C) et non-infarcie (D).

4.3.4. Amélioration hémodynamique

Nous avons voulu déterminer si les améliorations fonctionnelles et architecturales observées étaient associées à une amélioration hémodynamique. Pour ce faire, nous avons mesuré la pression télédiastolique du ventricule gauche (PTDVG) et calculé le débit cardiaque. Avant traitement, la PTDVG et le débit cardiaque étaient similaires chez les deux groupes d'animaux. A un mois post-traitement, la PTDVG diminuait significativement chez les animaux traités par cardiosphères mais pas chez les animaux traités par placebo, alors que, le débit cardiaque augmentait uniquement chez les animaux du groupe cardiosphères (Figure 24). Nous n'avons observé aucune différence en termes de pression artérielle systolique, diastolique ou de fréquence cardiaque qui pourrait avoir été un facteur confondant de ces mesures (Tableau 4).

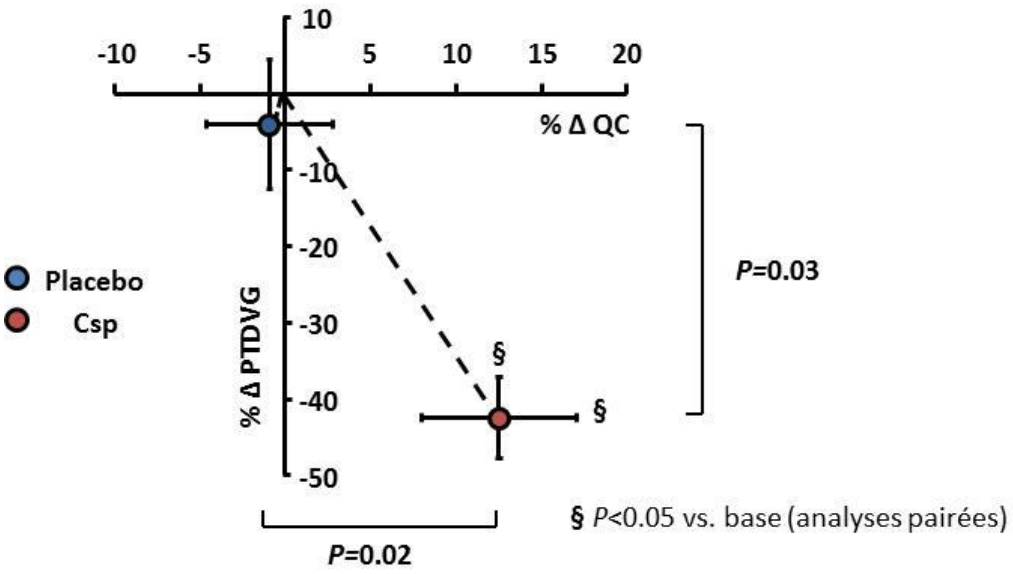


Figure 24 : Variations relatives du débit cardiaque (QC, en abscisse) et de la pression télé-diastolique du ventricule gauche (PTDVG, en ordonnée) dans les groupes Placebo et Cardiosphères. L'administration de cardiosphères entraîne une diminution de la PTDVG et une augmentation du débit cardiaque mais pas le placebo.

	Base			Final			Delta		
	Placebo	Csp	*P*	Placebo	Csp	*P*	Placebo	Csp	*P*
PTDVG, mmHg	16±2	18±1	0,31	15±3	11±4	0,06	-1±3	-6±3	0,02
QC, L/min	3,5±0,6	3,6±0,3	0,65	3,5±0,4	4,1±0,5	0,05	-0,1±0,3	0,5±0,5	0,01
PAS, mmHg	71±11	71±8	0,61	86±4	93±14	0,25	18±16	21±8	0,65
PAD, mmHg	51±5	53±7	0,89	63±5	67±16	0,36	13±3	14±16	0,58
FC, bpm	108±11	111±27	0,84	104±16	98±7	0,40	-6±18	-10±11	0,65

Tableau 4 : Caractéristiques hémodynamiques des animaux traités et contrôles avant traitement et 1 mois après traitement. (PTDVG : pression télé-diastolique du ventricule gauche ; QC : débit cardiaque ; PAS : pression artérielle systolique ; PAD : pressions artérielle diastolique ; FC : fréquence cardiaque).

4.4. Sécurité immunologique de l'administration de cardiosphères allogéniques : infiltration cellulaire et allo-anticorps

L'analyse histologique a mis en évidence une infiltration lymphocytaire plus importante dans les zones infarcies et bordantes chez les animaux traités par les cardiosphères (5/7 contre 0/7, P=0,02). Néanmoins, aucune zone contenant des cardiomyocytes endommagés par la réponse immunitaire n'était observable, de sorte qu'aucun animal n'avait de réaction supérieure au grade 1 de l'ISHLT (Figure 25A). Concernant les anticorps, leur concentration étaient légèrement supérieurs à ceux observés chez les animaux traités par des cardiosphères. Cependant les niveaux atteints étaient très bas et très inférieurs au contrôle positif, rendant la signification de cette observation incertaine (Figure 25B).

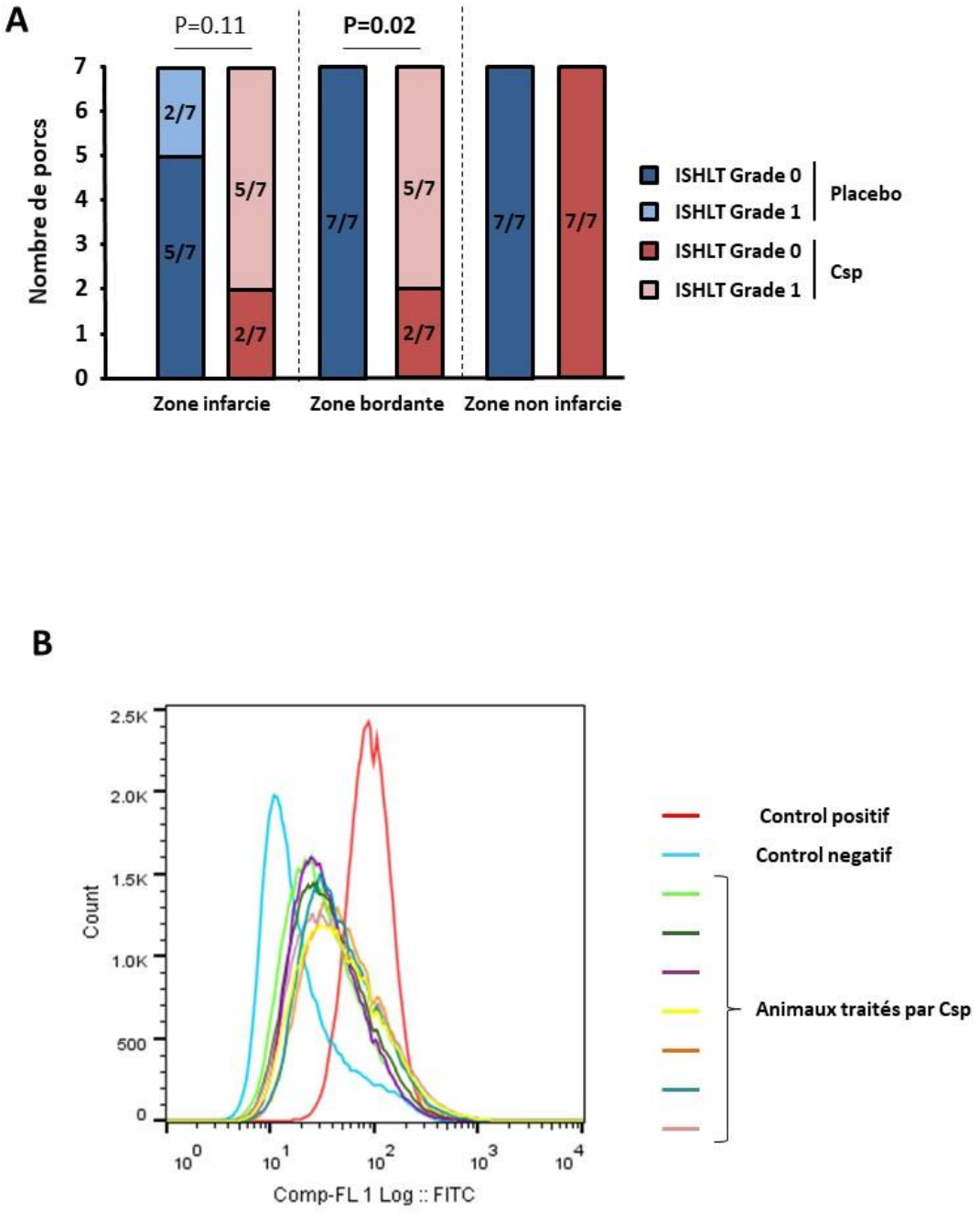


Figure 25 : (A) Infiltration cellulaire dans les zones infarcie, bordante et non infarcie : l'administration de cardiosphères cause une discrète réaction immunitaire tissulaire mais sans dommage cardiomyocytaire (grade ISHLT<2). (B) Quantification des allo-anticorps par cytométrie de flux ; une légère augmentation des allo-anticorps est observée chez les animaux traités par cardiosphères comparés aux animaux contrôles (courbe bleue) ; néanmoins ces valeurs sont nettement inférieures à celle du contrôle positif (courbe rouge).

5. Commentaires

Dans cette première partie, nous avons donc étudié la faisabilité et l'efficacité de l'injection de cardiosphères dont la taille avait été optimisée grâce à la modification des conditions de culture. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle porcin d'infarctus constitué. Les principaux résultats sont les suivants. Tout d'abord l'injection de ces particules de tailles relativement importante (40µm en moyenne) est faisable et sans risque. De plus, les cardiosphères ont la capacité de freiner la survenue du remodelage inverse et de diminuer la taille de l'infarctus. Cette diminution du remodelage inverse pourrait de plus être accompagnée d'amélioration clinique chez l'homme puisque dans ce modèle porcin, elle est associée à une amélioration hémodynamique se traduisant par une augmentation du débit cardiaque et une diminution de la pression télédiastolique du ventricule gauche. Enfin, sur le plan immunologique, cette étude a confirmé le caractère immuno-privilégié des cardiosphères puisque la réponse immunitaire observée avec cette thérapie allogénique a été minime.

Dans la partie suivante, nous aborderons un des mécanismes impliqués dans les effets des cardiosphères qui est la sécrétion d'exosomes.

Myocardial Infarction

Intracoronary Delivery of Self-Assembling Heart-Derived Microtissues (Cardiospheres) for Prevention of Adverse Remodeling in a Pig Model of Convalescent Myocardial Infarction

Romain Gallet, MD; Eleni Tseliou, MD*; James Dawkins, DVM*; Ryan Middleton, MS; Jackelyn Valle, BS; David Angert, MD, PhD; Heidi Reich, MD; Daniel Luthringer, MD; Michelle Kreke, PhD; Rachel Smith, PhD; Linda Marbán, PhD; Eduardo Marbán, MD, PhD

Background—Preclinical studies in rodents and pigs indicate that the self-assembling microtissues known as cardiospheres may be more effective than dispersed cardiosphere-derived cells. However, the more desirable intracoronary route has been assumed to be unsafe for cardiosphere delivery: Cardiospheres are large (30–150 μm), raising concerns about likely microembolization. We questioned these negative assumptions by evaluating the safety and efficacy of optimized intracoronary delivery of cardiospheres in a porcine model of convalescent myocardial infarction.

Methods and Results—First, we standardized the size of cardiospheres by modifying culture conditions. Then, dosage was determined by infusing escalating doses of cardiospheres in the left anterior descending artery of naive pigs, looking for acute adverse effects. Finally, in a randomized efficacy study, 14 minipigs received allogeneic cardiospheres (1.3×10^6) or vehicle 1 month after myocardial infarction. Animals underwent magnetic resonance imaging before infusion and 1 month later to assess left ventricular ejection fraction, scar mass, and viable mass. In the dosing study, we did not observe any evidence of microembolization after cardiosphere infusion. In the post-myocardial infarction study, cardiospheres preserved LV function, reduced scar mass and increased viable mass, whereas placebo did not. Moreover, cardiosphere decreased collagen content, and increased vessel densities and myocardial perfusion. Importantly, intracoronary cardiospheres decreased left ventricular end-diastolic pressure and increased cardiac output.

Conclusions—Intracoronary delivery of cardiospheres is safe. Intracoronary cardiospheres are also remarkably effective in decreasing scar, halting adverse remodeling, increasing myocardial perfusion, and improving hemodynamic status after myocardial infarction in pigs. Thus, cardiospheres may be viable therapeutic candidates for intracoronary infusion in selected myocardial disorders. **(*Circ Cardiovasc Interv*. 2015;8:e002391. DOI: 10.1161/CIRCINTERVENTIONS.115.002391.)**

Key Words: myocardial infarction ■ stem cells

Ischemic heart disease is the leading cause of death in the world, accounting for at least 7 million deaths per year.[1,2] New treatments to improve outcome after myocardial infarction (MI) are desirable. Heart-derived cell products have particular promise in this regard.[3] The first described human cardiac stem cell products were self-assembling multicellular three-dimensional (3D) microtissues, which Messina et al[4] dubbed cardiospheres. These microtissues had diameters of ≈30 to >200 μm; when injected intramyocardially, cardiospheres improved function and structure in a mouse model of acute MI. Given that capillaries have diameters of only ≈8 μm, intracoronary delivery of cardiospheres was assumed to be implausible given the likelihood of coronary microembolization.[5,6] In contemplating translation to the clinic, we preferred to use the intracoronary route whose safety had been well-validated in previous clinical trials of cell therapy. Thus, we developed cardiosphere-derived cells (CDCs) as a dispersed single-cell product grown from replated cardiospheres. CDCs delivered intracoronary turned out to work well, both in animal models and in humans,[7–11] but we were left wondering whether cardiospheres might have worked even better. When compared head-to-head in small- or large-animal MI models using intramyocardial delivery, cardiospheres were at least as effective as CDCs, and often more so. Therefore, in this study, we questioned our negative

See Editorial by Ishikawa

Received January 16, 2015; accepted March 30, 2015.

From the Cedars-Sinai Heart Institute, Los Angeles, CA (R.G., E.T., J.D., R.M., J.V., D.A., H.R., D.L., M.K., R.S., L.M.); and Capricor Inc, Los Angeles, CA (M.K., R.S., L.M.).

*Drs Tseliou and Dawkins contributed equally to this work.

The Data Supplement is available at http://circinterventions.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/CIRCINTERVENTIONS.115.002391/-/DC1.

Correspondence to Eduardo Marbán, MD, PhD, Cedars-Sinai Heart Institute, 8700 Beverly Blvd, Los Angeles, CA 90048. E-mail eduardo.marban@csmc.edu

© 2015 American Heart Association, Inc.

WHAT IS KNOWN

- Heart-derived stem cell clusters (cardiospheres) improve post myocardial infarction heart function and structure when injected intramuscularly, but are assumed to be too large for safe intracoronary delivery.
- Cardiosphere-derived cells are effective and safe when infused via the coronary route in animals and in humans.
- Cardiospheres are equally or more efficacious than cardiosphere-derived cells when both are injected intramuscularly in animals.

WHAT THE STUDY ADDS

- Optimization of cardiosphere manufacturing methods consistently yields particles of 50 to 100 μm size.
- Dose- and size-optimized cardiospheres can be safely delivered via the coronary route, increasing function and decreasing adverse remodeling in a pig model of convalescent myocardial infarction.
- Intracoronary delivery of cardiospheres produces intense angiogenic effects and may be even more effective than intracoronary cardiosphere-derived cells.

assumptions about the viability of intracoronary cardiosphere infusion. We reasoned that perhaps, if cardiosphere sizes were standardized and dose/delivery were carefully optimized, we might be able to infuse cardiospheres safely down a coronary artery. We initially optimized cardiosphere size using different culture conditions, and performed a dose-ranging study in minipigs to assess the feasibility and safety of intracoronary cardiosphere infusion. Finally, we performed a blinded, prospective placebo-controlled study in a porcine model of convalescent MI to assess the safety and efficacy of intracoronary cardiosphere infusion.

Methods

Animal studies were performed in an American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care accredited facility with approval from the Cedars-Sinai Institutional Animal Care and Use Committee (detailed Methods are available in the Data Supplement).

Growth of Cardiospheres and Optimization of Culture Conditions

CDCs were grown from a freshly explanted heart obtained from a male Sinclair minipig, and secondary cardiospheres were made from CDCs at the fifth passage using cardiosphere media as described.[4,12] Culture time and cell-seeding density were optimized to obtain a minimal percentage of cardiospheres >150 μm (which may cause severe microvascular obstruction) and a high percentage of cardiospheres >50 μm (to avoid the infusion of single cells). For this purpose, we compared 5 different seeding densities and 4 different harvest time points (Figure 1A). Size, number, and distribution of the cardiospheres obtained were determined using a particle counter. The cardiospheres generated (from 12M plated CDCs) were counted before and after ex vivo passage through a microcatheter (Finecross, Terumo, Tokyo, Japan) to quantify retention of cardiospheres in the catheter.

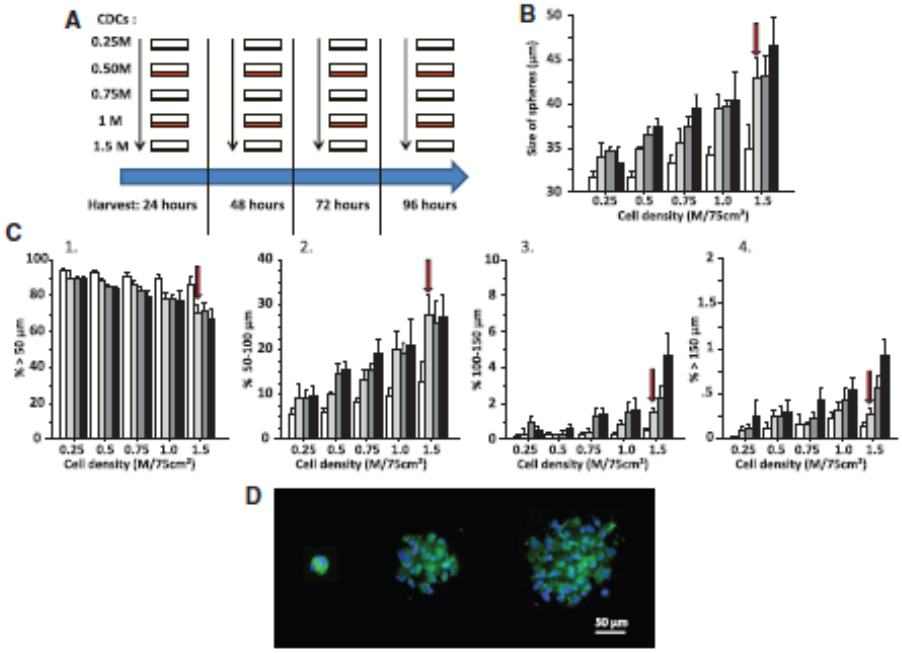


Figure 1. Schematic representation of the in vivo study (**A**); 5 different seeding densities and 4 different times for harvest were used to optimize cardiosphere size. Increasing cell density increases the average size of cardiosphere (**B**), decreases the proportion of small cardiospheres (<50 μm) (**C1**) and increases the proportion of 50 to 100 μm cardiospheres (**C2**). In contrast, increasing culture duration increases the number of cardiospheres in the 100 to 150 μm range (**C3**) and cardiospheres >150 μm (**C4**). The conditions chosen for the in vivo studies are those giving high numbers of cardiospheres >50 μm with few cardiospheres >150 μm (labeled with red arrow in **B** and **C1–C4**). Images of small, midsize and large cardiospheres are shown in (**D**); nuclei are stained with 4′,6-diamidino-2-phenylindole (blue) and cell membranes are stained with calcein acetomethoxy (green). CDC indicates cardiosphere-derived cells.

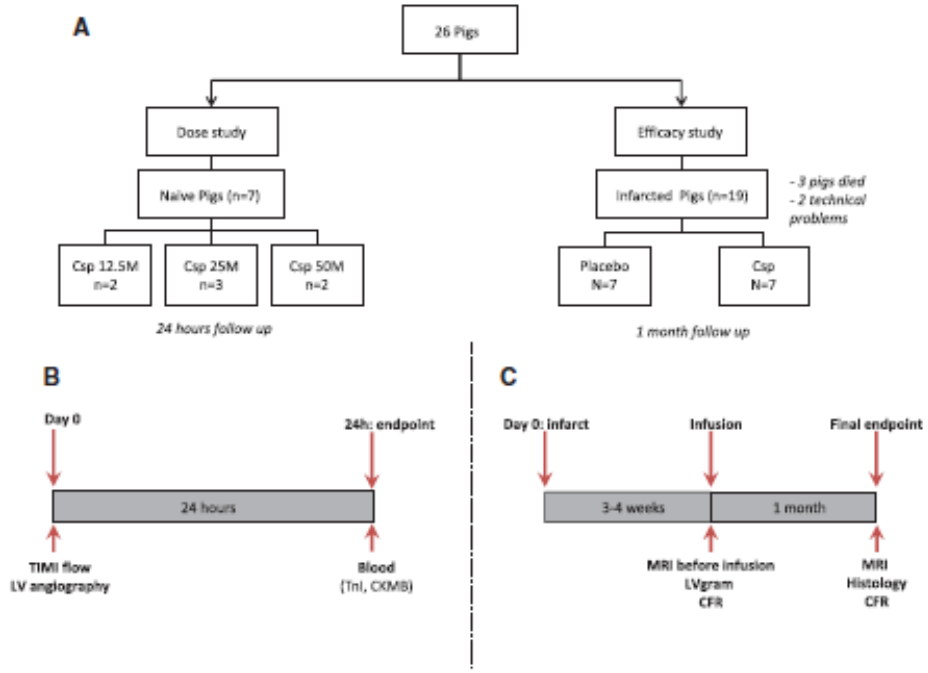


Figure 2. Design of the whole study (**A**) and of the feasibility (**B**) and efficacy (**C**) studies. CFR indicates coronary flow reserve; CSp, cardiospheres; LV, left ventricular; and TnI, troponin I.

For in vivo studies, secondary cardiospheres from 12.5M CDCs were frozen and thawed the day of infusion. Viability of the thawed cardiospheres was assessed using homo-ethidium bromide (which stains dead nuclei red).

Study Design

Two separate experimental protocols were performed as depicted in Figure 2. Briefly, a study was first performed to determine the maximal feasible dose and, in a second step, a blinded placebo-controlled study was performed to assess efficacy of infused cardiospheres. A total of 26 Yucatan minipigs were used: 7 completed the dose study and 14 completed the efficacy study. Three pigs died, 2 after MI creation, and 1 after placebo infusion. Two pigs were excluded because of technical issues during MI creation (1 balloon deflation leading to inadequate MI, and 1 left anterior descending artery dissection).

MI Creation and Cardiosphere Infusion

For the feasibility study, increasing doses of cardiospheres were administered in naive Yucatan minipigs. The doses were defined by the number of single cells used to manufacture the cardiospheres (single-cell equivalent [SCE]). Pigs were infused with 12.5×10^6, 25×10^6, and 50×10^6 SCE, corresponding to $\approx3.25\times10^5$, 6.5×10^5, and 1.3×10^6 multicellular particles, respectively (Figure I in the Data Supplement). All intracoronary infusions were performed using continuous flow (no flow interruption during infusion, no balloon inflation), with a microcatheter (Finecross) placed in the mid–left anterior descending artery. Safety was assessed by adverse events during infusion (eg, arrhythmias, dissection, and hypotension), Thrombolysis In Myocardial Infarction (TIMI) flow after infusion, left ventricular ejection fraction (LVEF) measured by LV gram before and after infusion (to detect potential myocardial stunning related to microembolization), and troponin I increase 24 hours after infusion.

For the efficacy study, MIs were created in female adult Yucatan minipigs by inflating an angioplasty balloon in the mid–left anterior descending artery just after the first diagonal branch for 2.5 hours. Three weeks later, animals were randomized to receive cardiospheres (50×10^6 SCE, 1.3×10^6 particles) or vehicle using continuous flow infusion. Safety was assessed as in the dose study. LV end-diastolic pressure (LVEDP) was recorded using a pigtail catheter placed into the LV cavity. Left ventriculography was then performed to assess LV function. Minipigs were euthanized 1 month after infusion. All procedures and analyses were performed blinded to treatment allocation.

Magnetic Resonance Imaging

Magnetic resonance imaging was performed on a 3.0 Tesla MRI scanner (Siemens Magnetom Verio, Erlangen, Germany) at baseline (3 weeks after MI, before infusion) and 1 month post infusion.

Coronary Flow Reserve Measurement

Coronary flow reserve was quantified with a Doppler wire as described in the Data Supplement.

Histology

Histological analyses were performed on 8-μm sections from myocardial samples (fixed in 10% formalin and embedded in paraffin) obtained from infarct and border zone (3–6 slides per heart) and remote zone (2 slides per heart).

Statistical Analysis

Continuous variables are presented as mean±SD in the text and mean±SE in the figures. Categorical variables are expressed as absolute number and percentage. Independent groups (cardiospheres and placebo) were compared using Mann–Whitney *U* test. Wilcoxon test was used to compare paired groups (changes from baseline). All *P* values are 2 sided, and a $P<0.05$ was considered statistically significant.

Results

Cardiosphere Culture Optimization

Figure 1B shows a histogram of cardiosphere size distribution at various times and seeding densities. Increased seeding

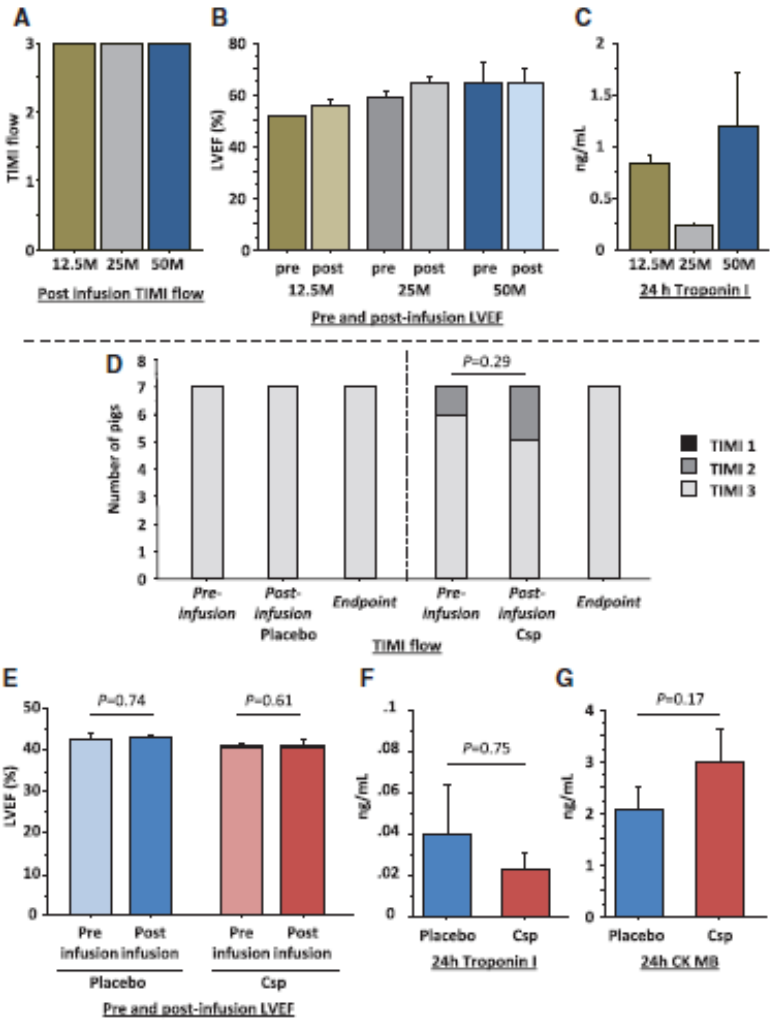


Figure 3. Intracoronary infusion of cardiospheres (CSp) is safe in both naïve pigs and pigs with convalescent myocardial infarction. Thrombolysis In Myocardial Infarction (TIMI) flow (**A**), left ventricular ejection fraction (LVEF; **B**) and troponin I (**C**) after infusion of increasing doses of CSp (dose labeled in single-cell equivalents) in naïve pigs (feasibility study). In infarcted pigs (efficacy study), no differences were observed in TIMI flow (**D**), troponin I (**E**), creatine kinase MB isoenzyme (**F**), or LVEF (**G**) after infusion of CSp or placebo (n=7 per group).

density is associated with a higher proportion of spheres >50 µm (Figure 1C), whereas longer culture time mostly increased the percentage of big particles (>150 µm; Figure 1D). Therefore, a high-seeding density (1.5×10^6 CDCs in 75 cm^2 flasks, ie, 20×10^3 CDCs/cm^2) and short culture duration (48 hours) were deemed optimal for cardiospheres manufacturing. The number and size of secondary cardiospheres manufactured from 12.5M CDCs using these conditions are shown in Figure I in the Data Supplement.

Using optimally manufactured cardiospheres, we observed 5±9% total retention of cardiospheres in the catheter and ≈10% retention for cardiospheres >50 µm (Figure I in the Data Supplement). Therefore, for the in vivo study we decided to increase the doses by 10% to offset in-catheter retention. Fortuitously, the extent of loss dramatically increased with particle size, reaching ≈70% for cardiospheres >150 µm, providing an additional safeguard against microvascular occlusion.

Safety of Cardiosphere Infusion

A dose escalation study was performed in 7 naive animals to assess feasibility and safety. Pigs were infused with 12.5×10^6 SCE (n=2), 25×10^6 SCE (n=3), and 50×10^6 SCE (n=2). No arrhythmia occurred during cardiosphere infusion and no impairments of TIMI flow or LVEF after infusion were observed (Figure 3A and 3B). Troponin increase 24 hours after infusion was low without any difference among the 3 doses (Figure 3C). To further assess safety, the heart of a pig infused with 50M SCE and euthanized 24 hours after infusion was stained with tetrazolium chloride. No myocardial necrosis was evident, either in the infused region or in remote areas (Figure II in the Data Supplement). Therefore, the highest dose (50M SCE) was used for further studies.

Safety was then confirmed in infarcted animals. After infusion of cardiospheres (dose of 50M SCE), we observed no

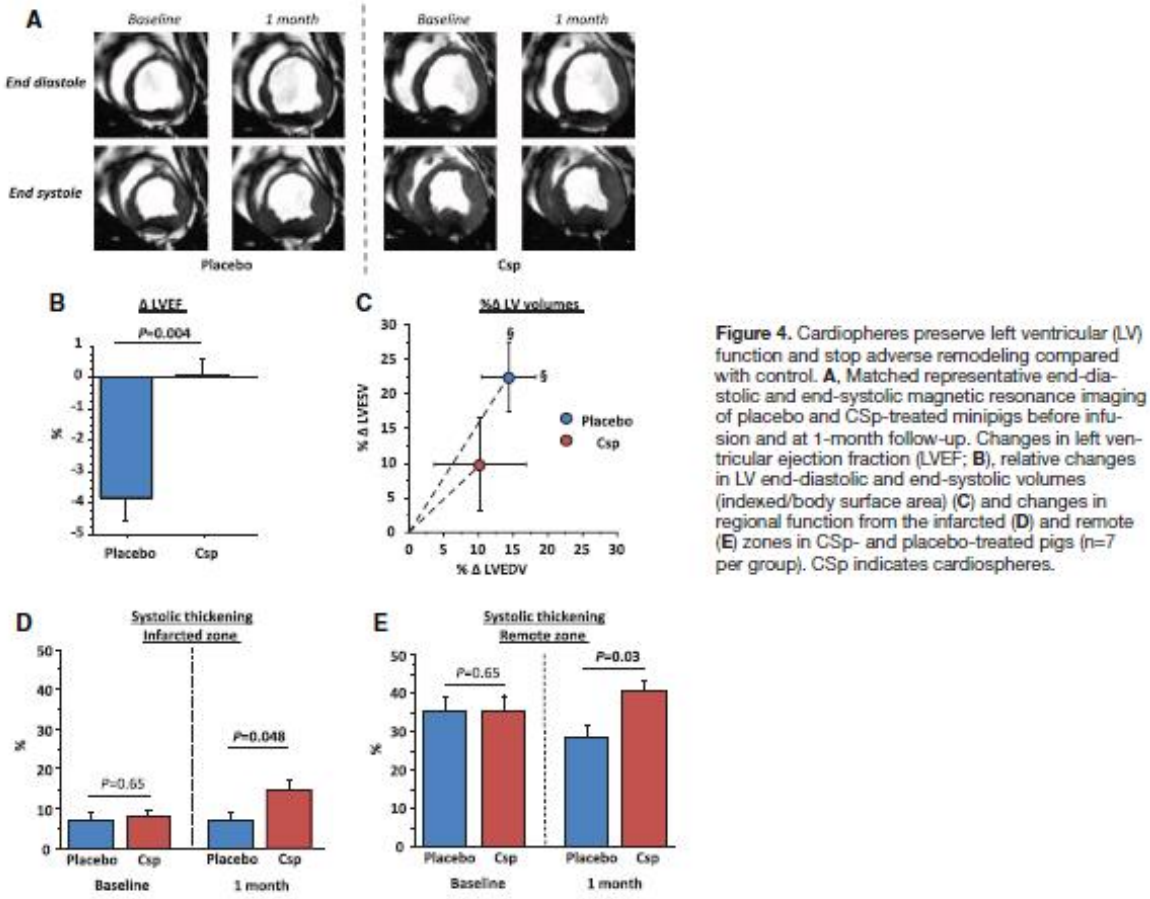


Figure 4. Cardiopheres preserve left ventricular (LV) function and stop adverse remodeling compared with control. **A**, Matched representative end-diastolic and end-systolic magnetic resonance imaging of placebo and CSp-treated minipigs before infusion and at 1-month follow-up. Changes in left ventricular ejection fraction (LVEF; **B**), relative changes in LV end-diastolic and end-systolic volumes (indexed/body surface area) (**C**) and changes in regional function from the infarcted (**D**) and remote (**E**) zones in CSp- and placebo-treated pigs (n=7 per group). CSp indicates cardiospheres.

impairment of LVEF when compared with vehicle infusion; also, troponin I and creatine kinase at 24 hours were similar in cardiosphere and placebo groups (Figure 3D–3G). No impairment in TIMI flow was observed after vehicle infusion, whereas it decreased from TIMI 3 to TIMI 2 in 1 of 7 pigs infused with cardiospheres. This decrease in TIMI flow was most likely related to coronary spasm, for 3 reasons, such as (1) coronary flow normalized immediately after nitroglycerin infusion, along with visible dilatation of the epicardial vessel; (2) there was no decrease in LV function; and (3) troponin did not increase at 24 hours. These considerations exclude microembolization as the cause of the decrease in TIMI flow grade. No other adverse events occurred during cardiosphere infusion, whereas 1 pig died of severe hypotension followed by cardiac arrest immediately after placebo infusion. Analysis of the MRI performed in that pig before infusion revealed a major myocardial scar involving both ventricles with severe biventricular dysfunction. Therefore, only 14 pigs were analyzed at the 1 month post infusion end point.

Preclinical Study: Benefits Associated With Cardiosphere Infusion

Having established a safe dose, we performed a preclinical study, in which animals were blindly allocated to cardiosphere (50×10^6 SCE, 1.3 cardiospheres; n=7) or vehicle infusion (n=8). The average diameter of the cardiospheres infused was 45±23 µm; 30.2±6.8%, 3.4±1.8%, and 0.24±0.17% of the cardiospheres were >50, 100, and 150 µm, respectively. Viability of the infused cardiospheres was 92.1±3.9%. MRI characteristics of the animals before treatment are shown in Table I in the Data Supplement.

LV Function Preservation and Scar Reduction

Figure 4A shows representative nonenhanced MR images at end-diastole and end-systole in placebo (left) and cardiosphere groups (right). Pooled data (Figure 4B) reveal that, at baseline, LVEF was similar in the 2 groups. At 1-month follow-up, however, LVEF was preserved in cardiosphere-treated animals (P=0.35 within group), whereas it significantly decreased in placebo (P=0.02 within group; P=0.004 between groups). In parallel, both indexed LV end-systolic and end-diastolic volumes significantly increased in the placebo group but not in the cardiosphere group (Figure 4C), indicative of attenuated adverse remodeling with cardiosphere treatment. In accordance with preservation of LV volumes, cardiosphere-treated pigs showed better 1-month regional function (assessed by end-systolic thickening) compared with placebo both in infarcted and in remote zones (Figure 4D and 4E).

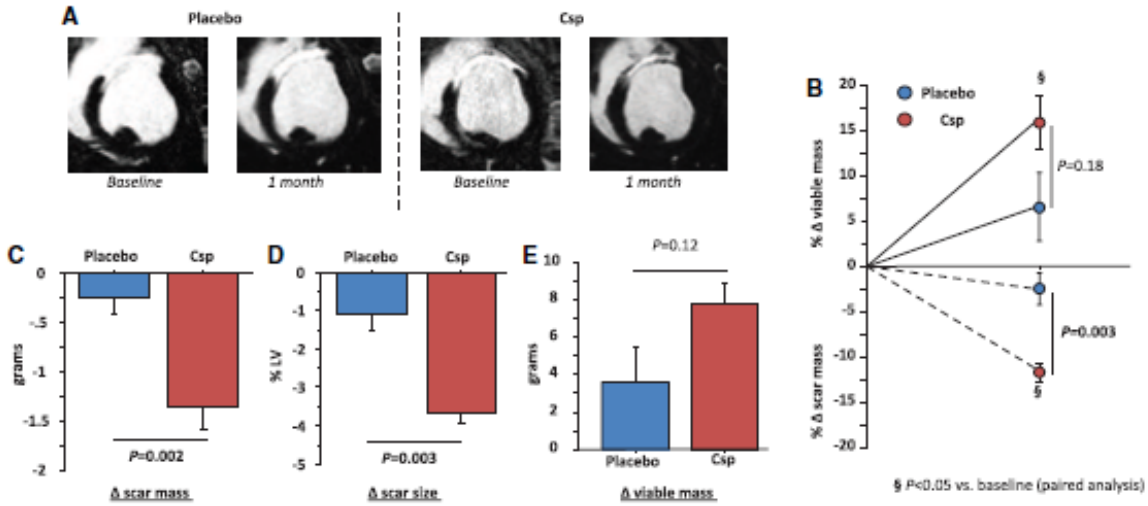


Figure 5. Cardiospheres (CSp) but not placebo decreased scar size and tended to increase viable mass at 1 month. **A**, Representative magnetic resonance imaging showing late gadolinium enhancement for placebo- and CSp-treated pigs. Changes in scar mass (**B**), scar size (scar mass/total LV mass; **C**), and viable mass (**D**). Relative changes in scar mass and viable mass (**E**).

Analysis of late gadolinium-enhanced images (Figure 5A) revealed that scar mass decreased significantly in cardiosphere-treated animals (P=0.02 within group) but not in placebo (P=0.18 within group; P=0.002 between group) leading to a 5-fold higher relative decrease in the cardiosphere group (–11.6±2.7% versus –2.3±4.6%; P=0.003), despite similar scar mass at baseline (Figure 5B and 5C). Consistently, the decrease in scar size (scar mass divided by total LV mass; Figure 5D) was significantly greater in cardiosphere group than in control. In addition to the reduction of scar mass, we observed a strong trend toward a higher increase in viable mass in cardiosphere-treated animals (Figure 5B and 5D). We have previously noted that viable mass recovery tends to lag behind the reduction of scar, such that changes in viable mass that are not significant at 1 month (as is the case here) tend to increase with longer follow-up.[11,13,14]

Myocardial Perfusion Increase

Myocardial perfusion was assessed using 2 different methods: (1) coronary flow reserve of the infarct-associated artery before cardiosphere infusion and 1 month later using a Doppler wire and (2) first-pass MRI to quantify perfusion in the infarcted area. Coronary flow reserve values at end point were higher in cardiosphere-treated pigs than in control, despite similar baseline values (Figure 6A). Consistent with these findings, MRI first-pass sequences revealed a significant increase in myocardial perfusion at end point in the cardiosphere group but not in placebo controls (Figure 6B; P=0.02 in cardiosphere versus P=0.18 in control, P=0.13 for intergroup comparison).

Histology: Fibrosis, Vascular Density, and Architecture

Functional measurements reviewed above indicate an increase in myocardial perfusion with cardiosphere treatment. Consistent with these findings, histological analysis revealed 2-fold higher arteriolar density (ie, isolectin and α-smooth muscle actin-positive vascular structures) in the infarcted and border zones of cardiosphere-treated pigs compared with controls, but no differences in the remote zone (Figure 6C and 6D). Capillary density was also higher in the peri-infarct zone but not in the remote zone (Figure 6E).

MRI also revealed a decrease in myocardial scar after cardiosphere infusion. To confirm this histologically, we first evaluated the transmurality of the scar using Masson trichrome staining. Then, collagen content in the infarcted, border, and remote areas was quantified using Picrosirius red (which offers superior contrast between fibrotic and nonfibrotic areas in the remote and border zones relative to Masson trichrome, as evident from the representative images in Figure 7A1–7A4). Scar transmurality was less in cardiosphere-treated pigs versus placebo (Figure 7B). In parallel, collagen content was reduced in the cardiosphere-treated pigs not only in the infarct zone and in border zone but also in the remote zone (Figure 7C–7E).

These differences in fibrosis and vascularity were not accompanied by cardiomyocyte hypertrophy, as demonstrated by the similar cross-sectional areas of cardiomyocytes from cardiosphere and placebo pigs (Figure III in the Data Supplement).

Hemodynamic Improvement

To investigate whether the observed functional and architectural improvements were associated with hemodynamic improvement, we measured LVEDP and cardiac output (CO, from stroke volume and heart rate). At baseline, LVEDP and CO were similar in cardiosphere- and placebo-treated pigs. After treatment, LVEDP significantly decreased in cardiosphere but not in placebo, whereas CO increased only in the cardiosphere group (Figure 8A; Table). We did not observe any differences in systolic or diastolic blood pressure or heart rate that might have confounded the LVEDP and CO measurements (Table).

Immunologic Safety: Cellular Infiltration and Alloantibodies

Histological analysis revealed more lymphocyte infiltration in the infarcted and border zone of the treated animals compared with

placebo (5/7 animals versus 0/7 animals; P=0.002). Importantly, no area of cardiomyocyte damage related to immune response was observed, indicating that no animal had a grade of immune reaction >1 (Figure IV in the Data Supplement). Slightly higher levels of alloantibodies were observed in cardiosphere-treated animals as compared with placebo (Figure IV in the Data Supplement), but the significance of this observation is uncertain.

Discussion

Adverse remodeling is a major contributor to MI-related mortality and morbidity.[15,16] Despite the improvement of care and faster reperfusion, mortality remains >10% at 1 year.[2] Here, we demonstrated the ability of 3D multicellular cardiospheres to halt the ongoing process of adverse remodeling in a clinically relevant porcine model of convalescent MI. Furthermore, we established the safety of the desirable intracoronary route for the administration of this cell product.

Safety of Intracoronary Infusion

Intracoronary infusion is an easy, convenient, and widely available technique for delivery of biological products. Before this study, intracoronary infusion of cardiospheres had been avoided because of the prevailing assumption that these multicellular microtissues may cause microvascular obstruction resulting in myocardial damage. Indeed, some authors have raised the concern that intracoronary infusion of particles >10 μm may be unsafe because of microvascular obstruction.[17] However, the safety of intracoronary infusion of large particles (CellBeads of 160–400 μm) has previously been reported, although the number of particles infused was low (≤60 000), and those studies aimed to cause a certain degree of microvascular occlusion.[18–20] Here, we have been able to deliver intracoronary >1×10^6 cardiospheres with an average diameter of 45 μm without any adverse events. The first study evaluating intracoronary infusion of dispersed CDCs used minipigs with convalescent MI and traditional stop-flow delivery; intracoronary infusion of ≥25×10^6 CDCs, which have a diameter ≈20 μm, led to elevation of serum troponin I at 24 hours, establishing the maximal safe dose as 12.5×10^6 (or ≈300 000 CDCs/kg).[8] The combination of careful cardiosphere formulation and the use of continuous-flow infusion[21] allowed us to deliver up to an equivalent of 50×10^6

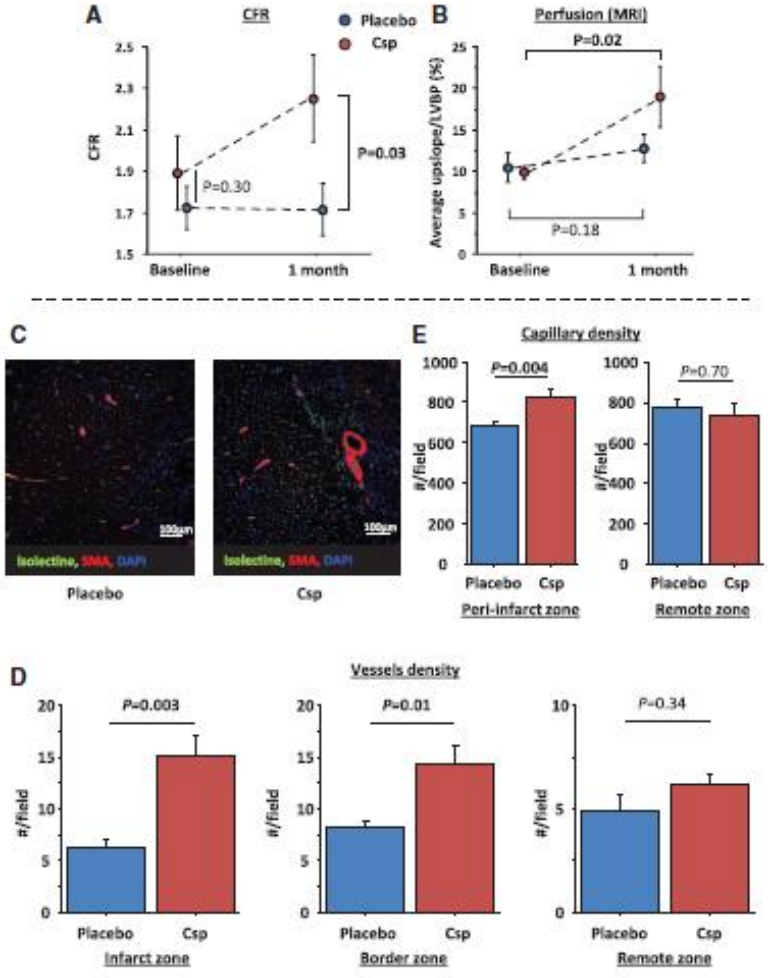


Figure 6. Cardiospheres (CSp) increase myocardial perfusion of the infarcted zone assessed by coronary flow reserve (CFR;) and magnetic resonance imaging (first pass sequences; **B**). Representative images of arterioles and capillaries in the peri-infarcted area in CSp- and placebo-treated pigs (**C**). Arteriolar density is increased in the infarcted (**D**) and border zones but not in the remote zone. Capillary density (**E**) is increased in the peri-infarct zone but not in the remote zone (n=7 per group).

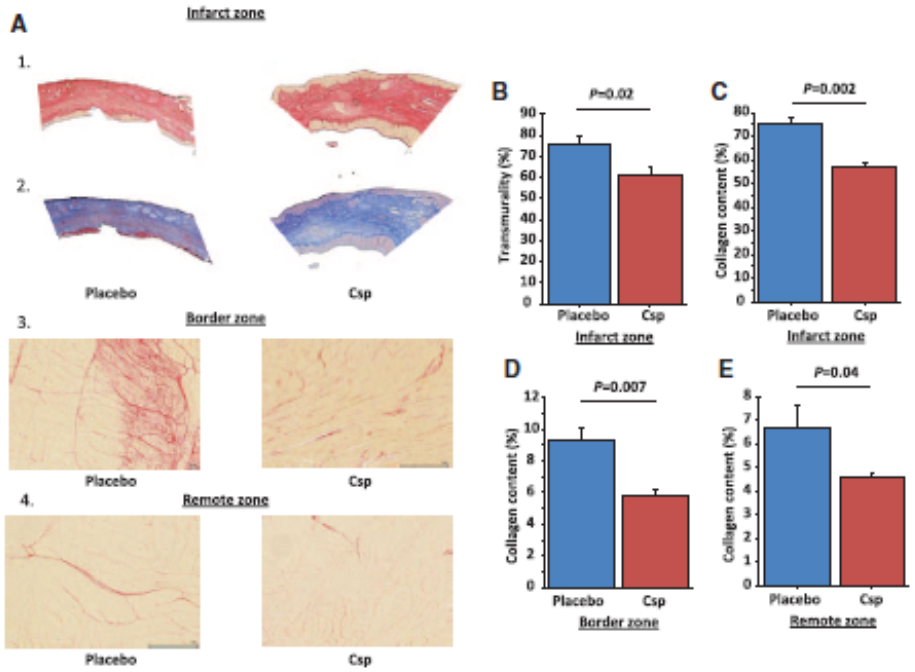


Figure 7. Cardiospheres (CSp) treatment decreases fibrosis in the heart. **A**, Collagen-stained sections of infarct zone by Picrosirius red (**A1**) and Masson trichrome staining (**A2**), and of border (**A3**), and remote (**A4**) zones by Picrosirius red. Transmurality of the scar (**B**) and collagen content of the infarcted (**C**), border (**D**), and remote (**E**) zones (n=7 per group).

cells intracoronary in the same model. This ability to deliver a higher number of cells may augment efficacy, although cell therapy does not necessarily follow conventional dose–response relationships.[22–24]

Antifibrotic and Proangiogenic Properties of Cardiospheres

CDCs have been extensively studied preclinically, leading to several phase I/II clinical trials involving first autologous and, more recently, allogeneic products.[9,25] Thus, the ability of CDCs to decrease scar mass and to increase viable tissue has been thoroughly validated. In the porcine post-MI model, we confirmed the impressive antiremodeling properties of cardiospheres that had been observed by intramyocardial injection in small-animal models.[13,14,26–28] Indeed, cardiosphere infusion completely halted further LVEF deterioration. Moreover, we observed an improvement in regional function and a decrease in fibrosis both in infarcted and in noninfarcted zones, indicating a positive effect on adverse global remodeling, and not just a decrease in scar content of the infarcted area. These global effects on LV remodeling and fibrosis may be related to the higher engraftment and survival of cardiospheres as compared with CDCs and to the secretion of growth factors, endoglin and MMP described.[12,13,27,29,30] Taken together, these properties may enable a more sustained and diffuse paracrine effect. Paracrine signaling is a major contributor to cardiac regeneration after cell therapy,[29,31–35] as benefits far outlast measurable cell engraftment.[7,10,28] It seems likely that the benefit observed in this study might increase over time[8,10] and potentially surpass the benefit observed with CDCs.[11] The benefits seen here are indeed generally superior to those seen 1 month after intracoronary infusion of CDCs or after intramyocardial injection of a comparable dose of cardiospheres (comparison with historical results from Yee et al,[6] and unpublished 1-month follow-up results from the study by Malliaras et al[11] are summarized in Figure 8B and 8C). However, a direct comparison was beyond the scope of this study.

In addition to this antifibrotic effect, we describe a strong angiogenic effect after cardiosphere infusion. Indeed, we observed a 2-fold greater number of arterioles in the infarcted and border zones of cardiosphere-treated animals compared with placebo. This increased arteriolar number was associated with improved perfusion in the infarcted area as assessed by 2 different methods (invasive and noninvasive). Given the chronicity of the model, the increase in myocardial perfusion is probably attributable to the growth of new vessels, not to preservation of existing vasculature. This impressive angiogenic effect might be useful to recruit in selected clinical situations, for example, in patients with intractable angina or microcirculatory deficits.

Hemodynamic Improvement

Consistent with the structural changes, we observed hemodynamic improvements after cardiosphere infusion, including increased CO and, importantly, decreased LVEDP. High LVEDP is a strong predictor of adverse events (ie, acute heart failure or death)[36–39]; if reproduced in patients, the 2-fold decrease observed in this study could be highly meaningful clinically.

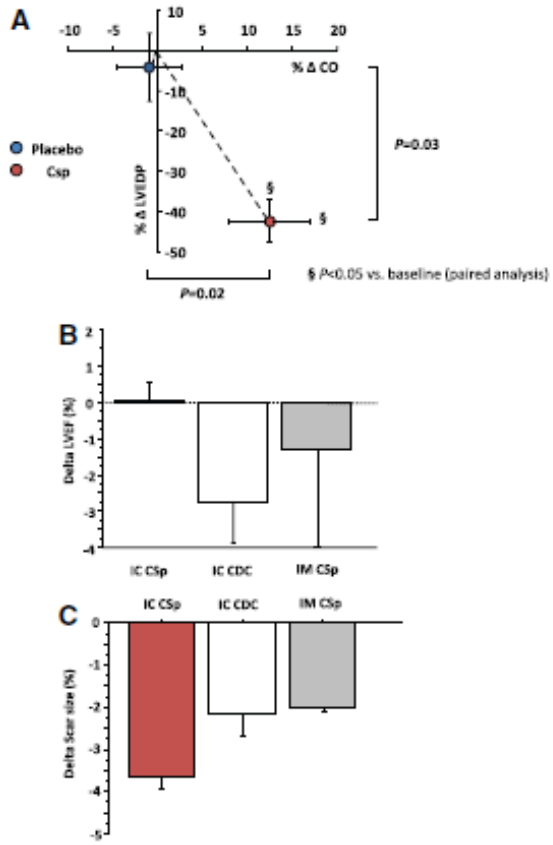


Figure 8. A, Cardiospheres (CSp) increase cardiac output and decrease left ventricular (LV) end-diastolic pressure compared with placebo. Relative changes are shown. Effects on left ventricular ejection fraction (LVEF) preservation (**B**) and scar size decrease (**C**) of intracoronary (IC) CSp compared with IC CSp-derived cell (CDC) and to intramyocardial injection (NOGA) of a comparable dose of Csp (45M single-cell equivalent). The results for IC CDC and intramyocardial CSp are derived from previous studies (no statistical comparisons were, therefore, performed). CO indicates cardiac output; and IM, intramyocardial.[6,11]

Immunologic Safety

The structural and functional improvements associated with allogeneic cardiosphere infusion were associated with minimal immune reaction, confirming the safety of allogeneic heart–derived cell therapy.[10,11,28] Although no immunosuppressive treatment was given, we did not observe any reaction >grade 1 of the International Society for Heart & Lung Transplantation (ISHLT) in the tissue, and the level of alloantibodies that were detected was not different than in the negative control.

Limitations

This study has several limitations. First, the MI model, although mimicking human adverse remodeling, is made on a background of young healthy animals. Therefore, their ability to recover and generate new cardiac tissue might be superior to what can be observed in patients with cardiovascular disease risk factors and other comorbidities. Second, engraftment was not quantified in this study; engraftment of cardiospheres has been shown to be greater than that of CDCs, but only in intramyocardial injection models.[6,12,27] However, it is not clear whether the benefit of cardiospheres is related to the higher engraftment, to properties of the secretome, or both. Although engraftment correlates roughly with efficacy, the relationship is vague, particularly over the longer term.[8,10,11] Nevertheless, increased short-term engraftment would be expected to boost the availability of secreted factors, so the 2 possibilities are undoubtedly intertwined.

Conclusions

We have demonstrated the safety of intracoronary infusion of multicellular 3D cardiospheres. Moreover, cardiosphere treatment decreases scar, attenuates adverse remodeling, increases myocardial perfusion, and improves hemodynamics in a pig model of convalescent MI. Cardiosphere infusion may deserve testing as a therapeutic approach to attenuate adverse remodeling or to achieve angiogenesis in humans.

Sources of Funding

This study was funded by the Cedars-Sinai Board of Governors Heart Stem Cell Center. General support for the laboratory is provided by National Institutes of Health (NIH). Dr Gallet received a grant from the French Society of Cardiology. J. Dawkins is supported by NIH T32HL116273.

Disclosures

Drs E. Marbán and L. Marbán own equity in Capricor Inc. Drs L. Marbán, Kreke, and Smith are employed by Capricor Inc. The other authors report no conflicts.

Table. Baseline and End Point Values of LVEDP, CO, SBP, DBP, and HR in CSp- and Placebo-Treated Pigs (n=7 Per Group)

	Baseline			End Point			δ		
	Placebo	CSp	*P* Value	Placebo	CSp	*P* Value	Placebo	CSp	*P* Value
LVEDP, mm Hg	16.4±2.5	18.2±1.8	0.31	15.0±3.3	11.8±4.5	0.06	−1.4±3.7	−6.3±3.8	0.02
CO, L/min	3.5±0.6	3.6±0.3	0.65	3.5±0.4	4.1±0.5	0.05	−0.1±0.3	0.5±0.5	0.01
SBP, mm Hg	71±11	71±8	0.61	86±4	93±14	0.25	18±16	21±8	0.65
DBP, mm Hg	51±5	53±7	0.89	63±5	67±16	0.36	13±3	14±16	0.58
HR, bpm	108±11	111±27	0.84	104±16	98±7	0.40	-6±18	-10±11	0.65

CO indicates cardiac output; CSp, cardiospheres; DBP, diastolic blood pressure; HR; heart rate; LVEDP, left ventricle end-diastolic pressure; and SBP, systolic blood pressure.

References

1. World Health Organization. In: Mendis S, Puska P, Norrving B, eds. *Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control*. Geneva, Switzerland; World Health Organization; 2011.
2. Schmidt M, Jacobsen JB, Lash TL, Bøtker HE, Sørensen HT. 25 year trends in first time hospitalisation for acute myocardial infarction, subsequent short and long term mortality, and the prognostic impact of sex and comorbidity: a Danish nationwide cohort study. *BMJ*. 2012;344:e356.
3. Marbán E. Breakthroughs in cell therapy for heart disease: focus on cardiosphere-derived cells. *Mayo Clin Proc*. 2014;89:850–858. doi: 10.1016/j.mayocp.2014.02.014.
4. Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, Salio M, Battaglia M, Latronico MV, Coletta M, Vivarelli E, Frati L, Cossu G, Giacomello A. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*. 2004;95:911–921. doi: 10.1161/01.RES.0000147315.71699.51.
5. Smith RR, Barile L, Cho HC, Leppo MK, Hare JM, Messina E, Giacomello A, Abraham MR, Marbán E. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation*. 2007;115:896–908. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.655209.
6. Yee K, Malliaras K, Kanazawa H, Tseliou E, Cheng K, Luthringer DJ, Ho CS, Takayama K, Minamino N, Dawkins JF, Chowdhury S, Duong DT, Seinfeld J, Middleton RC, Dharmakumar R, Li D, Marbán L, Makkar RR, Marbán E. Allogeneic cardiospheres delivered via percutaneous transendocardial injection increase viable myocardium, decrease scar size, and attenuate cardiac dilatation in porcine ischemic cardiomyopathy. *PLoS One*. 2014;9:e113805. doi: 10.1371/journal.pone.0113805.
7. Aminzadeh MA, Tseliou E, Sun B, Cheng K, Malliaras K, Makkar RR, Marbán E. Therapeutic efficacy of cardiosphere-derived cells in a transgenic mouse model of non-ischaemic dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2015;36:751–762. doi: 10.1093/eurheartj/chu196.
8. Johnston PV, Sasano T, Mills K, Evers R, Lee ST, Smith RR, Lardo AC, Lai S, Steenbergen C, Gerstenblith G, Lange R, Marbán E. Engraftment, differentiation, and functional benefits of autologous cardiosphere-derived cells in porcine ischemic cardiomyopathy. *Circulation*. 2009;120:1075–1083. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.816058.
9. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, Czer LS, Marbán L, Mendizabal A, Johnston PV, Russell SD, Schuleri KH, Lardo AC, Gerstenblith G, Marbán E. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet*. 2012;379:895–904. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60195-0.
10. Malliaras K, Li TS, Luthringer D, Terrovitis J, Cheng K, Chakravarty T, Galang G, Zhang Y, Schoenhoff F, Van Eyk J, Marbán L, Marbán E. Safety and efficacy of allogeneic cell therapy in infarcted rats transplanted with mismatched cardiosphere-derived cells. *Circulation*. 2012;125:100–112. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.042598.
11. Malliaras K, Smith RR, Kanazawa H, Yee K, Seinfeld J, Tseliou E, Dawkins JF, Kreke M, Cheng K, Luthringer D, Ho CS, Blusztajn A, Valle I, Chowdhury S, Makkar RR, Dharmakumar R, Li D, Marbán L, Marbán E. Validation of contrast-enhanced magnetic resonance imaging to monitor regenerative efficacy after cell therapy in a porcine model of convalescent myocardial infarction. *Circulation*. 2013;128:2764–2775. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002863.
12. Lee ST, White AJ, Matsushita S, Malliaras K, Steenbergen C, Zhang Y, Li TS, Terrovitis J, Yee K, Simsir S, Makkar R, Marbán E. Intramyocardial injection of autologous cardiospheres or cardiosphere-derived cells preserves function and minimizes adverse ventricular remodeling in pigs with heart failure post-myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57:455–465. doi: 10.1016/j.jacc.2010.07.049.
13. Tseliou E, de Couto G, Terrovitis J, Sun B, Weixin L, Marbán L, Marbán E. Angiogenesis, cardiomyocyte proliferation and anti-fibrotic effects underlie structural preservation post-infarction by intramyocardially-injected cardiospheres. *PLoS One*. 2014;9:e88590. doi: 10.1371/journal.pone.0088590.
14. Tseliou E, Reich H, de Couto G, Terrovitis J, Sun B, Liu W, Marbán E. Cardiospheres reverse adverse remodeling in chronic rat myocardial infarction: roles of soluble endoglin and Tgf-β signaling. *Basic Res Cardiol*. 2014;109:443. doi: 10.1007/s00395-014-0443-8.
15. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*. 1990;81:1161–1172.
16. St John Sutton M, Pfeffer MA, Plappert T, Rouleau JL, Moye LA, Dagenais GR, Lamas GA, Klein M, Sussex B, Goldman S, Menapace FJ, Parker JO, Lewis S, Sestier F, Gordon DF, McEwan P, Bernstein V, Braunwald E. Quantitative two-dimensional echocardiographic measurements are major predictors of adverse cardiovascular events after acute myocardial infarction. The protective effects of captopril. *Circulation*. 1994;89:68–75.
17. Bolli R, Tang XL, Sanganalmath SK, Rimoldi O, Mosna F, Abdel-Latif A, Jneid H, Rota M, Leri A, Kajstura J. Intracoronary delivery of autologous cardiac stem cells improves cardiac function in a porcine model of chronic ischemic cardiomyopathy. *Circulation*. 2013;128:122–131. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.001075.
18. de Jong R, van Hout GP, Houtgraaf JH, Kazemi K, Wallrapp C, Lewis A, Pasterkamp G, Hoefer IE, Duckers HJ. Intracoronary infusion of encapsulated glucagon-like peptide-1-eluting mesenchymal stem cells preserves left ventricular function in a porcine model of acute myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Interv*. 2014;7:673–683. doi: 10.1161/CIRCINTERVENTIONS.114.001580.
19. Houtgraaf JH, de Jong R, Monkhorst K, Tempel D, van de Kamp E, den Dekker WK, Kazemi K, Hoefer I, Pasterkamp G, Lewis AL, Stratford PW, Wallrapp C, Zijlstra F, Duckers HJ. Feasibility of intracoronary GLP-1 eluting CellBead™ infusion in acute myocardial infarction. *Cell Transplant*. 2013;22:535–543. doi: 10.3727/096368912X638973.
20. Wright EJ, Farrell KA, Malik N, Kassem M, Lewis AL, Wallrapp C, Holt CM. Encapsulated glucagon-like peptide-1-producing mesenchymal stem cells have a beneficial effect on failing pig hearts. *Stem Cells Transl Med*. 2012;1:759–769. doi: 10.5966/sctm.2012-0064.
21. Suzuki G, Weil BR, Leiker MM, Ribbeck AE, Young RF, Cimato TR, Canty JM Jr. Global intracoronary infusion of allogeneic cardiosphere-derived cells improves ventricular function and stimulates endogenous myocyte regeneration throughout the heart in swine with hibernating myocardium. *PLoS One*. 2014;9:e113009. doi: 10.1371/journal.pone.0113009.
22. Hashemi SM, Ghods S, Kolodgie FD, Parcham-Azad K, Keane M, Hamamdzic D, Young R, Rippy MK, Virmani R, Litt H, Wilensky RL. A placebo controlled, dose-ranging, safety study of allogenic mesenchymal stem cells injected by endomyocardial delivery after an acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2008;29:251–259. doi: 10.1093/eurheartj/chm559.
23. Schuleri KH, Feigenbaum GS, Centola M, Weiss ES, Zimmet JM, Turney J, Kellner J, Zviman MM, Hatzistergos KE, Detrick B, Conte JV, McNiece I, Steenbergen C, Lardo AC, Hare JM. Autologous mesenchymal stem cells produce reverse remodelling in chronic ischaemic cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2009;30:2722–2732. doi: 10.1093/eurheartj/ehp265.
24. Tseliou E, Dawkins JF, Gallet R, Kreke M, Smith RR, Middleton R, Valle J, Cingolani E, Kar S, Marban L, Makkar R, Marban E. Dose-escalation study using novel continuous flow intracoronary delivery of allogeneic cardiosphere-derived stem cells: is there a threshold for cell therapy? *Circulation*. 2014;130(suppl 2):A16451. Abstract. http://circ.ahajournals.org/content/130/Suppl_2/A16451.
25. Allogeneic Heart Stem Cells to Achieve Myocardial Regeneration (ALLSTAR) (NCT01458405). http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01458405?term=allstar&rank=1. Accessed April 13, 2015.
26. Cho HJ, Lee HJ, Youn SW, Koh SJ, Won JY, Chung YJ, Cho HJ, Yoon CH, Lee SW, Lee EJ, Kwon YW, Lee HY, Lee SH, Ho WK, Park YB, Kim HS. Secondary sphere formation enhances the functionality of cardiac progenitor cells. *Mol Ther*. 2012;20:1750–1766. doi: 10.1038/mt.2012.109.
27. Li TS, Cheng K, Lee ST, Matsushita S, Davis D, Malliaras K, Zhang Y, Matsushita N, Smith RR, Marbán E. Cardiospheres recapitulate a niche-like microenvironment rich in stemness and cell-matrix interactions, rationalizing their enhanced functional potency for myocardial repair. *Stem Cells*. 2010;28:2088–2098. doi: 10.1002/stem.532.
28. Tseliou E, Pollan S, Malliaras K, Terrovitis J, Sun B, Galang G, Marbán L, Luthringer D, Marbán E. Allogeneic cardiospheres safely boost cardiac function and attenuate adverse remodeling after myocardial infarction in immunologically mismatched rat strains. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61:1108–1119. doi: 10.1016/j.jacc.2012.10.052.
29. Chimenti I, Smith RR, Li TS, Gerstenblith G, Messina E, Giacomello A, Marbán E. Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice. *Circ Res*. 2010;106:971–980. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.210682.
30. Davis DR, Zhang Y, Smith RR, Cheng K, Terrovitis J, Malliaras K, Li TS, White A, Makkar R, Marbán E. Validation of the cardiosphere method to culture cardiac progenitor cells from myocardial tissue. *PLoS One*. 2009;4:e7195. doi: 10.1371/journal.pone.0007195.
31. Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskouei BN, Hu Q, Feigenbaum GS, Margitich IS, Mazhari R, Boyle AJ, Zambrano JP, Rodriguez JE, Dulce R, Pattany PM, Valdes D, Revilla C, Heldman AW, McNiece I, Hare JM. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell

proliferation and differentiation. *Circ Res*. 2010;107:913–922. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.222703.
32. Malliaras K, Zhang Y, Seinfeld J, Galang G, Tseliou E, Cheng K, Sun B, Aminzadeh M, Marbán E. Cardiomyocyte proliferation and progenitor cell recruitment underlie therapeutic regeneration after myocardial infarction in the adult mouse heart. *EMBO Mol Med*. 2013;5:191–209. doi: 10.1002/emmm.201201737.
33. Suzuki G, Iyer V, Lee TC, Canty JM Jr. Autologous mesenchymal stem cells mobilize cKit+ and CD133+ bone marrow progenitor cells and improve regional function in hibernating myocardium. *Circ Res*. 2011;109:1044–1054. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.245969.
34. Williams AR, Hare JM. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res*. 2011;109:923–940. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.243147.
35. Xie Y, Ibrahim A, Cheng K, Wu Z, Liang W, Malliaras K, Sun B, Liu W, Shen D, Cheol Cho H, Li T, Lu L, Lu G, Marbán E. Importance of cell-cell contact in the therapeutic benefits of cardiosphere-derived cells. *Stem Cells*. 2014;32:2397–2406. doi: 10.1002/stem.1736.
36. Liang HY, Cauduro SA, Pellikka PA, Bailey KR, Grossardt BR, Yang EH, Rihal C, Seward JB, Miller FA, Abraham TP. Comparison of usefulness of echocardiographic Doppler variables to left ventricular end-diastolic pressure in predicting future heart failure events. *Am J Cardiol*. 2006;97:866–871. doi: 10.1016/j.amjcard.2005.09.136.
37. Trenouth RS, Rösch J, Antonovic R, Chaitman BR, Rahimtoola SH. Ventriculography and coronary arteriography in the acutely Ill patient. Complications, extent of coronary arterial disease, and abnormalities of left ventricular function. *Chest*. 1976;69:647–654.
38. Sharma GV, Woods PA, Lindsey N, O'Connell C, Connolly L, Joseph J, McIntyre KM. Noninvasive monitoring of left ventricular end-diastolic pressure reduces rehospitalization rates in patients hospitalized for heart failure: a randomized controlled trial. *J Card Fail*. 2011;17:718–725. doi: 10.1016/j.cardfail.2011.04.014.
39. Spevack DM, Karl J, Yedlapati N, Goldberg Y, Garcia MJ. Echocardiographic left ventricular end-diastolic pressure volume loop estimate predicts survival in congestive heart failure. *J Card Fail*. 2013;19:251–259. doi: 10.1016/j.cardfail.2013.02.003.

CHAPITRE 6 : EVALUATION DE LA FAISABILITE ET DE L'EFFICACITE DE L'ADMINISTRATION DES EXOSOMES DERIVES DES CDCS

Ce travail a fait l'objet de la publication suivante :

Gallet R, Dawkins J, Valle J, Simsolo E, de Couto G, Middleton R, Tseliou E, Luthringer D, Kreke M, Smith RR, Marban L, Ghaleh B, Marban E. Exosomes secreted by cardiosphere-derived cells reduce scarring, attenuate adverse remodeling and improve function in acute and chronic porcine myocardial infarction. **Eur Heart J. 2017 Jan 14;38(3):201-211**.

1. Contexte

Après avoir évalué l'intérêt potentiel des cardiosphères, nous avons voulu confirmer l'implication des exosomes dans les effets de la thérapie cellulaire et évaluer leur potentiel intérêt dans une étude pré-clinique. Comme décrit précédemment, les exosomes ont un rôle majeur dans les effets de la thérapie cellulaire et l'administration des exosomes seuls pourrait remplacer l'administration des cellules. Les exosomes pourraient avoir des avantages majeurs par rapport aux cellules. Le premier avantage est immunologique ; en effet, les exosomes pourraient être moins immunogène dans le cas de la thérapie allogénique et, ainsi, envisager des administrations répétées. Le deuxième avantage concerne la manufacture. En effet, les exosomes sont des particules résistantes dont la conservation est probablement beaucoup plus aisée que celle des cellules, permettant ainsi d'en faire une utilisation rapide et non programmée. Enfin, la compréhension de l'implication des exosomes dans la thérapie cellulaire pourrait amener à une modification du profil et de la composition des exosomes pour augmenter leur efficacité.

2. Objectifs

Les exosomes bien que prometteurs, n'ont jamais été évalués dans un modèle de gros animal et les fondements de leur mode d'administration restent à préciser. Les exosomes étant des particules nanométriques, la voie intra-coronaire pourrait ne pas être la plus adaptée à leur administration car les exosomes sont potentiellement trop petits pour être piégés dans la microcirculation coronaire.

Les objectifs de cette étude sont donc de s'assurer :

1. de la faisabilité de l'administration des exosomes par voie per-cutanée et de la dose à utiliser ;

2. de leur efficacité dans la cardioprotection ;

3. de leur efficacité dans la prévention du remodelage inverse.

3. Plan expérimental

Nous avons donc testé sur 2 modèles d'infarctus chez le porc (modèle aigu d'ischémie reperfusion et modèle d'infarctus constitué remodelant) la faisabilité et l'efficacité de l'administration des exosomes dérives de CDCs.

Comme illustré dans la figure 26, nous avons donc d'abord décidé de comparer les voies intra-coronaires et intra-myocardiques pour l'administration des exosomes dans un modèle d'infarctus aigu mimant le post-conditionnement cellulaire. Dans un deuxième temps, nous avons réalisé une étude randomisée contrôlée contre placebo dans laquelle nous avons évalué l'effet des exosomes administrés par voie trans-endocardique par le système NOGA. Pour cette étude, le modèle utilisé a été celui de l'infarctus constitué visant à mettre en évidence la régénération cardiaque.

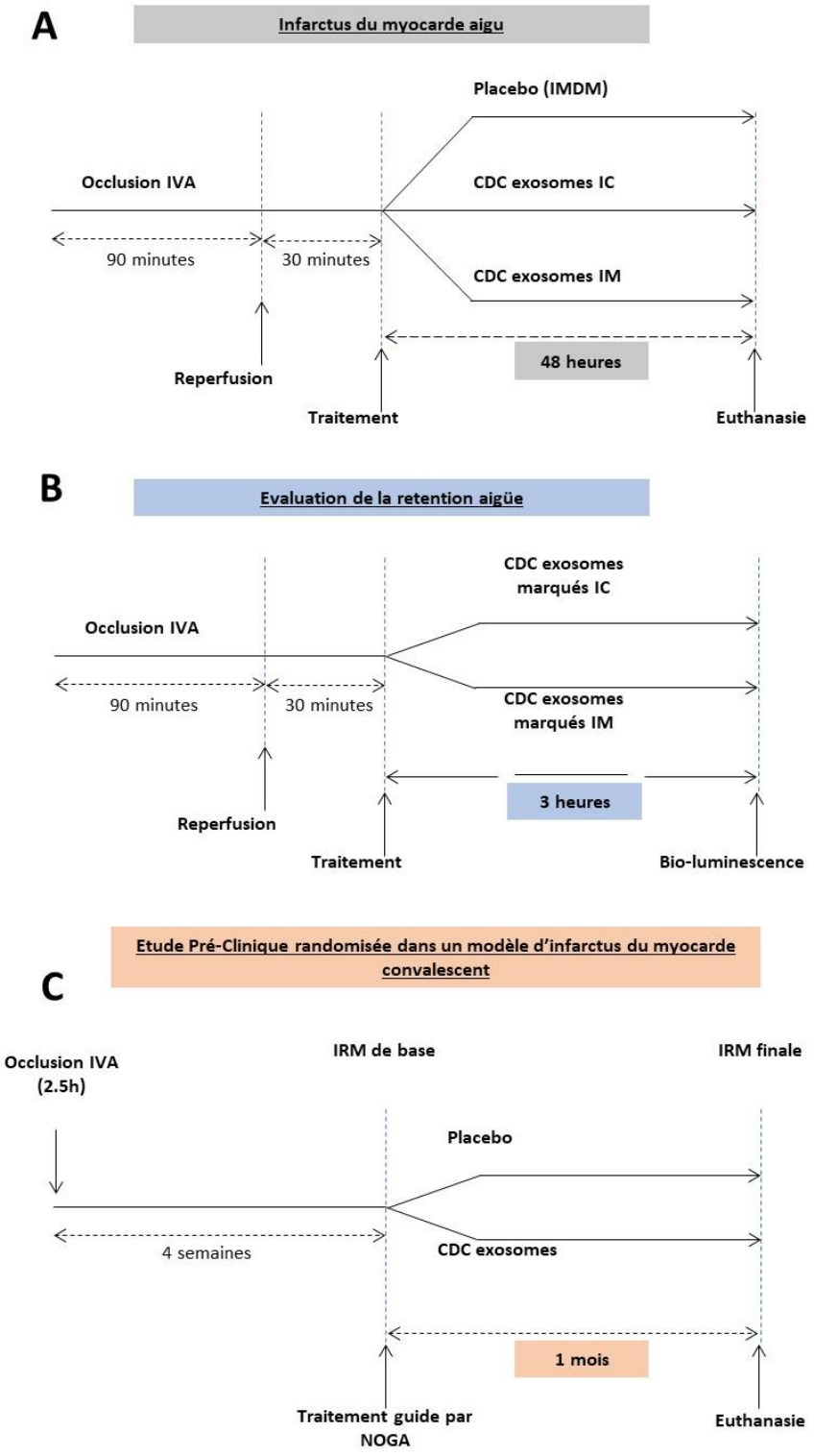


Figure 26 : Plan experimental des études ayant évalué les exosomes. (A) : Validation de la voie d'administration dans un modèle d'infarctus aigu. (B) Etude de la rétention des exosomes dans un modèle d'infarctus aigu. (C) Etude pré-clinique randomisée dans un modèle d'infarctus constitué. (IVA : artère inter-ventriculaire antérieure ; CDC : cardiosphere derived cells ; IC : intra-coronaire ; IM : intra-myocardique ; IRM : imagerie par résonnance magnétique).

4. Résultats

4.1. Caractérisation des exosomes

Un échantillon représentatif de la distribution des exosomes est illustré sur la Figure 27A. Un milligramme de protéine contenait $2.2x10^{11}$ particules dont le diamètre moyen était de 192±17 nm (Figure 27B et C). Ce diamètre était plus important que celui habituellement mesuré en raison de l'utilisation du système pour compter des exosomes normalement hydratés (alors qu'ils sont habituellement désydratés) et en raison de la formation occasionnelle d'amas.

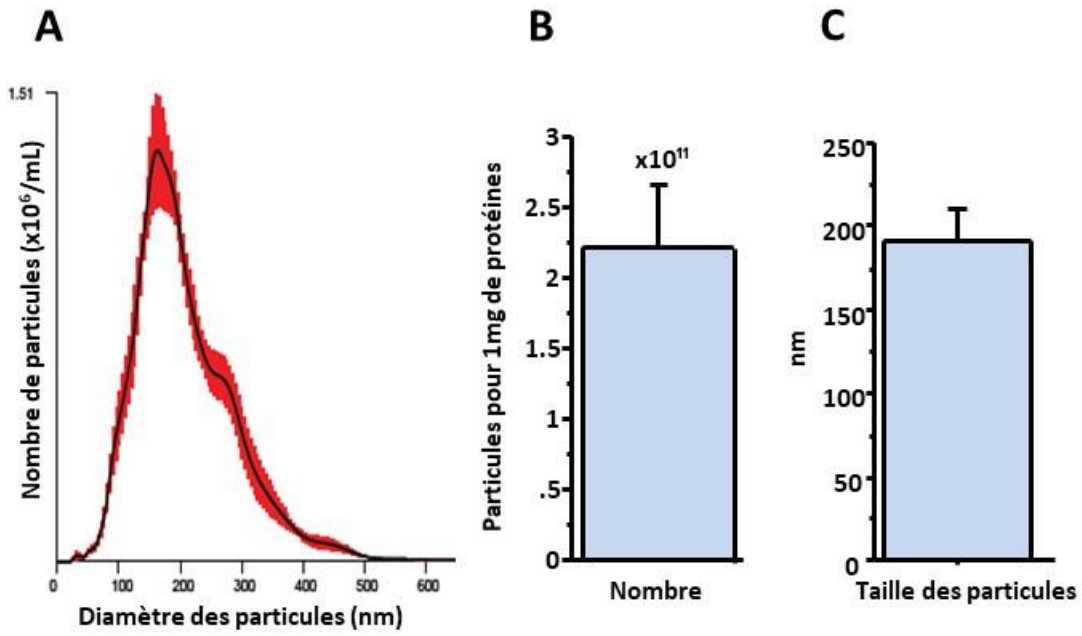


Figure 27 : (A) Histogramme représentatif du diamètre des particules mesuré par le système de détection de particule Nanosight®. Valeurs du nombre (B) et de la taille (C) des particules pour 1mg de protéines.

4.2. Phase aiguë d'infarctus

4.2.1. Exosomes, taille d'infarctus et fonction ventriculaire gauche

La figure 28A illustre des images représentatives de la zone à risque, l'obstruction micro-vasculaire et la taille de l'infarctus observées chez des animaux traités avec le placebo, des exosomes injectés par voie intra-coronaire et des exosomes administrés par voie intra-myocardique. L'étendu de l'agression ischémique initiale était identique dans les 3 groupes avec une taille de zone à risque rapportée à la taille du ventricule gauche similaire dans les 3 groupes (21+4% du ventricule gauche, P=0,49, Figure 28B). Quarante-huit heures après le traitement, l'étendue de la zone d'obstruction micro-vasculaire rapportée à la taille de la zone à risque était de 58±6% chez les animaux contrôles alors qu'elle n'était que de 43+6% (P =0,03 vs contrôle) dans le groupe exosomes intra-coronaires et de 33+14% (P=0,001 vs contrôle) dans le groupe exosomes intra-myocardiques (Figure 28C). Cependant, la taille de l'infarctus (rapportée à la taille de l'aire à risque) n'était diminuée que chez les porcs recevant des exosomes par voie intra-myocardiques (80+5% chez les contrôles vs respectivement 77+5% et 61+12% dans les groups exosomes intra-coronaire et exosomes intra-myocardiques, P=0,001, Figure 28D).

De manière cohérente, alors que les volumes ventriculaires télé-systoliques et télé-diastoliques ainsi que la fraction d'éjection du ventricule gauche étaient identiques entre les 3 groupes avant le traitement, ces paramètres n'étaient préservés que chez les animaux recevant des exosomes par voie intra-myocardique ; dans les groupes contrôle et exosomes intra-coronaire, les volumes augmentaient et la fraction d'éjection diminuait (Figure 28E-G).

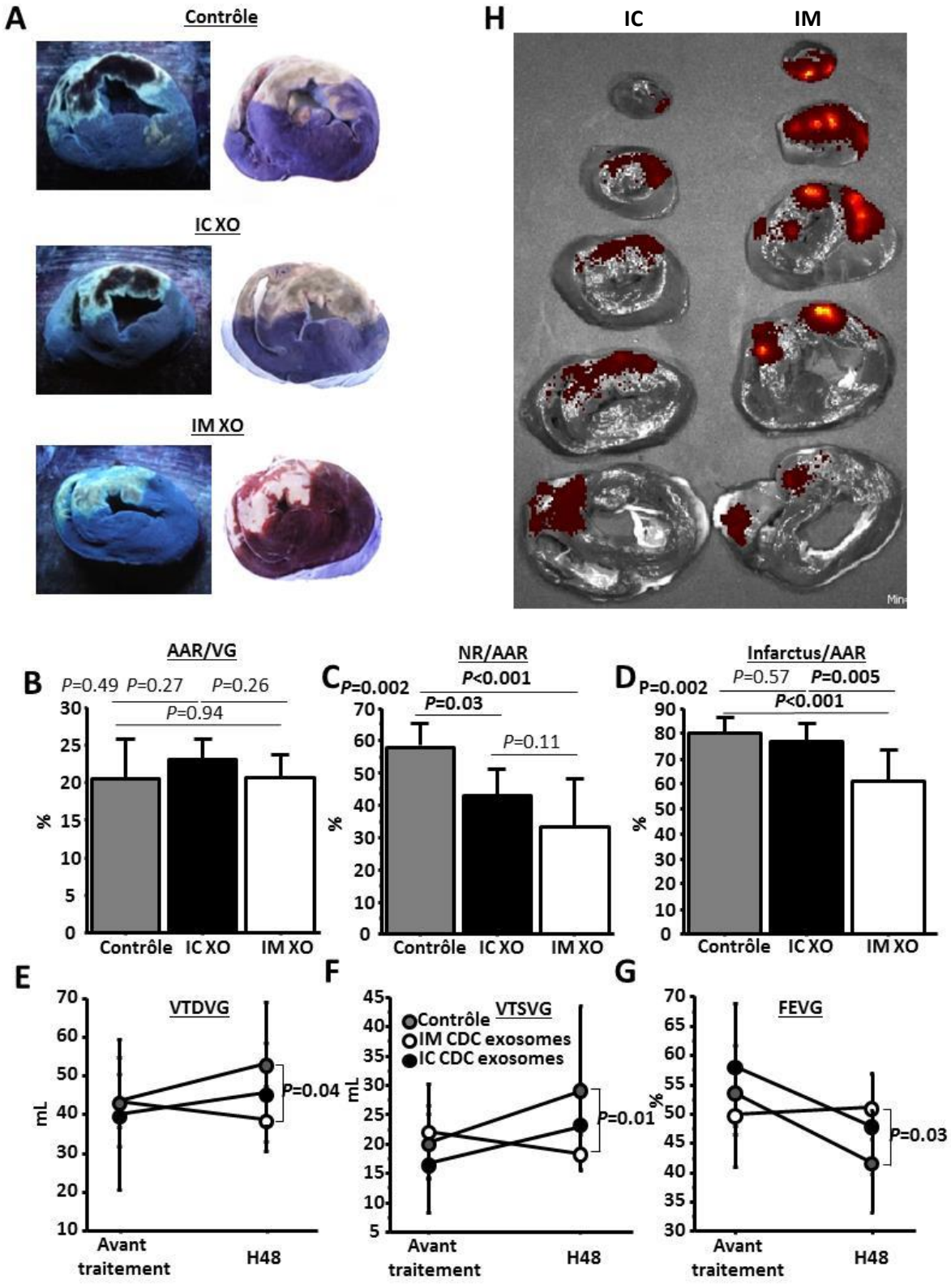


Figure 27 : Etude en phase aiguë d'infarctus. (A) Images représentatives de section myocardique visualisée sous lumière ultra-violette (après injection de thioflavine) et après marquage au TTC dans les 3 groupes. Les aires à risques (AAR) sont identiques dans les 3 groupes (B). Les exosomes administrés par voie intra-coronaire et intra-myocardique

diminuent le no-reflow (NR, C) alors que seuls les exosomes injectés par voie intra-myocardique diminuent la taille de l'infarctus (D). Les exosomes administrés par voie intra-myocardique mais pas par voie intra-coronaire préservent les volumes ventriculaires gauches télé-diastolique (VTDVG, E) et télé- systolique (VTSVG, F) ainsi que la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG, G). Le suivi par bioluminescence de la distribution d'exosomes marqués avec un traceur infra-rouge (H) montre une intensité de signal plus importante avec la voie intra-myocardique (panneau de droite) qu'avec la voie intra-coronaire (panneau de gauche). Valeur de P pour la comparaison des 3 groupes en haut à gauche de chaque figure ; valeur de P pour les comparaisons de groupes 2 à 2 en regard des barres.

Afin de déterminer si la diminution de la taille de l'infarctus et la préservation de la fonction ventriculaire gauche étaient liées à une diminution de l'apoptose et de l'inflammation, ces 2 phénomènes ont été analysés histologiquement par un immuno-marquage respectivement TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) et CD45+. Le marquage TUNEL (Figure 28A) a mis en évidence une diminution importante de la proportion de cardiomyocytes apoptotiques chez les animaux du groupe exosomes intra-myocardiques comparativement aux contrôles et au groupe exosomes intra-coronaires. Cette diminution de l'apoptose était observée aussi bien dans la zone infarcie (Figure 28B) que dans la zone bordante (Figure 28C). En parallèle, l'analyse du marquage au CD45 (Figure 28D), a révélé une diminution de l'infiltration leucocytaire dans les zones infarcie (Figure 28E) et bordante (Figure 28F) des porcs traités par exosomes intra-myocardiques comparés aux porcs contrôles et exosomes intra-coronaires.

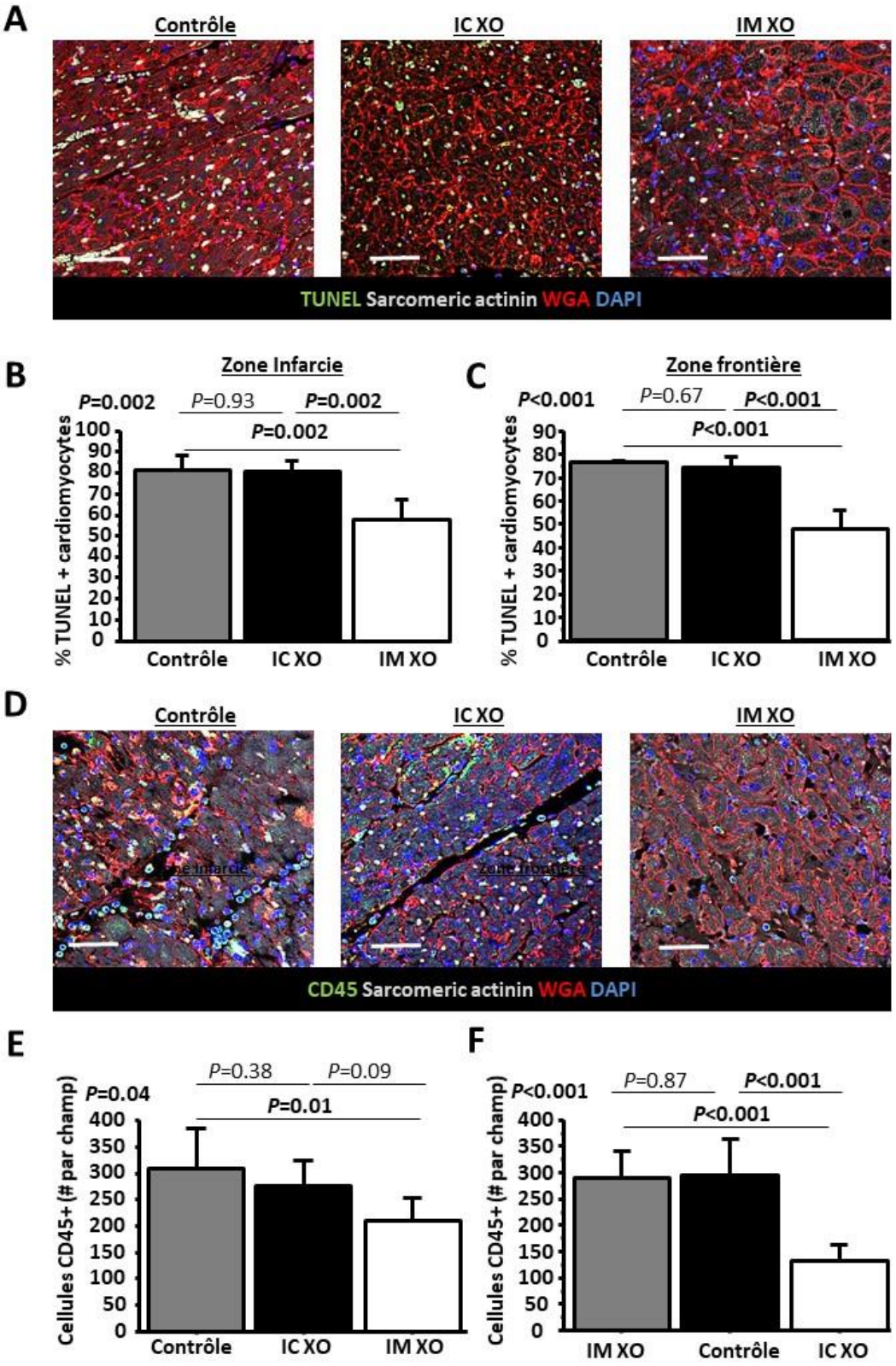


Figure 28 : Etude en phase aiguë d'infarctus : apoptose et inflammation. (A) Images représentatives du marquage TUNEL mettant en évidence l'apoptose chez un animal contrôle, un animal traité par exosomes intra-coronaire (IC XO) et un animal traité par

exosomes intra-myocardiques (IM XO) (zone bordante). (B) l'apoptose est diminuée dans les zones infarcie (B) et bordante (C) chez les animaux traités par voie intra-myocardique comparés au placebo et aux animaux traités par voie intra-coronaire. (D) Images représentatives du marquage CD45 mettant en évidence l'infiltration leucocytaire chez un animal contrôle, un animal traité par exosomes intra-coronaire et un animal traité par exosomes intra-myocardiques (zone bordante). L'infiltration leucocytaire est diminuée dans les zones infarcie (E) et bordante (F) chez les animaux traités par voie intra-myocardique comparés au placebo et aux animaux traités par voie intra-coronaire. Valeur de P pour la comparaison des 3 groupes en haut à gauche de chaque figure ; valeur de P pour les comparaisons de groupes 2 à 2 en regard des barres.

4.2.2. Rétention des exosomes

Après avoir établi que la délivrance des exosomes par voie-intramyocardique était supérieure à celle observée par voie intra-coronaire, nous avons émis l'hypothèse que cette supériorité pouvait être en rapport avec une meilleure rétention des exosomes dans le myocarde après leur injection. Pour vérifier cette hypothèse, un infarctus a été réalisé chez 2 porcs ; 30 minutes après le début de la reperfusion, les 2 animaux ont reçu des doses identiques d'exosomes marqués, par voie intra-coronaire pour l'un et par voie intra-myocardique pour l'autre. Trois heures plus tard, les cœurs ont été prélevés et observés simultanément par bioluminescence. La figure 27H illustre les résultats de cette imagerie. Comme suspecté, l'intensité du signal était nettement plus importante après injection intra-myocardique qu'après injection intra-coronaire, confortant l'idée que la plus grande efficacité des exosomes par voie intra-myocardique est liée à une meilleur rétention au niveau myocardique.

4.3. Etude d'efficacité randomisée pré-clinique sur un modèle d'infarctus constitué

Ayant démontré dans le modèle aigu de la supériorité de l'administration intra-myocardique des exosomes sur l'administration intra-coronaire, nous avons choisi une administration intra-myocardique trans-endocardique pour la réalisation de l'étude d'efficacité randomisée pré-clinique sur un modèle d'infarctus constitué remodelant. Dans cette étude, les animaux ont reçu à un mois post infarctus une administration de placebo ou d'exosomes dérivés de CDCs par voie trans-endocardique grâce au système de cartographie et d'injection NOGA.

4.3.1. Sécurité et faisabilité de l'injection des exosomes guidée par NOGA

Une cartographie complète du ventricule gauche a été obtenue chez tous les animaux sans complication (Figure 29A). Chez l'animal injecté avec du violet de gentiane afin d'évaluer la validité des seuils utilisés, le colorant s'est localisé à la jonction entre les zones saine et infarcie, ce qui était l'objectif (Figure 29B). Durant les injections, 2 animaux injectés avec le placebo et 1 animal injecté avec les exosomes ont présenté un passage en

tachycardie ventriculaire soutenu. Ces 3 arythmies ont été réduites avec succès par cardioversion avec retour en rythme sinusal après 1 seul choc électrique externe. Au final, tous les animaux ont pu recevoir toutes les injections du traitement prévu.

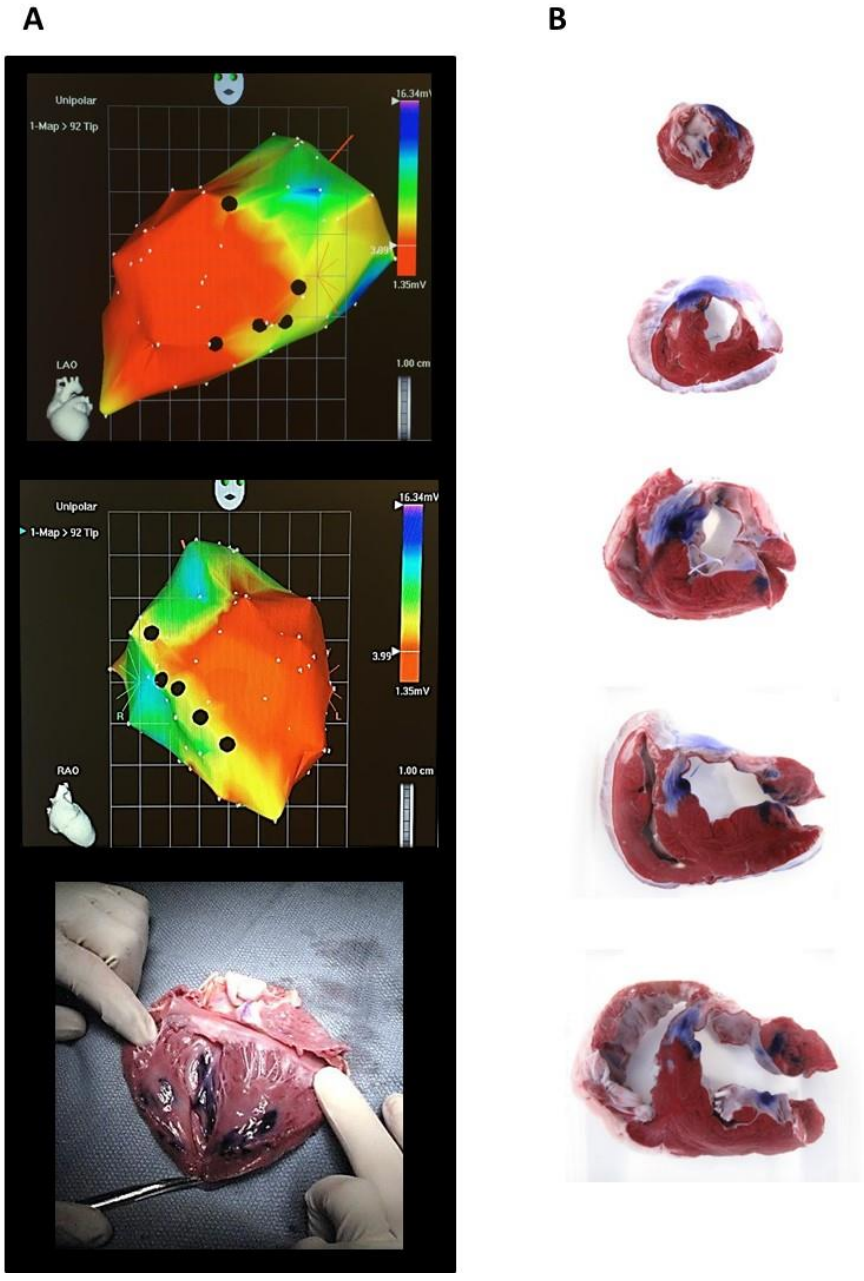


Figure 29 : Etude randomisée dans un modèle d'infarctus constitué. (A) Image représentative d'une cartographie NOGA. Les points noirs représentent les sites d'injection. (B) Localisation de colorant au niveau de la zone bordante de la zone infarcie, validant la technique d'injection.

4.3.2. Préservation des volumes et de la fonction ventriculaire gauche

Comme l'illustre la Figure 30A, l'analyse des données a mis en évidence une augmentation significative des volumes ventriculaires chez les animaux traités par le placebo qui n'était pas retrouvée chez les animaux traités par les exosomes, indiquant une atténuation du remodelage inverse chez ces derniers (Figure 30B). En parallèle, la fraction d'éjection du ventricule gauche était plus élevée dans le groupe exosomes que dans le groupe placebo à 1 mois après traitement, alors que les valeurs de fraction d'éjection étaient identiques avant traitement (Figure 30B-D). Pour renforcer ces données, nous avons analysé la fonction ventriculaire gauche par mesure de la déformation circonférentielle par détection de pixels (Figure 30E). Comme pour la fraction d'éjection, nous avons observé que la déformation myocardique diminuait chez les animaux contrôles à 1 mois, alors qu'elle était préservée chez les animaux traités par exosomes (Figure 30F-H).

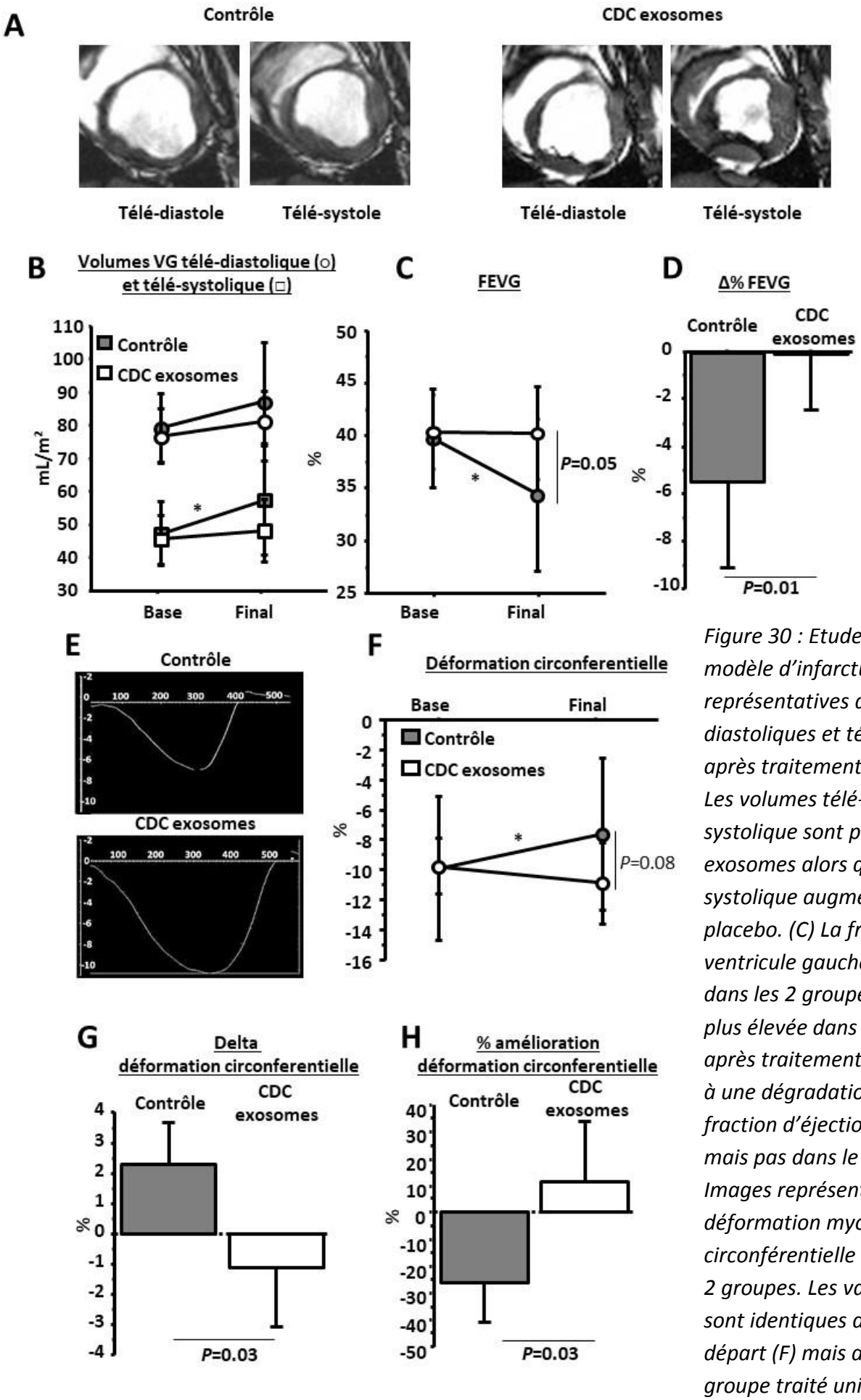


Figure 30 : Etude randomisée dans un modèle d'infarctus constitué (A) Images représentatives de coupes IRM télé-diastoliques et télésystoliques avant et après traitement dans les 2 groupes. (B) Les volumes télé-diastolique et télé systolique sont préservés dans le groupe exosomes alors que le volume télé-systolique augmente dans le groupe placebo. (C) La fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG) est identique dans les 2 groupes avant traitement mais plus élevée dans le groupe exosomes après traitement. Cette différence est liée à une dégradation significative de la fraction d'éjection dans le groupe placebo mais pas dans le groupe exosomes (D). (E) Images représentatives des courbes de déformation myocardique circonférentielle après traitement dans les 2 groupes. Les valeurs de déformation sont identiques dans les 2 groupes au départ (F) mais augmentent dans le groupe traité uniquement (variation absolue (G), variation relative (H)).

4.3.3. Réduction de la cicatrice d'infarctus

La masse de la cicatrice d'infarctus a tout d'abord été mesurée par analyse des séquences IRM de rehaussement tardif (Figure 31A). Avant traitement, la masse de la cicatrice et sa taille par rapport au ventricule gauche étaient identiques dans les 2 groupes (Figure 31B-C). En revanche, après traitement, elles diminuaient dans le groupe exosomes mais pas dans le groupe placebo, aboutissant à une masse de tissu cicatriciel significativement plus faible dans le groupe exosomes (8,8+1,7 g dans le groupe exosomes contre 11,8+2,1 g dans le groupe contrôle, P=0.03, Figure 31B-C). De plus, la masse viable tendait à augmenter dans le groupe exosomes mais pas dans le groupe contrôle (Figure 31D). Pour confirmer les résultats observés en IRM, une analyse histologique de la taille de l'infarctus a été réalisé par marquage au TTC après l'euthanasie des animaux et le prélèvement des cœurs. La figure 32A illustre l'ensemble des sections obtenues pour un cœur de porc traité par le placebo et pour un porc traité par exosomes. La réduction de la cicatrice d'infarctus visible sur ces images a été confirmée par l'analyse des valeurs des 2 groupes. En effet, après traitement par exosomes, la masse de la cicatrice tendait à être inférieure (Figure 32B) et sa proportion par rapport au ventricule gauche (Figure 32C) ainsi que sa transmuralité (Figure 32D) étaient significativement plus petits qu'après traitement par le placebo. En parallèle, une augmentation non significative de la masse viable était observée dans le groupe exosomes (Figure 32 E), la non significativité pouvant être en rapport avec l'analyse relativement précoce après traitement (1 mois), cette période n'étant pas nécessairement suffisante pour observer une augmentation importante de masse viable.

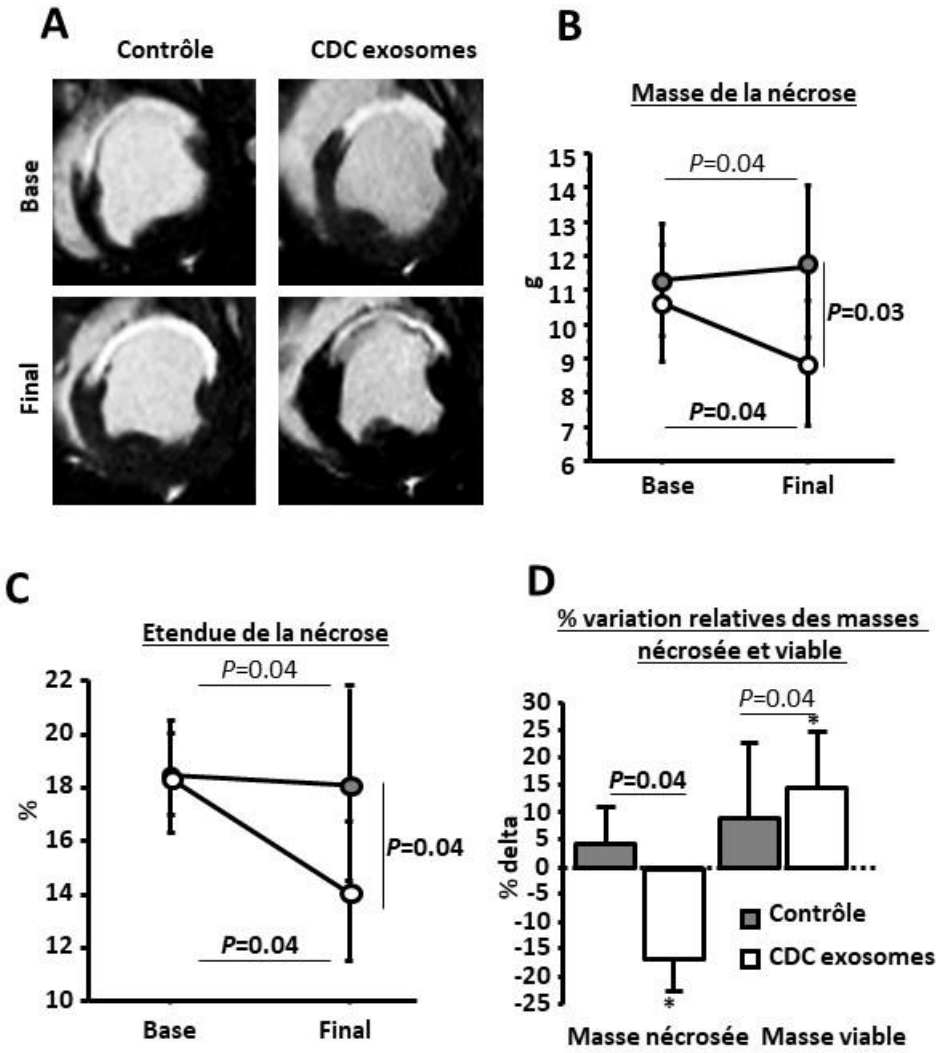


Figure 31 : Etude randomisée dans un modèle d'infarctus constitué. (A) Image représentative de séquences IRM de rehaussement tardif avant et après traitement chez un animal traité par placebo et un animal traité par exosomes. La masse (B) et l'étendue (C) de la nécrose sont identiques dans les 2 groupes avant traitement puis diminuent dans le groupe exosomes mais pas dans le groupe placebo. Dans le groupe exosomes, la diminution relative de masse nécrosée est associée à une augmentation de masse viable (D).

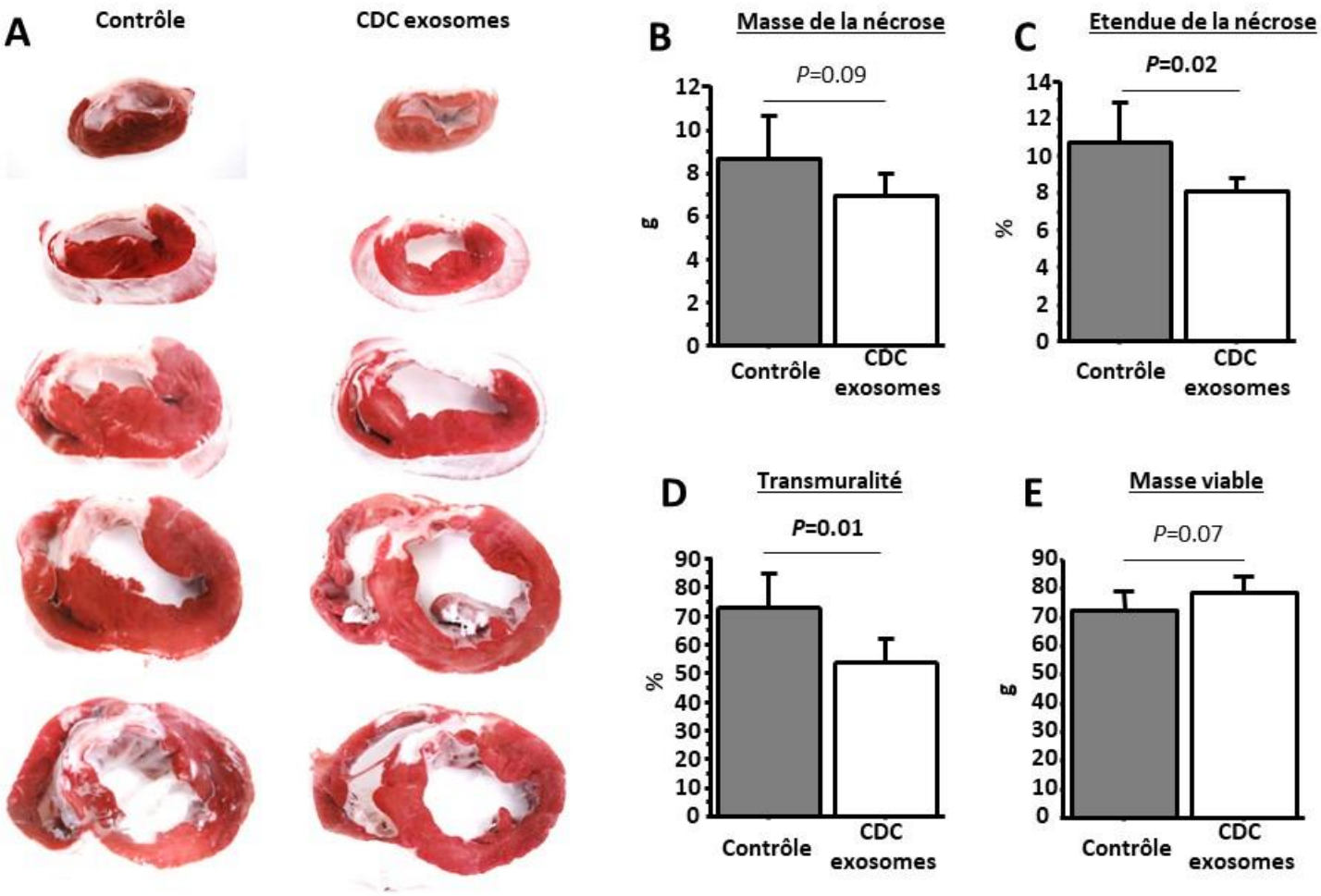


Figure 32 : Etude randomisée dans un modèle d'infarctus constitué. (A) Images représentatives de l'ensemble des sections de cœurs d'un animal traité par placebo et d'un animal traité par exosomes. La masse de la nécrose tend à être inférieure et son l'étendue (C) et sa transmuralité (D) sont significativement inférieures dans le groupe exosomes à 1 mois post-traitement, alors que la masse viable tend à être plus importante (E).

4.3.4. Histologie : fibrose, architecture et angiogenèse

En plus de cette réduction macroscopique de la cicatrice d'infarctus nous avons recherché une diminution de la fibrose des zones infarcies et bordantes mais également de la fibrose de la zone non infarcie, la fibrose de cette zone étant liée au remodelage inverse. L'analyse a montré que la fibrose tissulaire était diminuée non seulement dans la zone infarcie, mais également dans les zones bordante et non infarcie (Figure 33A-D). Ces résultats suggèrent que les exosomes n'ont pas uniquement une action au site d'injection mais également une action anti-fibrosante plus globale, celle-ci pouvant être en rapport soit

avec la diminution du remodelage inverse soit avec une action à distance des exosomes. Nous avons dans un deuxième temps analysé la taille des cardiomyocytes par mesure de leur surface transversale, afin d'éliminer la possibilité que la diminution de fibrose soit en rapport avec une hypertrophie compensatrice des cardiomyocytes dans un contexte de remodelage important. Nous avons observé que les cardiomyocytes des animaux traités par les exosomes n'étaient non seulement pas plus gros, mais qu'ils étaient même significativement plus petits au niveau de la zone péri-infarctus (Figure 33E-G) suggérant qu'outre la diminution de la fibrose, les exosomes étaient responsables d'une atténuation de l'hypertrophie cardiomyocytaire, ces deux phénomènes s'intégrant dans une diminution globale du remodelage inverse, bien qu'il ne soit pas possible de complétement éliminer la présence de cardiomyocytes plus petits en rapport avec la genèse de nouveaux cardiomyocytes.

Etant donné les propriétés pro-angiogéniques des CDCs, nous avons émis l'hypothèse que les exosomes qu'elles secrètent ont probablement les mêmes propriétés. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons mesuré la densité artériolaire dans les zones infarcies, bordantes et non infarcies (Figure 33H). Comme suspecté, nous avons observé un plus grand nombre d'artérioles dans les régions infarcies et bordantes des animaux traités par exosomes comparativement aux animaux contrôles (Figure 33I-J). En revanche, aucune différence n'a été observée dans la région non infarcie (Figure 33K).

Enfin, pour confirmer la synthèse de nouveaux cardiomyocytes suggérée par l'augmentation de masse viable et la diminution de la taille des cardiomyocytes, nous avons étudié la prolifération des cardiomyocytes par marquage au Ki67 (Figure 33L). Nous avons observé une augmentation du nombre de cardiomyocytes en division dans la région péri-infarctus des animaux traités par exosomes comparativement aux contrôles (Figure 33M). En revanche, il n'y avait pas de différence au niveau de la zone non infarcie (Figure 33N).

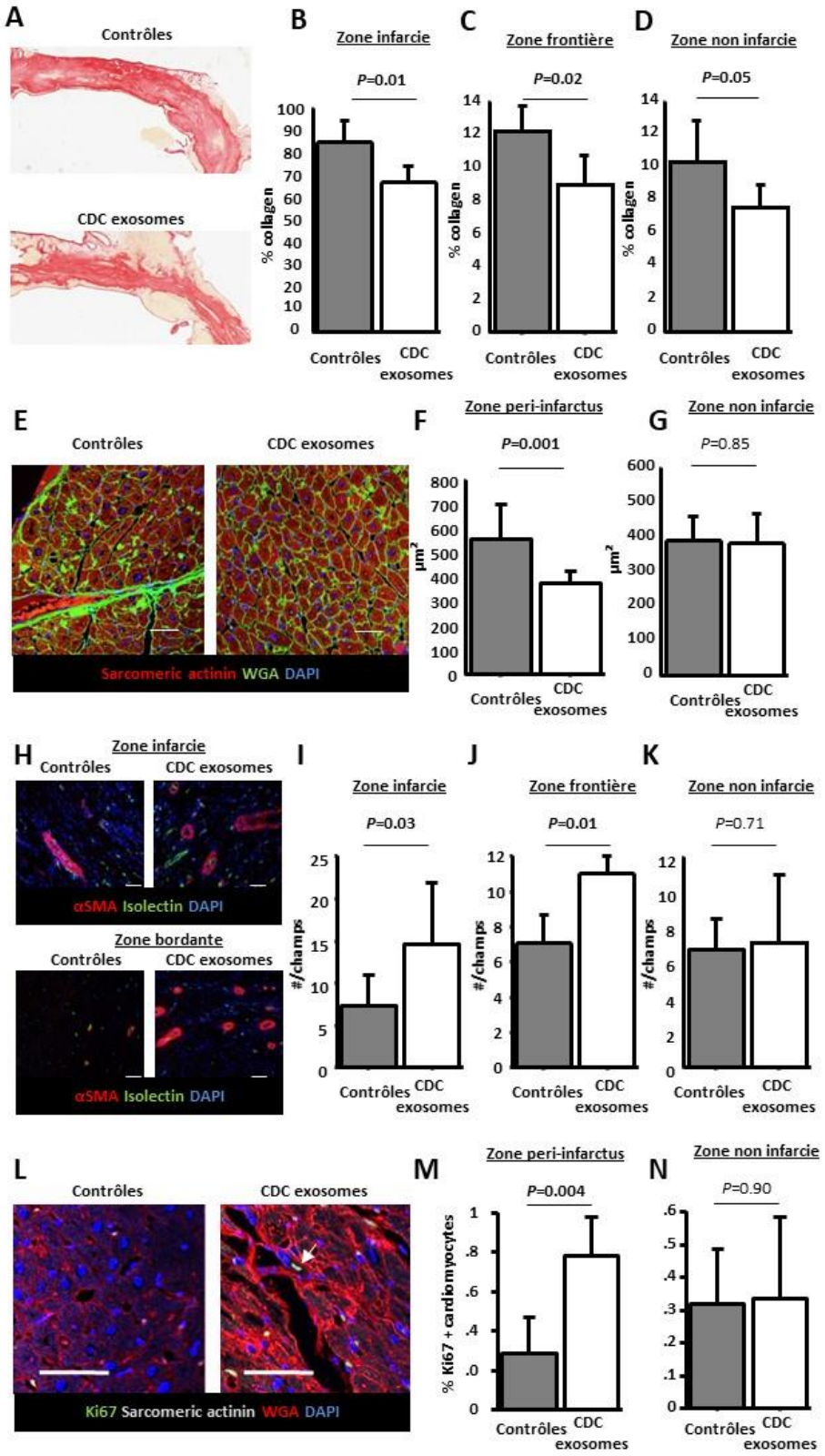


Figure 33 : *Etude randomisée dans un modèle d'infarctus constitué.*

(A) Zone infarcie colorée au rouge Sirius. Le contenu en collagène des zones infarcie (B), bordante (C) et non infarcie (D) est diminuée chez les animaux traités par exosomes.

(E) Surface transverse des cardiomyocytes. La surface des cardiomyocytes de la zone infarcie (F) est diminuée chez les animaux traités par exosomes alors qu'elle ne change pas dans la zone non infarcie (G).

(H) Densité vasculaire dans les zones infarcie et bordante. La densité vasculaire des animaux traités par exosomes et supérieure dans les zones infarcie (I) et bordante (J), mais pas dans la zone non infarcie (K).

(L) Prolifération de cardiomyocytes. La proportion de cardiomyocytes proliférant est supérieure chez les animaux traités par exosomes dans la zone peri-infarctus (M) mais pas dans la zone non infarcie (N).

4.3.5. Immunogénicité

L'importance de la réaction immunitaire tissulaire (infiltration inflammatoire) a été quantifiée après coloration Hématoxyline Eosine Safran. Aucune différence significative n'a été observée entre les animaux recevant le placebo et ceux recevant des exosomes (Figure 34A). Plus important, aucune zone de cardiomyocytes endommagés par cet infiltrat inflammatoire n'a été observée. Concernant la réaction humorale, nous avons mesuré des concentrations d'allo-anticorps plus importante chez les animaux traités par exosomes (Figure 34B). Cependant, tous les animaux (groupes exosomes mais aussi groupe placebo) avaient des anticorps détectables (à un niveau inférieur au contrôle positif). La présence d'anticorps chez des animaux ne recevant pas d'exosomes rend difficile l'interprétation de ces résultats.

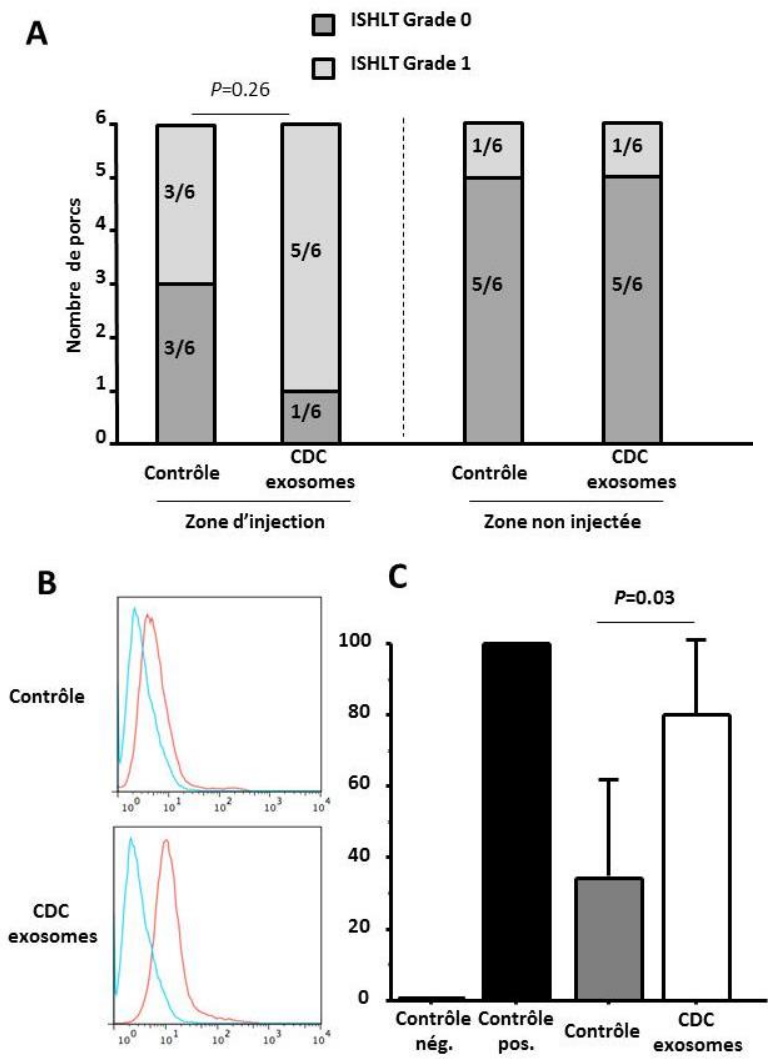


Figure 34 : Etude randomisée dans un modèle d'infarctus constitué. (A) La réaction immunitaire au niveau du site d'injection ainsi que dans la zone non infarcie et non injectée n'est pas différente entre les animaux traités et les animaux contrôles. (B) Données représentatives de la quantification des allo-anticorps circulants (contrôle négatif en bleu, sérum de l'animal en rouge). Des allo-anticorps ont été détectés dans les 2 groupes avec un taux plus élevé dans le groupe exosomes.

4.3.6. Confirmation de l'inefficacité de l'administration intra-coronaire

Enfin, nous avons voulu confirmer que la voie intra-coronaire était également inefficace dans ce modèle. Pour ce faire, un infarctus a été réalisé chez 4 animaux qui ont ensuite été traités par voie intra-coronaire (4 semaines post-infarctus) puis euthanasiés après une IRM finale à 1 mois post-infarctus. Les résultats ont montré une absence de diminution de la taille de l'infarctus dans le groupe traité, associée à une dégradation de la fraction d'éjection comparable à celle du groupe placebo (Figure 35). Ces résultats confirment que l'administration intra-coronaire des exosomes est inefficace, en tout cas dans les conditions choisies pour cette étude.

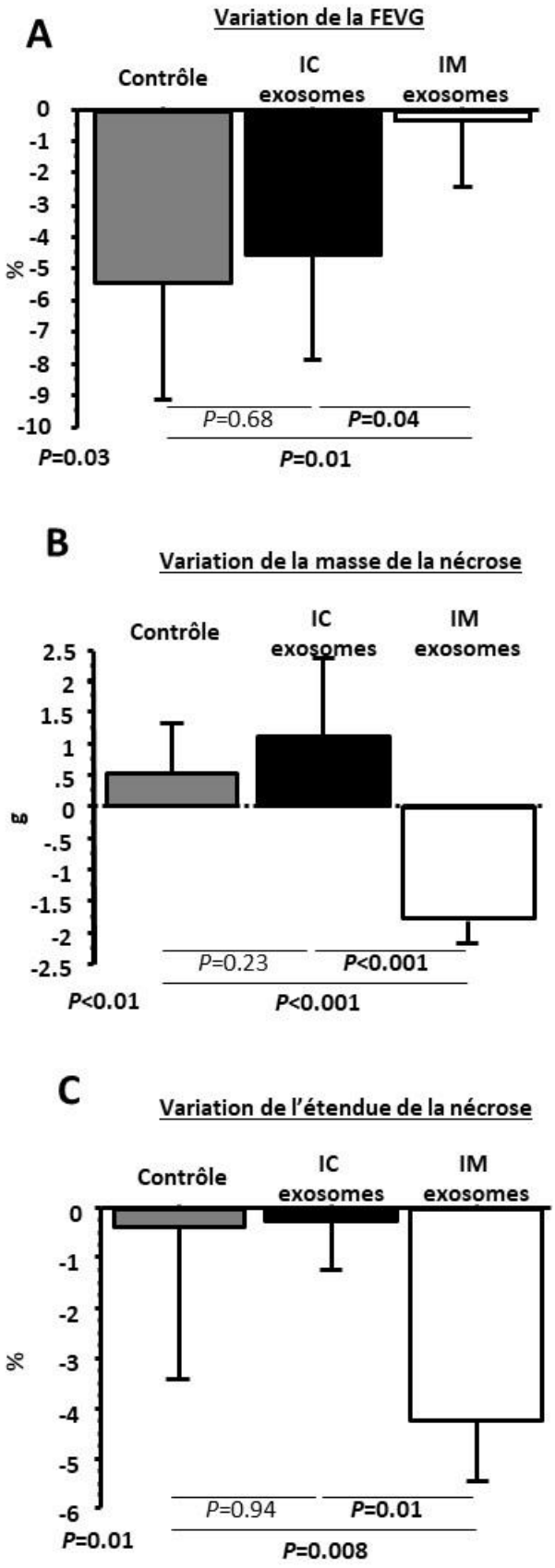


*Figure 35 : Etude randomisée dans un modèle d'infarctus constitué : changement de fonction et d'étendue de la cicatrice. Les variations de de fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG, A), de masse de la cicatrice (B) et d'étendue de la nécrose (C) mesurées par IRM des animaux traités par exosomes intra-coronaires ne sont pas différentes des animaux contrôles. En revanche la FEVG est préservée et la taille ainsi que l'étendue de la nécrose diminuent chez les animaux traités par exosomes intra-myocardiques. * P<0.05 vs. controle et IC exosomes.*

5. Commentaires

Dans ce deuxième travail nous avons étudié l'implication des exosomes dans les effets de la thérapie cellulaire par CDCs et notamment leur capacité à remplacer les CDCs. Pour ce faire, nous avons utilisés deux modèles d'infarctus. Un premier modèle d'infarctus aigu nous a permis d'étudier la voie d'administration et ainsi de démontrer la nécessité d'une injection intra-myocardique pour obtenir un effet. En effet, aucun effet n'était obtenu après injection intra-coronaire probablement en raison de la très petite taille des exosomes responsable d'un passage rapide dans les artères coronaires sans rétention. Ces injections ont cependant été réalisées par voie chirurgicale rendant les possibilités de translation chez l'Homme de ces résultats dans la phase aiguë très limités. Le deuxième modèle étudié a été celui de l'infarctus constitué. Nous avons montré que les exosomes étaient capables de stopper le remodelage inverse et de diminuer la taille de l'infarctus après injection intra-myocardique. Pour ce modèle nous avons utilisé des injections trans-endocardiques après cartographie par le système NOGA, cette technique étant facilement transposable à l'Homme. Encore une fois, l'injection intra-coronaire n'avait pas d'effets. Les résultats en termes d'efficacité dans ces deux modèles mettent en évidence les propriétés anti-inflammatoires, anti-fibrotiques et pro-angiogéniques des exosomes, ces propriétés étant comparables à celles des CDCs. Les résultats dans ces deux modèles ajoutent des preuves quant à l'implication des exosomes dans les effets de la thérapie cellulaire et ouvrent la porte à des études chez l'Homme utilisant ces produits acellulaires.

European Heart Journal Advance Access published September 27, 2016

European Heart Journal
doi:10.1093/eurheartj/ehw240

BASIC SCIENCE

Exosomes secreted by cardiosphere-derived cells reduce scarring, attenuate adverse remodelling, and improve function in acute and chronic porcine myocardial infarction

Romain Gallet[1,2*†], James Dawkins[1†], Jackelyn Valle[1], Eli Simsolo[1], Geoffrey de Couto[1], Ryan Middleton[1], Eleni Tseliou[1], Daniel Luthringer[1], Michelle Kreke[1,3], Rachel R. Smith[3], Linda Marbán[1,3], Bijan Ghaleh[2], and Eduardo Marbán[1*]

[1]Cedars-Sinai Heart Institute, 8700 Beverly Boulevard, Los Angeles, CA 90048, USA; [2]Inserm, U955, Equipe 03, F-94000 Créteil, France; and [3]Capricor Inc., Los Angeles, CA, USA

Received 30 October 2015; revised 12 April 2016; accepted 20 May 2016

Aims Naturally secreted nanovesicles known as exosomes are required for the regenerative effects of cardiosphere-derived cells (CDCs), and exosomes mimic the benefits of CDCs in rodents. Nevertheless, exosomes have not been studied in a translationally realistic large-animal model. We sought to optimize delivery and assess the efficacy of CDC-secreted exosomes in pig models of acute (AMI) and convalescent myocardial infarction (CMI).

Methods and results In AMI, pigs received human CDC exosomes (or vehicle) by intracoronary (IC) or open-chest intramyocardial (IM) delivery 30 min after reperfusion. No-reflow area and infarct size (IS) were assessed histologically at 48 h. Intracoronary exosomes were ineffective, but IM exosomes decreased IS from 80 ± 5% to 61 ± 12% ($P = 0.001$) and preserved left ventricular ejection fraction (LVEF). In a randomized placebo-controlled study of CMI, pigs 4 weeks post-myocardial infarction (MI) underwent percutaneous IM delivery of vehicle ($n = 6$) or CDC exosomes ($n = 6$). Magnetic resonance imaging (MRI) performed before and 1 month after treatment revealed that exosomes (but not vehicle) preserved LV volumes and LVEF (−0.1 ± 2.2% vs. −5.4 ± 3.6%, $P = 0.01$) while decreasing scar size. Histologically, exosomes decreased LV collagen content and cardiomyocyte hypertrophy while increasing vessel density.

Conclusion Cardiosphere-derived cell exosomes delivered IM decrease scarring, halt adverse remodelling and improve LVEF in porcine AMI and CMI. While conceptually attractive as cell-free therapeutic agents for myocardial infarction, exosomes have the disadvantage that IM delivery is necessary.

Keywords Exosomes • Cell therapy • Myocardial infarction • Animal models

Translational perspective

Exosomes secreted by cardiosphere-derived cells (CDCs) were studied as a therapy for myocardial infarction (MI). In two different porcine models, exosomes from CDCs limited injury when given acutely and halted adverse remodelling when given in convalescent MI. Both models showed decreased scarring and improved function with intramyocardial delivery of exosomes. Cardiosphere-derived cell-secreted exosomes are a promising cell-free therapy for MI.

* Corresponding author. Tel: +1 310 423 7557, Fax: +1 310 423 7637, Email: eduardo.marban@cshs.org
† These authors contributed equally to the manuscript.

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2016. For permissions please email: journals.permissions@oup.com.

Downloaded from http://eurheartj.oxfordjournals.org/ by guest on September 27, 2016

Introduction

Despite the fact that outcomes following myocardial infarction (MI) have improved in the era of prompt reperfusion, ischaemic heart disease remains the world's leading cause of death.[1,2] To reverse injury post-MI, cardiosphere-derived cells (CDCs) are currently in phase 2 clinical trials with scar reduction as the major endpoint.[3] Cardiosphere-derived cells have been shown to decrease scar mass, increase viable mass, and halt adverse remodelling in multiple animal models and in a phase 1 human study.[4–8] Accumulating evidence indicates that the benefits of CDCs are mediated by the secretion of exosomes.[9,10] These natural nano-scale lipid bilayer vesicles mediate cell–cell communication,[11,12] at least partially by transferring distinctive payloads of microRNAs (miRNAs) and other non-coding RNAs[13] specific to the parent cell type.[14] Cardiosphere-derived cell-secreted exosomes are required for, and themselves recapitulate, the therapeutic benefits of CDCs,[9] as part of a paradigm that seems to be generalizable.[11,15,16] One potential advantage of exosomes over CDCs is that they are acellular and non-replicating, facilitating the development of a stable and reliable 'off-the-shelf' product.

Although exosomes have obvious appeal, they have yet to be tested in clinically realistic large-animal disease models. Even the fundamentals of delivery remain unexplored. As nano-sized particles, exosomes may not be well suited for intracoronary (IC) delivery, as they may not be taken up easily in a first pass. Therefore, we first compared IC and intramyocardial (IM) delivery of CDC-derived exosomes in an acute MI model (in a protocol designed to recruit cellular post-conditioning).[17,18] Next, we performed a randomized placebo-controlled study in which we evaluated IM delivery of CDC-derived exosomes using the NOGA® electro-anatomic mapping system in a pig model of convalescent MI (in a protocol designed to assess therapeutic regeneration).

Methods

For detailed methods, see Supplementary material online. All experiments were performed on unconscious anaesthetized pigs. Pig models of myocardial infarction have been widely validated as reliable models for translational studies.[19]

Cardiosphere-derived cell exosome isolation and characterization

Human CDCs at fifth passage (from a single non-diseased human donor) were grown until confluence in regular CDC culture media,[1] which was then changed to serum-free media. After 15 days, the conditioned serum-free media (containing the exosomes) was collected and filtered through a 450 nm filter. Exosomes were then isolated by ultrafiltration by centrifugation followed by overnight precipitation in 2.5% poly-ethylene glycol (PEG); the media containing PEG was centrifuged for 30 min at 2000 × g and the pellet containing the exosomes was resuspended in IMDM for injection (in 10 mL for intracoronary infusion and in 2 mL for intramyocardial injection). Protein concentration was measured using the Bradford protein assay, and the final suspension was analysed by nanoparticle tracking analysis (NTA, NanoSight Ltd., Amesbury, Wiltshire, UK) to determine particle number and size.

Acute study: delivery

The protocol for the acute study is depicted in Supplementary material online, *Figure S1A*. Closed-chest MIs were created in 22 female adult Yucatan mini-pigs. Thirty minutes after reperfusion, animals were allocated to receive IC exosomes (15 mg [≈33 × 10^{11} particles] infused over 30 min, $n = 6$), IM exosomes (15 mg divided in 10 injections, $n = 4$, then changed to 7.5 mg [≈16.5 × 10^{11} partides], $n = 5$, due to equivalent efficacy, Supplementary material online, *Figure S2B*, so total $n = 9$), or IC vehide as control ($n = 7$) and followed for 48 h. Exosome dosing was extrapolated from previous work in small animals.[10,20] Infarct size (IS), micro-vascular obstruction (MVO), and area at risk (AAR) were determined at 48 h as previously described.[18] Left ventricular function was measured using left ventriculograms before treatment and at 48 h.

Acute extravasation and retention of exosomes following the different delivery methods was studied as shown in Supplementary material online, *Figure S1B*.

Randomized pre-clinical study in a chronic model

Study design and exosome delivery

Study design is shown in Supplementary material online, *Figure S1C*. A closed-chest MI was created in 13 female adult Yucatan mini-pigs as described.[21] Four weeks later 12 animals were randomized to receive vehide (IMDM, $n = 6$) or IM injection of CDC-derived exosomes (7.5 mg protein concentration [≈16.5 × 10^{11} particles], $n = 6$) using the NOGA® cardiac navigation system (Biosense Webster, Inc., Diamond Bar, CA, USA). Animals were then followed for one additional month and euthanized. Magnetic resonance imaging was performed before treatment (baseline) and at 1 month.

To confirm the inefficacy of IC exosomes, 4 additional pigs were infarcted and treated with IC exosomes 4 weeks post-MI (results in see Supplementary material online, *Figure S5*).

Statistical analysis

Continuous variables are presented as mean ± standard deviation in the text and mean ± standard error in the figures. Categorical variables are expressed as an absolute number and a percentage. Independent groups were compared using Mann–Whitney *U* test for two groups and using Kruskal–Wallis test for $n > 2$ groups. Wilcoxon test was used to compare paired groups (changes from baseline). All *P* values are two sided, and a *P* value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

Exosome characterization

Supplementary material online, *Figure S3A* summarizes the CDC exosome isolation process. The number and size of the particles were measured using nanoparticle tracking analysis (NTA, NanoSight Ltd., Amesbury, Wiltshire, UK) (representative raw data on see Supplementary material online, *Figure S3B*). One milligram of proteins contained ~2.2 × 10^{11} particles and the average diameter of the particles was 192 ± 17 nm (see Supplementary material online, *Figure S3C* and *D*). This diameter is larger than what is usually described for exosomes because of the use of nanoparticle tracking analysis on normally hydrated exosomes for measurement.[22,23]

Downloaded from http://eurheartj.oxfordjournals.org/ by guest on September 27, 2016

Acute delivery study

Intramyocardial exosomes but not intracoronary exosomes decrease infarct size and preserve left ventricular function

Figure 1A shows representative images of AAR, MVO, and IS (assessed by Gentian violet, Thioflavin T, and triphenyl tetrazolium chloride (TTC) staining, respectively) each in the control, IC exosome, and IM exosome groups. The extent of the ischaemic injury was similar in the three groups as demonstrated by the identical *I/LV* ratio (21 ± 4% of the LV, $P = 0.49$, *Figure 1B*). Forty-eight hours after treatment, the extent of MVO/AAR was 58 ± 6% in the control group when compared with 43 ± 6% ($P = 0.03$ vs. placebo) in the IC exosome group and 33 ± 14% ($P < 0.001$ vs. control) in the IM exosome group (*Figure 1C*). While MVO decreased in both exosome groups, IS at endpoint was only decreased after IM delivery of exosomes (IS/AAR = 80 ± 5% in control vs. 77 ± 5% and 61 ± 12% in IC exosomes and IM exosomes, respectively, $P = 0.001$, *Figure 1D*). Consistently, despite similar LV end-diastolic, end-systolic volumes, and LVEF before treatment, these parameters were preserved only in the IM exosome group at endpoint; chamber volumes increased, while LVEF decreased, in both the placebo and IC exosome groups (*Figure 1E–G*).

To determine whether the decreased IS and preserved function were related to decreased apoptosis or to decreased inflammatory cell infiltration, these processes were investigated using terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) and CD45 staining respectively. TUNEL (representative images in *Figure 2A*) revealed that the proportion of TUNEL-positive cardiomyocytes was reduced in the IM exosome treated compared with control and IC exosome pigs, a finding that was observed both in the infarct (*Figure 2B*) and borderzones (*Figure 2C*). In parallel, using CD45 staining (representative images, *Figure 2D*), we observed that leukocyte infiltration in the infarct zone (*Figure 2E*) and border (*Figure 2F*) was decreased by IM exosomes but not by IC exosomes compared with placebo.

Exosome retention

Having established that IM delivery of exosomes was superior to IC delivery, we hypothesized that this superior efficacy was related to higher myocardial retention of the exosomes after treatment. For this purpose, two pigs were injected with identical doses of labelled exosomes, one using IC infusion and one by IM injection. Three hours later, the hearts were harvested and imaged simultaneously for bioluminescence. *Figure 1H* shows that signal intensity was much higher after IM injection when compared with IC infusion of exosomes. This finding is consistent with the idea that the increased efficacy of IM exosomes is related to better retention within the heart.

Randomized pre-clinical study

With the acute study demonstrating that IM delivery of exosomes is superior to IC delivery, we proceeded to a randomized pre-clinical study using NOGA®-guided IM delivery of exosomes or placebo.

Safety and feasibility of NOGA®-guided exosome injection

A comprehensive LV map was obtained in all animals without complications. During injection, two pigs injected with vehicle and one pig injected with exosomes experienced sustained ventricular tachycardia and were cardioverted to a normal sinus rhythm. All animals were successfully injected with the assigned treatment.

Preservation of ventricular volumes and function

Figure 3A shows representative magnetic resonance images of the LV at end diastole and end systole in a control and an exosome-treated pig. Systolic function looks better in the exosome-treated animal. Pooled data confirm that LV end-systolic volume significantly increased in controls, but not in exosome-treated animals indicating attenuation of adverse ventricular remodelling (*Figure 3B*); meanwhile, LVEF was higher at endpoint in exosome-treated pigs, despite comparable volumes and LVEF in the two groups at the pre-treatment baseline (*Figure 3B–D*). In addition to LVEF, we further assessed systolic function by global circumferential strain measurements (representative data for the two groups shown in *Figure 3E*). As with LVEF, we observed that circumferential strain decreased in control but not in exosome-treated animals (*Figure 3F–H*).

Scar reduction

Scar mass was first measured by MRI using late-gadolinium enhancement. *Figure 4A* shows representative images from the two groups. At baseline, scar mass and scar size (scar mass/LV mass) were similar in the two groups (*Figure 4B* and *C*). After treatment, however, both scar mass and scar size decreased in the exosome group but not in the CDC group, leading to a smaller scar at endpoint (8.8 ± 1.7 g in the exosomes-treated group vs. 11.8 ± 2.1 g in the control group, $P = 0.03$, *Figure 4B* and *C*). Additionally, viable mass increased in exosome-treated animals but not in controls (*Figure 4D*), consistent with regrowth of myocardium. To check the MRI findings, scar was quantified by TTC staining post-mortem. *Figure 5A* shows heart sections for a control and an exosome-treated pig. The visible reductions in scar were evident in pooled data showing lower scar mass, scar size, and scar transmurality after exosome treatment (*Figure 5B–D*). In addition, we observed a non-significant trend for increased viable mass (measured by histology) in the exosome-treated pigs (*Figure 5E*). Prior work with CDCs in this model has shown that, while scar reductions are typically evident by 1 month, increases in viable mass develop more slowly and are usually significant only after 2 months.[8,24,25]

Histology: fibrosis, architecture, and angiogenesis

In addition to the MI scar, we looked for the evidence of exosome-related changes in remote fibrosis related to global remodelling. Collagen content of the infarcted, border, and remote zones was quantified using picrosirius red staining. Infarcted area from a control and an exosome-treated animal are shown in *Figure 6A*. Quantification revealed that collagen content was decreased not only in the infarct zone but also in the border and remote zones (*Figure 6B–D*). This finding suggests that exosome treatment not only decreased fibrosis at the site of injection but also had a more global anti-fibrotic effect. We also quantified cardiomyocyte cross-sectional area to look for changes in hypertrophy. Cardiomyocytes from the peri-infarct area (border zone and viable area of the infarct zone), but not those in the remote zone, were smaller in exosome-treated pigs (representative images: *Figure 6E*; pooled data: *Figure 6F* and *G*). Thus, in addition to decreased fibrosis, CDC exosomes prevented cardiomyocyte hypertrophy associated with adverse remodelling (although we cannot rule out a contribution of newly generated, smaller myocytes to the overall reductions in cell size).[26]

Downloaded from http://cvaccess.oxfordjournals.org/ by guest on September 27, 2016

Since CDCs have angiogenic properties,[4,21] we hypothesized that exosomes were likely to favour this process. To test this idea, we measured arteriolar density in the infarcted, remote, and border zones (representative pictures for infarct and border area shown in *Figure 6H*). As expected, we observed a higher number of arterioles in both the infarct and border zones of the exosome-treated pigs when compared with control (*Figure 6I–J*). No difference was observed in the remote zone (*Figure 6K*).

To confirm the regrowth of myocardium suggested by the increased viable mass and decreased cardiomyocyte size, we investigated cardiomyocyte proliferation using Ki67 staining (representative pictures shown in *Figure 6L*). We observed an increased proliferation of cardiomyocytes in the peri-infarct zone of exosome-treated pigs compared with control (*Figure 6M*), providing further evidence for regrowth of myocardium. No difference was observed in the remote zone (*Figure 6N*).

Immunogenicity

Histology revealed no significant treatment-related differences in inflammatory infiltrates in the tissue (*Figure 7A*). Importantly, no cardiomyocyte necrosis was observed in any animal. Higher levels of allo-antibodies were observed in CDC exosome-treated animals when compared with placebo (*Figure 7B*). However, all pigs (placebo and CDC exosome treated) had detectable circulating antibodies at lower levels than in the positive control. Therefore, the significance of this finding is uncertain.

Mode of delivery in convalescent myocardial infarction

To verify that IC delivery was inefficacious in CMI, as it had been in AMI, we performed additional experiments (see Supplementary material online, *Figure S5*). Cardiosphere-derived cell exosomes delivered IC did not improve LVEF, scar mass or scar size. These data confirm the generalization that IM delivery of CDC exosomes works well and consistently, but IC delivery does not.

Discussion

Two phase 1 clinical trials of cardiosphere-derived cells have been completed,[5,7,27] and other trials are ongoing for indications ranging

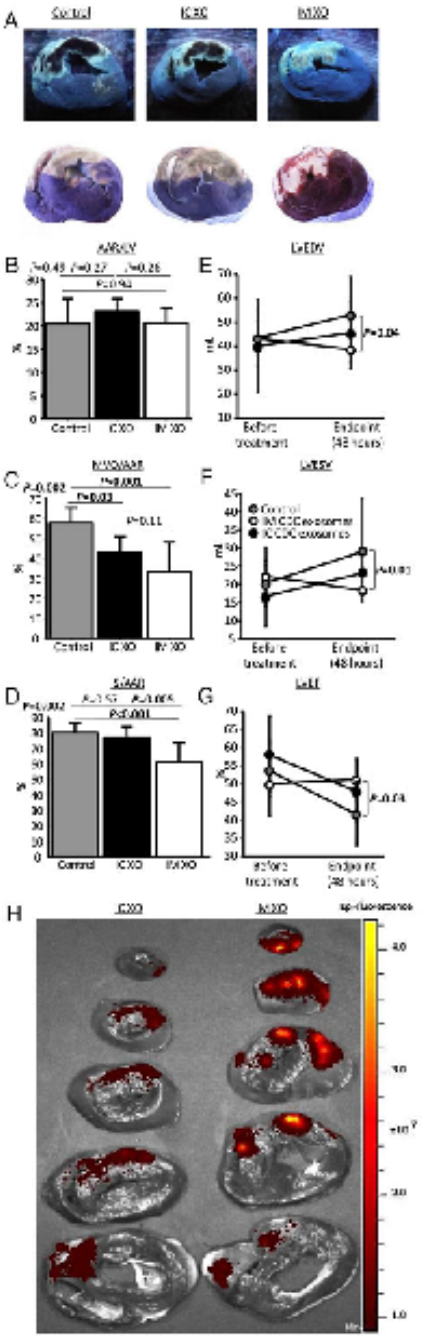


Figure 1 Acute myocardial infarction study: infarct size, microvascular occlusion, and retention. (*A*) Representative images of heart sections under UV-light (top panels) and after TTC staining (bottom panels) in control, intracoronary exosomes, and intramyocardial-treated pigs. Under UV light, micro-vascular obstruction appears dark and area-at-risk fluorescent; after TTC staining, scar appears white and area-at-risk red; non-ischaemic myocardium appears purple. Pooled data show that area-at-risk/left ventricular is similar in the three groups (*B*), both intracoronary and intramyocardial exosomes decrease micro-vascular obstruction compared with control (*C*), and intramyocardial exosomes but not intracoronary exosomes decrease scar size compared with control (*D*). Intramyocardial exosomes (but not intracoronary exosomes) preserve left ventricular end-diastolic (*E*) and end-systolic volume (*F*) and left ventricular ejection fraction. (*H*) Bioluminescence tracking in a heart infused via the intracoronary route with far-red labelled exosomes (left) and another heart that had been injected intramyocardially with exosomes (right); signal intensity is much higher after intramyocardial injection.

Downloaded from http://cvaberaj.oxfordjournals.org/ by guest on September 27, 2016

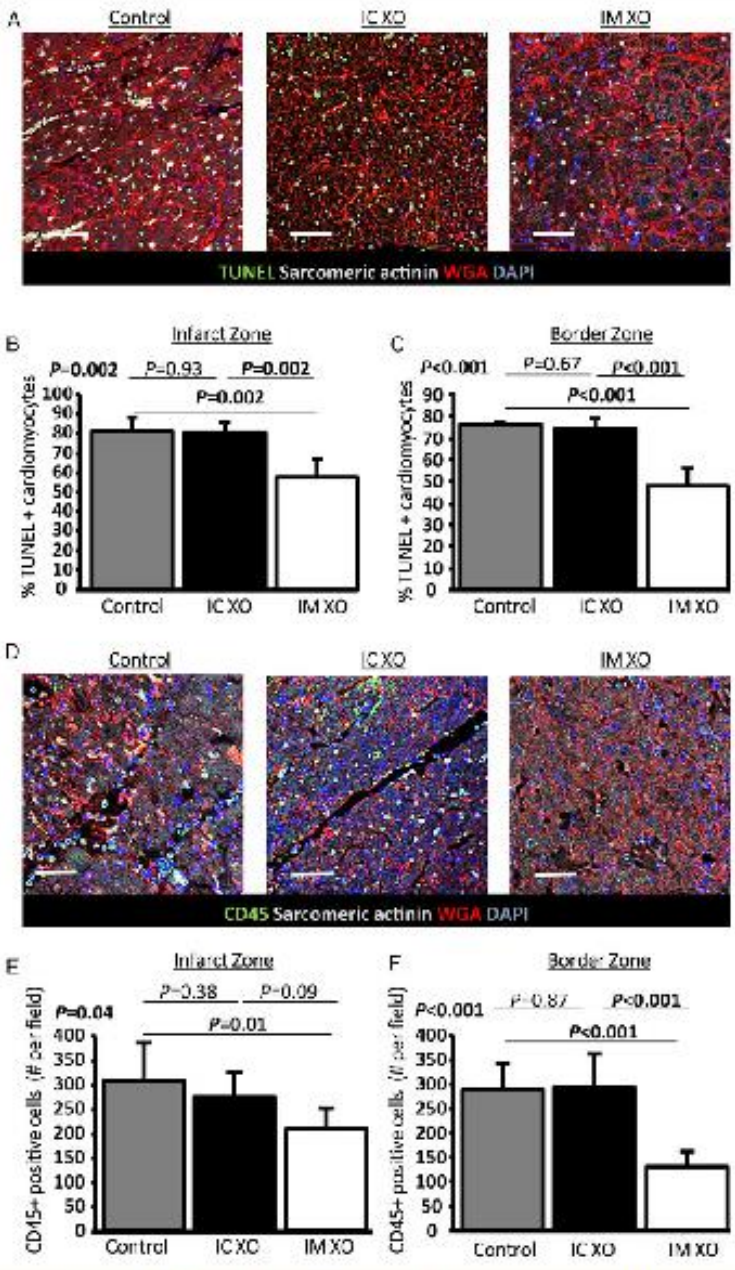


Figure 2 Acute myocardial infarction study: apoptosis and inflammation. (*A*) Representative images of TUNEL staining for apoptosis quantification in a control, an intracoronary exosome, and an intramyocardial exosome-treated pig (border zone). Pooled data show that cardiomyocyte apoptosis in the infarcted (*B*) and border (*C*) area is reduced by intramyocardial exosomes but not by intracoronary exosomes compared with control. (*D*) Representative images of CD45 staining for quantification of leukocyte infiltration in a control, an intracoronary exosome and an intramyocardial exosome-treated pig (border zone). Pooled data show that leukocyte infiltration in the infarcted (*E*) and border (*F*) area is reduced by intramyocardial exosomes but not by intracoronary exosomes compared with control. Scale bars = 50 μm.

Downloaded from http://cvaberg.oxfordjournals.org/ by guest on September 27, 2016

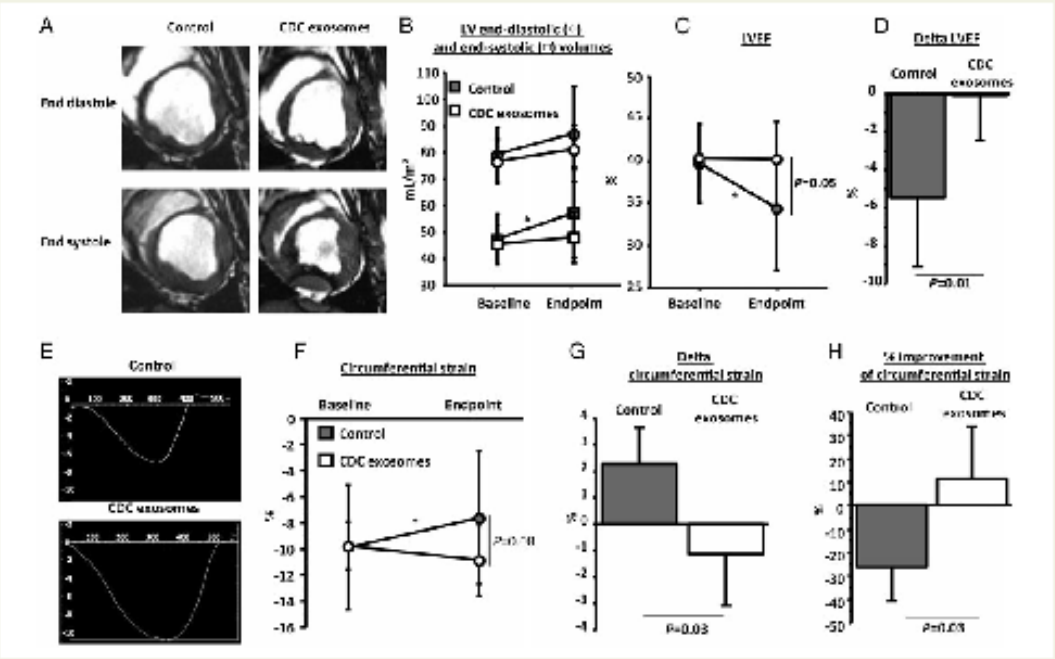


Figure 3 Randomized pre-clinical study in convalescent myocardial infarction: structure and function. (*A*) Representative short-axis end-diastolic (top) and end-systolic (bottom) magnetic resonance images at endpoint in control (left) and cardiosphere-derived cell exosome-treated (right) pigs. (*B*) Pooled data show that left ventricular end-diastolic and end-systolic volumes are similar in the two groups at baseline but end-systolic volume increases only in the vehicle group at endpoint (not in the cardiosphere-derived cell exosome-treated animals). Left ventricular ejection fraction is similar in the two groups at baseline but is higher in cardiosphere-derived cell exosome-treated pigs at endpoint (*C*), and the decrease in left ventricular ejection fraction is greater in the control-treated animals (*D*). (*E*) Representative images of global circumferential strain at endpoint in a cardiosphere-derived cell exosome and a control-treated pig. Pooled data show that circumferential strain is similar in the two groups at baseline (*F*) but improves (decrease of value shown in *[G]*, absolute improvement in *[H]*) in the cardiosphere-derived cell exosome-treated pigs while it decreases in the control pigs at endpoint. * $P < 0.05$ vs. baseline (intra-group paired analysis).

from convalescent/chronic MI (ALLSTAR),[3] to heart failure with reduced EF (DYNAMIC[28]), and Duchenne cardiomyopathy (HOPE-Duchenne).[29] Exosomes secreted by CDCs appear to replicate the cardioprotective[20] and regenerative effects of CDCs,[9,10] but so far the evidence is limited to *in vitro* work and to rodent models. Here, we demonstrate the effects of exosomes in large-animal models of acute and convalescent MI. In both of these models, IM delivery of CDC exosomes mimicked the structural and functional benefits of CDCs, but IC delivery did not. The salutary effects included attenuation of adverse remodelling, preserved LVEF, and decreased scar size relative to placebo controls.

Delivery of exosomes for clinical translation

Given that exosomes are nano-sized particles (<200 nm [*Figure 1*], when compared with ~20 μm for CDCs),[4] their homing to heart tissue following IC delivery is uncertain when compared with the mechanism of CDC extravasation (vascular occlusion by CDCs followed by endothelial pocketing) into tissue.[30] Here we showed that the therapeutic effects of CDC-derived exosomes are almost non-existent after IC infusion but are highly significant when IM delivery is performed. Such findings were observed both in acute (*Figure 1*) and chronic MI (*Figure 4* and see Supplementary material online, *Figure S5*). Exosome tracking by bioluminescence revealed greater myocardial retention after IM injection than after IC infusion. Altogether, these results are consistent with the idea that IC exosomes are not very efficacious because first-pass retention of these tiny, non-occlusive vesicles is low. The finding of a decrease in MVO may reflect trapping of some exosomes in sluggishly perfused areas of the myocardium, where they dwell sufficiently long to be taken up and exert their bioactivity. However, this hypothesis remains speculative.

Mechanism of action of cardiosphere-derived cell exosomes

Cardiosphere-derived cells have shown efficacy in different indications including acute and convalescent MI[4–8,17,18] Here, we demonstrated that exosomes recapitulate the effect of CDCs in those two

Downloaded from http://eurheartj.oxfordjournals.org/ by guest on September 27, 2016

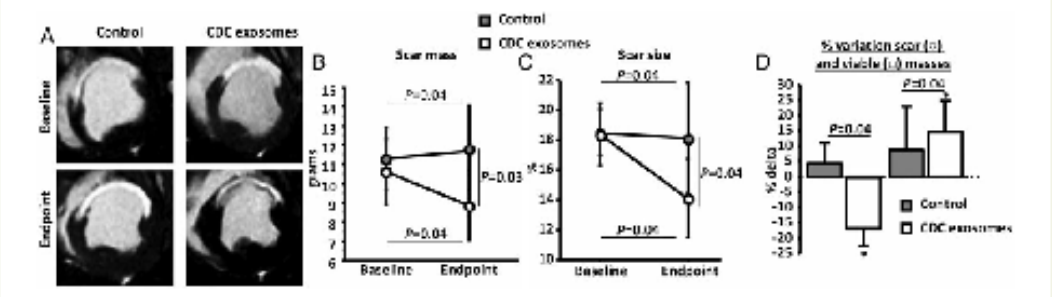


Figure 4 Randomized pre-clinical study in convalescent myocardial infarction: scar mass and viable mass. (*A*) Representative MR images of short-axis late-gadolinium enhancement at baseline and endpoint in a control and a cardiosphere-derived cell exosome-treated pigs. Pooled data show that scar mass (*B*) and scar size (*C*) are similar at baseline in the two groups but decrease at endpoint in cardiosphere-derived cell exosome-treated pigs compared with control. Consequently, viable mass increases only in cardiosphere-derived cell exosome-treated pigs (*D*). * $P < 0.05$ vs. baseline (intra-group paired analysis).

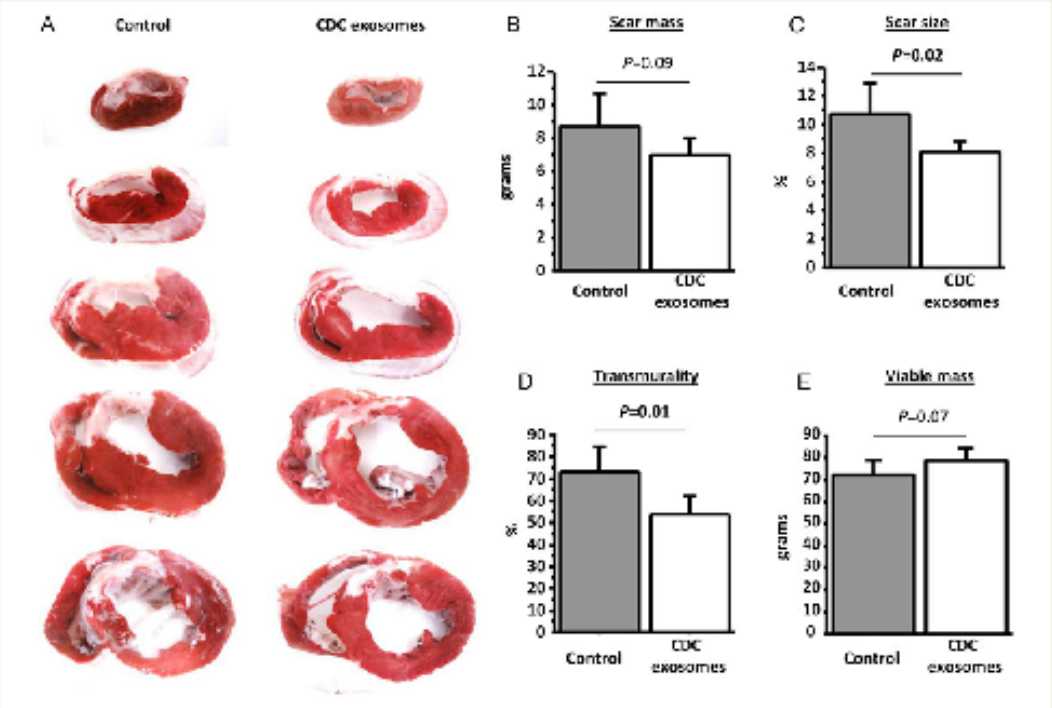


Figure 5 Randomized pre-clinical study in convalescent myocardial infarction: histological quantification of infarction. (*A*) Representative images of TTC stained heart from a control (left) and a cardiosphere-derived cell exosome-treated heart (right). Pooled data show that scar mass (*B*), scar size (*C*), and transmurality (*D*) at endpoint are lower in the cardiosphere-derived cell exosome-treated animals compared with control while viable mass tends to be higher (*E*).

indications. Moreover, the magnitude of acute IS decrease (in the AMI model) and attenuation of adverse remodelling (in the CMI model) are comparable, if not somewhat greater, to what had been observed with CDCs in similar models (see Supplementary material online, *Figure S6*). This finding suggests that exosomes suffice to mediate the entire effect of CDCs; they are not just part of

Downloaded from http://cardiovascres.oxfordjournals.org/ by guest on September 27, 2016

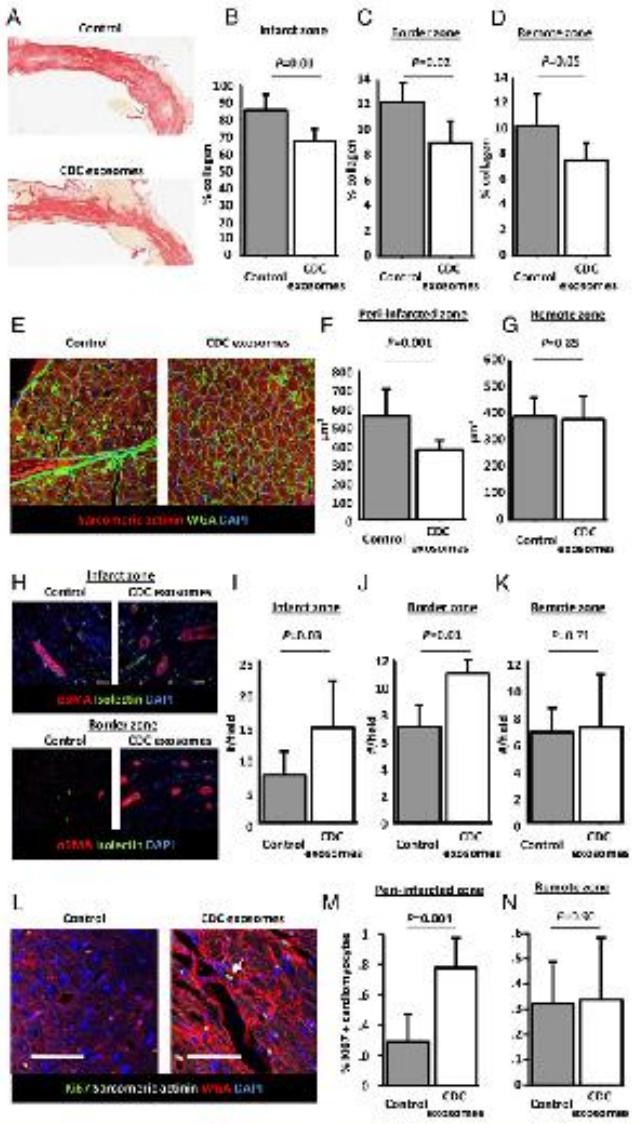


Figure 6 Randomized pre-clinical study in convalescent myocardial infarction: fibrosis, vascular density, and cardiomyocyte proliferation. (*A*) Representative images of infarcted area stained with picrosirius red in a control and a cardiosphere-derived cell exosome-treated pig. Pooled data show that collagen content of the infarcted area (*B*), the border zone (*C*), and the remote area (*D*) at endpoint is lower in cardiosphere-derived cell exosomes-treated pigs compared with control. (*E*) Representative images of cross-sectional area in a control and a cardiosphere-derived cell exosome-treated pig. Pooled data show that cardiomyocytes of cardiosphere-derived cell exosome-treated pigs are smaller in the peri-infarcted area (*F*) but not in the remote area (*G*). (*H*) Representative images of arteriole density in a control and a cardiosphere-derived cell exosome-treated pig (infarct and border zone). Pooled data show that, compared with control, cardiosphere-derived cell exosomes increase vascular density at endpoint in the infarct (*I*) and border area (*J*) but not in the remote area (*K*). (*L*) Representative images of Ki67 staining in the peri-infarct area in a control and a cardiosphere-derived cell exosome-treated pig (arrow shows a Ki67 positive cardiomyocyte). Pooled data show that proliferation of cardiomyocytes in the peri-infarct area (*M*) but not in the remote area (*N*) is higher in cardiosphere-derived cell exosome-treated pigs than in control. Scale bars = 50 μm.

Downloaded from http://cardiovascres.oxfordjournals.org/ by guest on September 27, 2016

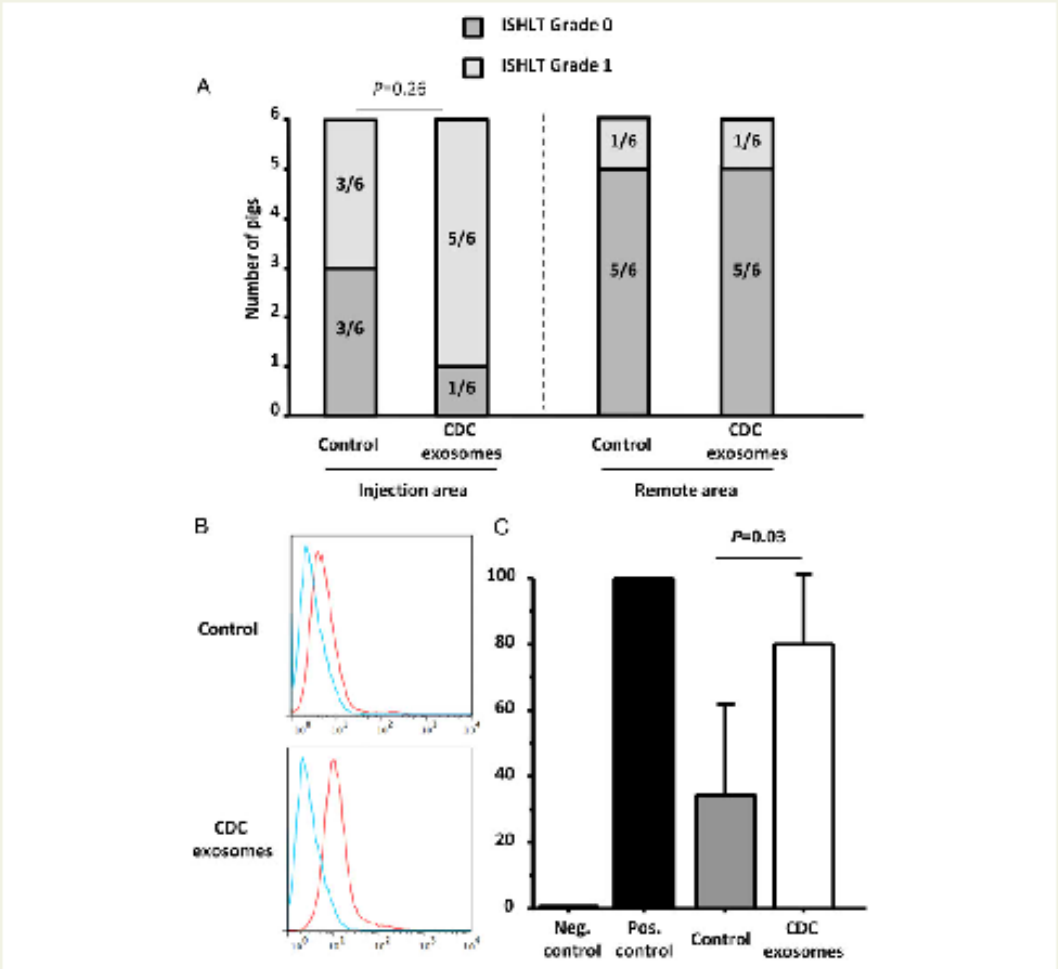


Figure 7 Randomized pre-clinical study in convalescent myocardial infarction: immunology. (*A*) Cellular reactions in the injection area and remote area are not different between control and exosome-treated animals. (*B*) Representative data of allo-antibodies quantification by flow cytometry in a control and an exosome-treated animal (blue is negative control, red is the animal serum). Pooled data show that allo-antibodies were detected in both control and exosome-treated animals, although at higher levels in the latter (*C*).

the story. The ability of exosomes to halt both pro-inflammatory and pro-fibrotic pathways is believed to reside in their unique miRNA (and other non-coding RNAs[13]) payload and their internalization by macrophages, fibroblasts, and cardiomyocytes.[30,31] Indeed, exosomes can 'reprogram' fibroblasts, fundamentally altering the phenotype of these cells.[10,32,33] Moreover, CDC-derived exosomes modify the content of exosomes secreted by recipient fibroblasts, thus leading to an amplification of the therapeutic effect. This modification of the recipient fibroblasts will lead to increased collagen degradation by MMPs and decreased collagen production (through TGF-β pathway inhibition), leading to decreased scar content.[25] These concepts help to rationalize why relatively low doses of CDCs are effective, and why benefits persist for months after single doses. It also explains how exosomes are able to decrease MVO and IS even when infused 30 min after reperfusion, while other cardioprotective techniques fail to decrease IS past the first minutes of reperfusion.[34]

Immunogenicity

We have previously shown that allogeneic CDCs do not instigate a major immune response.[4,8,35] Cardiosphere-derived cells express MHC1 but do not express MHC2, CD80, and CD86. The absence of MHC2 gives CDCs the potential to escape recognition by CD4 lymphocytes. Moreover, CD80 and CD86, which are required for

Downloaded from http://eurheartj.oxfordjournals.org/ by guest on September 27, 2016

the induction of effector lymphocytes, are lacking. Another reason why allogeneic CDCs do not instigate an immune response is that they secrete many paracrine factors that tend to decrease the local inflammatory reaction and the infiltration of inflammatory cells in the recipient. However, although CDCs are immunomodulatory cells, some questions remain unanswered particularly if repeat dosing is to be considered. One of the potential advantages of exosomes over CDCs is that they are acellular and therefore likely to be less immunogenic than CDCs. Here, we injected human exosomes into non-immunosuppressed pigs. Xenogeneic CDC therapy has been shown to be ineffective and highly immunogenic.[6,25] Here, treatment with xenogeneic exosomes recapitulates the entire benefit profile of auto- or allogeneic CDCs without apparent adverse effects. Histological grade 1 rejection was observed in both exosome-treated and control pigs, suggesting that this inflammatory reaction is more likely to be related to the MI, the needle puncture, or the IMDM (the vehicle used to resuspend the exosomes) rather than the exosomes themselves. Given our favourable results with the worst-case scenario of xenogeneic exosome therapy in a large-animal model, the use of allogeneic CDC-derived exosomes in humans is likely to be safe. The presence of allo-antibodies is difficult to interpret since some are also observed in vehicle-treated animals. Whether such antibodies will undermine the efficacy of repeated treatment with CDC-derived exosomes is unclear and will require additional studies. Such studies are needed, as repeat dosing may be necessary in diseases with ongoing myocardial degeneration (e.g. genetic cardiomyopathies).

Limitations

One limitation of this study is that the MIs were performed on young healthy animals. Although the two models recapitulate the key features of MI with adverse ventricular remodelling, the effect of exosomes on older human patients with cardiovascular risk factors remains uncertain. The effects of exosomes may differ in senescent cells with altered genetic or epigenetic content. Another limitation is that, in the AMI study, LVEF and LV volumes were measured using contrast ventriculography. Magnetic resonance imaging (which has been used in the CMI model) is the gold standard, but practical timing constraints make it impossible to interpolate an MRI between the time of reflow and the time of therapy. Nevertheless, histological assessments of MVO and scar size (and not LV remodelling) were the key endpoints in the AMI model.

Conclusion

Human CDC-derived exosomes can decrease acute ischaemia-reperfusion injury, and halt chronic post-MI adverse remodelling in pigs when delivered by IM injection. These findings suggest that CDC-derived exosomes may be an attractive cell-free product for the treatment of ischaemic heart disease in humans.

Supplementary material

Supplementary material is available at *European Heart Journal* online.

Authors' contributions

R.G. performed statistical analysis; E.M., L.M., B.G. handled funding and supervision; R.G., J.D., J.V., E.S., G.d.C., R.M., E.T., D.L., M.K., R.R.S. acquired the data; R.G., J.D., E.M. conceived and designed the research; R.G., J.D., E.M. drafted the manuscript; J.V., E.S., G.d.C., R.M., E.T., D.L., M.K., R.R.S., L.M., B.G., E.M. made critical revision of the manuscript for key intellectual content.

Funding

This study was funded by NIH R01HL124074 to E.M. and the Cedars-Sinai Board of Governors Heart Stem Cell Center. R.G. received a grant from the French Society of Cardiology. J.D. is supported by NIH T32HL116273.

Conflict of interest: E.M. and L.M. own equity in Capricor Inc. L.M., R.R.S. and M.K. are employed by Capricor Inc.

References

1. Schmidt M, Jacobsen JB, Lash TL, Botker HE, Sorensen HT. 25 year trends in first time hospitalisation for acute myocardial infarction, subsequent short and long term mortality, and the prognostic impact of sex and comorbidity: a Danish nation-wide cohort study. *Br Med J* 2012;344:e356.
2. World Health Organization. *Global atlas on cardiovascular disease prevention and control*. 2011.
3. Allogeneic Heart Stem Cells to Achieve Myocardial Regeneration (ALLSTAR) (NCT01458405). https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01458405?term=allstar&rank=1 (28 May 2016, date last accessed).
4. Johnston PV, Sasano T, Mills K, Evers R, Lee ST, Smith RR, Lardo AC, Lai S, Steenbergen C, Gerstenblith G, Lange R, Marban E. Engraftment, differentiation, and functional benefits of autologous cardiosphere-derived cells in porcine ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 2009;120:1075–1083, 7 p following 1083.
5. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, Czer LSC, Marbán L, Mendizabal A, Johnston PV, Russell SD, Schuleri KH, Lardo AC, Gerstenblith G, Marbán E. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *The Lancet* 2012;379:895–904.
6. Malliaras K, Li TS, Luthringer D, Terrovitis J, Cheng K, Chakravarty T, Galang G, Zhang Y, Schoenhoff F, Van Eyk J, Marbán L, Marbán E. Safety and efficacy of allogeneic cell therapy in infarcted rats transplanted with mismatched cardiosphere-derived cells. *Circulation* 2012;125:100–112.
7. Malliaras K, Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Wu E, Bonow RO, Marbán L, Mendizabal A, Cingolani E, Johnston PV, Gerstenblith G, Schuleri KH, Lardo AC, Marbán E. Intracoronary cardiosphere-derived cells after myocardial infarction: evidence of therapeutic regeneration in the final 1-year results of the CADUCEUS trial (CArdiosphere-Derived aUtologous stem CElls to reverse ventricULar dySfunction). *J Am Coll Cardiol* 2014;63:110–122.
8. Malliaras K, Smith RR, Kanazawa H, Yee K, Seinfeld J, Tseliou E, Dawkins JF, Kreke M, Cheng K, Luthringer D, Ho CS, Blusztajn A, Valle I, Chowdhury S, Makkar RR, Dharmakumar R, Li D, Marbán L, Marbán E. Validation of contrast-enhanced magnetic resonance imaging to monitor regenerative efficacy after cell therapy in a porcine model of convalescent myocardial infarction. *Circulation* 2013;128:2764–2775.
9. Ibrahim AG, Cheng K, Marbán E. Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy. *Stem Cell Reports* 2014;2:606–619.
10. Tseliou E, Fouad J, Reich H, Slipczuk L, de Couto G, Aminzadeh M, Middleton R, Valle J, Weixin L, Marbán E. Fibroblasts rendered antifibrotic, antiapoptotic, and angiogenic by priming with cardiosphere-derived extracellular membrane vesicles. *J Am Coll Cardiol* 2015;66:599–611.
11. Sahoo S, Klychko E, Thorne T, Misener S, Schultz KM, Millay M, Ito A, Liu T, Kamide C, Agrawal H, Perlman H, Qin G, Kishore R, Losordo DW. Exosomes from human CD34(+) stem cells mediate their proangiogenic paracrine activity. *Circ Res* 2011;109:724–728.
12. Sahoo S, Losordo DW. Exosomes and cardiac repair after myocardial infarction. *Circ Res* 2014;114:333–344.
13. Cambier L, De Couto G, Ibrahim A, Marbán E. Y RNA Fragments Enriched in Exosomes From Cardiosphere-derived Cells Mediate Cardioprotection and Macrophage Polarization. AHA Scientific Sessions 2015 Abstract 16009. 2015.
14. Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2002;2:569–579.

Downloaded from http://eurheartj.oxfordjournals.org/ by guest on September 27, 2016

15. Barile L, Lionetti V, Cervio E, Matteucci M, Gherghiceanu M, Popescu LM, Torre T, Siclari F, Moccetti T, Vassalli G. Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2014;**103**:530–541.
16. Vicencio JM, Yellon DM, Sivaraman V, Das D, Boi-Doku C, Arjun S, Zheng Y, Riquelme JA, Kearney J, Sharma V, Multhoff G, Hall AR, Davidson SM. Plasma exosomes protect the myocardium from ischemia-reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol* 2015;**65**:1525–1536.
17. de Couto G, Liu W, Tseliou E, Sun B, Makkar N, Kanazawa H, Arditi M, Marbán E. Macrophages mediate cardioprotective cellular postconditioning in acute myocardial infarction. *J Clin Invest* 2015;**125**:3147–3162.
18. Kanazawa H, Tseliou E, Malliaras K, Yee K, Dawkins JF, De Couto G, Smith RR, Kreke M, Seinfeld J, Middleton RC, Gallet R, Cheng K, Luthringer D, Valle I, Chowdhury S, Fukuda K, Makkar RR, Marbán L, Marbán E. Cellular postconditioning: allogeneic cardiosphere-derived cells reduce infarct size and attenuate microvascular obstruction when administered after reperfusion in pigs with acute myocardial infarction. *Circ Heart Fail* 2015;**8**:322–332.
19. Heusch G, Skyschally A, Schulz R. The in-situ pig heart with regional ischemia/reperfusion - ready for translation. *J Mol Cell Cardiol* 2011;**50**:951–963.
20. de Couto G, Duvvuula P, Ibrahim A, Marbán E. Intracoronary delivery of exosomes secreted by cardiosphere-derived cells confers cardioprotection with delayed administration after ischemia-reperfusion injury in rats. AHA Scientific Sessions 2014 Abstract 15845. 2014.
21. Gallet R, Tseliou E, Dawkins J, Middleton R, Valle J, Angert D, Reich H, Luthringer D, Kreke M, Smith R, Marbán L, Marbán E. Intracoronary delivery of self-assembling heart-derived microtissues (cardiospheres) for prevention of adverse remodeling in a pig model of convalescent myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Interv* 2015;**8**:pii: e002391. doi: 10.1161/CIRCINTERVENTIONS.115.002391.
22. Chernyshev VS, Rachamadugu R, Tseng YH, Belnap DM, Jia Y, Branch KJ, Butterfield AE, Pease LF III, Bernard PS, Skliar M. Size and shape characterization of hydrated and desiccated exosomes. *Anal Bioanal Chem* 2015;**407**:3285–3301.
23. Phuyal S, Skotland T, Hessvik NP, Simolin H, Overbye A, Brech A, Parton RG, Bicoos K, Sandvig K, Llorente A. The ether lipid precursor hexadecylglycerol stimulates the release and changes the composition of exosomes derived from PC-3 cells. *J Biol Chem* 2015;**290**:4225–4237.
24. Tseliou E, de Couto G, Terrovitis J, Sun B, Weixin L, Marbán L, Marbán E. Angiogenesis, cardiomyocyte proliferation and anti-fibrotic effects underlie structural preservation post-infarction by intramyocardially-injected cardiospheres. *PLoS ONE* 2014;**9**:e88590.
25. Tseliou E, Reich H, de Couto G, Terrovitis J, Sun B, Liu W, Marbán E. Cardiospheres reverse adverse remodeling in chronic rat myocardial infarction: roles of soluble endoglin and TGF-beta signaling. *Basic Res Cardiol* 2014;**109**:443.
26. Malliaras K, Zhang Y, Seinfeld J, Galang G, Tseliou E, Cheng K, Sun B, Aminzadeh M, Marbán E. Cardiomyocyte proliferation and progenitor cell recruitment underlie therapeutic regeneration after myocardial infarction in the adult mouse heart. *EMBO Mol Med* 2013;**5**:191–209.
27. Makkar R, Schatz R, Traverse J, Hamer A, Beattie K, Smith RR, Kivel F, Marbán L, Marbán E. ALLogeneic Heart STem Cells to Achieve Myocardial Regeneration (ALLSTAR): the One Year Phase I Results. AHA Scientific Session 2014 Abstract 20536. 2014.
28. Dilated cardiomYopathy INtervention With Allogeneic Myocardially-regenerative Cells (DYNAMIC) (NCT02293603). **https://clinicaltrials.gov/ct2/show/nct02293603** (28 May 2016, date last accessed).
29. HaltcardiomyOPathy progrEssion in Duchenne(HOPE-Duchenne) (NCT02485938). **https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02485938** (28 May 2016, date last accessed).
30. Cheng K, Shen D, Xie Y, Cingolani E, Malliaras K, Marbán E. Brief report: Mechanism of extravasation of infused stem cells. *Stem Cells* 2012;**30**:2835–2842.
31. de Couto G, Makkar N, Marbán E. Cardiosphere-derived cell exosomes confer acute cardioprotection following ischemia-reperfusion injury through macrophage polarization. AHA Scientific Sessions 2015 2015.
32. Quesenberry PJ, Aliotta J, Deregibus MC, Camussi G. Role of extracellular RNA-carrying vesicles in cell differentiation and reprogramming. *Stem Cell Res Ther* 2015;**6**:153.
33. Gray WD, French KM, Ghosh-Choudhary S, Maxwell JT, Brown ME, Platt MO, Searles CD, Davis ME. Identification of therapeutic covariant microRNA clusters in hypoxia-treated cardiac progenitor cell exosomes using systems biology. *Circ Res* 2015;**116**:255–263.
34. Heusch G. Treatment of myocardial ischemia/reperfusion injury by ischemic and pharmacological postconditioning. *Compr Physiol* 2015;**5**:1123–1145.
35. Tseliou E, Pollan S, Malliaras K, Terrovitis J, Sun B, Galang G, Marbán L, Luthringer D, Marbán E. Allogeneic cardiospheres safely boost cardiac function and attenuate adverse remodeling after myocardial infarction in immunologically mismatched rat strains. *J Am Coll Cardiol* 2013;**61**:1108–1119.

Downloaded from http://cvaberuj.oxfordjournals.org/ by guest on September 27, 2016

DISCUSSION ET CONCLUSIONS GENERALES

Le remodelage inverse est l'un des principaux facteurs expliquant la mortalité et la morbidité de l'infarctus du myocarde[3,4,272]. Malgré l'amélioration des soins et le développement de la reperfusion précoce, la mortalité à 1 an de l'infarctus du myocarde avoisine 10%[2]. Parmi les stratégies en développement pour diminuer cette mortalité, la thérapie cellulaire semble prometteuse. En effet, les propriétés paracrines anti-fibrotiques, anti-inflammatoires et pro-angiogéniques des cellules souches pourraient permettre une diminution de la morbidité liée à l'infarctus. Dans ce travail, deux dérivés de cellules souches d'origine cardiaque ont été testés dans différents modèles d'infarctus du myocarde. Tout d'abord, nous avons démontré la faisabilité et l'efficacité de la délivrance par voie intra-coronaire de cardiosphères, ces dernières étant des groupements pluri-cellulaires tridimensionnels, composées de plusieurs types cellulaires. Dans un deuxième temps, nous avons confirmé une hypothèse mécanistique récente, qui sous-tend que les effets de la thérapie cellulaire sont liés à la production d'exosomes. En démontrant l'effet bénéfique de ces derniers dans l'infarctus du myocarde, nous avons, d'une part, participé à confirmer cette hypothèse, et d'autre part ouvert le chemin pour des études cliniques utilisant ces exosomes.

Administration intra-coronaire : sécurité, limitations et possibilités de translation

L'injection intra-coronaire est une technique simple, pratique et largement disponible pour délivrer des substances biologiques vers le cœur. Jusqu'à ce travail, l'injection de cardiosphères par voie intra-coronaire avait été évitée, en raison de la crainte d'une obstruction micro-vasculaire diffuse par ces « micro-tissus » tridimensionnels, pouvant occasionner des dommages myocardiques. En effet, ces certains auteurs ont émis l'hypothèse que l'injection intra-coronaire de particules d'un diamètre supérieur à 10 µm pouvait être risquée en raison de ce risque de micro-embolisation[201,273-275]. Cependant l'injection de grosses particules (CellBeads de 160–400 µm) avait été testée précédemment sans complication, avec néanmoins certaines réserves[273-275]. D'une part le nombre de particules injectées était limité (≤60 000) et d'autre part, un des objectifs de l'étude était de causer un certain degré d'obstruction micro-vasculaire. Dans notre travail, nous avons été capables de délivrer par voie intra-coronaire plus de 1×10^6 cardiosphères d'un diamètre

moyen de 45µm, et ce, sans évènement indésirable. La première étude ayant évaluée l'injection de CDCs (sous forme de cellules uniques) avait utilisé la technique d'administration avec interruption de flux et mis en évidence que l'injection de plus de 25×10^6 cellules d'un diamètre de 20 µm environ était associée à une augmentation de troponine I à 24 heures, signant la survenue de dommages myocardiques[130]. Ainsi, la dose de $12,5\times10^6$ CDCs (ou ≈300000CDCs/kg) était la dose maximale utilisable chez des porcs miniatures. La combinaison de l'optimisation des conditions de culture des cardiosphères et de l'utilisation de cette administration sans interruption de flux nous a permis d'injecter l'équivalent de 50×10^6 cellules uniques dans le même modèle. Cette possibilité de délivrer des doses importantes de cellules pourrait permettre une augmentation de l'efficacité des différents produits de thérapie cellulaire même si la relation entre la dose injectée et l'efficacité de la thérapie cellulaire n'est pas parfaitement démontrée[109,276,277].

La raison pour laquelle les cardiosphères ne causent pas de micro-infarctus a été discutée. Quatre mécanismes possibles ont été proposés par Ishikawa[277]. Il est possible que (1) que les cardiosphères adhèrent à la paroi des gros vaisseaux puis migrent dans le myocarde, (2) les cardiosphères passent à travers les capillaires sans les occlure, (3) les cardiosphères occluent très transitoirement les micro-vaisseaux avant de migrer dans le myocarde en traversant la paroi vasculaire et enfin, (4) la perfusion distale soit maintenue par des collatérales. Nous savons grâce aux mesures de réserve de flux coronaire en hyperhémie que le flux coronaire à l'état basal est loin de sa valeur maximale ; en effet la réserve coronaire permet une augmentation du flux de sang coronaire jusqu'à un facteur 5 essentiellement par la vasodilatation des micro-vaisseaux[278]. De plus, des capillaires collatéraux existent, même dans le myocarde sain, et sont recrutés dès la première minute d'occlusion coronaire. Une large partie des micro-vaisseaux coronaires sont donc occlus à l'état basal, et ces vaisseaux peuvent être occlus par micro-embolisation sans altérer le flux sanguin myocardique, et donc sans causer de micro-infarctus. Une fois dans le capillaire, les cardiosphères vont passer dans le myocarde par « extravasation active » (Figure 36)[279]. En effet après injection, les cardiosphères vont se loger dans le vaisseau, causant une occlusion de celui-ci. Puis, une « poche endothéliale » va se créer, suivi de la rupture de la paroi vasculaire du vaisseau adjacent, permettant le passage des cardiosphères dans le myocarde. Ce processus prend 48 à 72 heures, après quoi le vaisseau est recanalisé. Au total, nous

pensons que l'absence de micro-infarctus est liée au recrutement de la réserve coronaire et de micro-vaisseaux collatéraux permettant de maintenir la perfusion myocardique, le temps que les vaisseaux occlus par les cardiosphères s'ouvrent à nouveau.

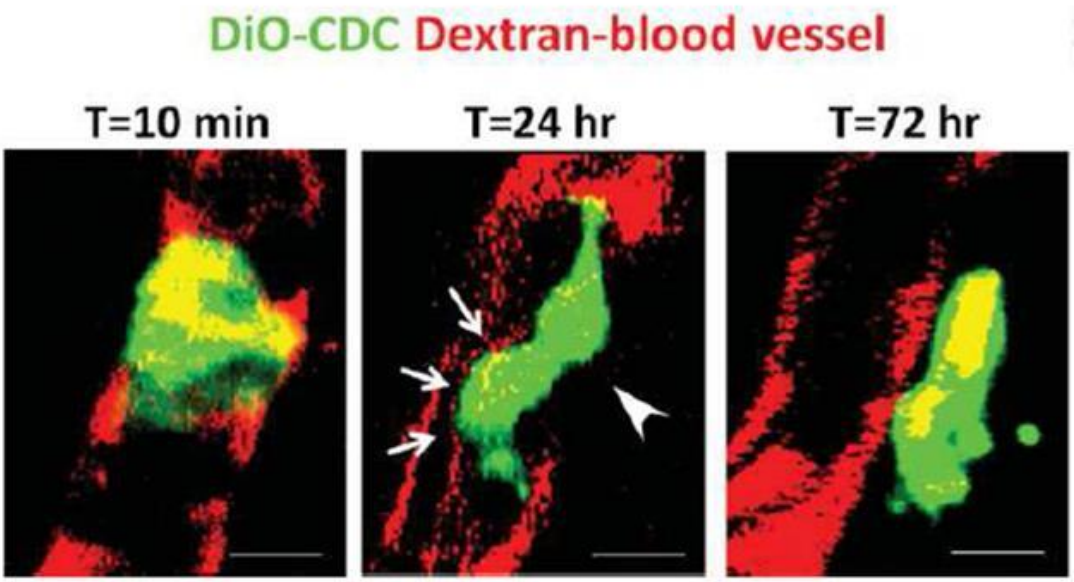


Figure 36: Extravasation d'une cardiosphère à travers un vaisseau. A 10 minutes, la cardiosphère est bloquée dans le vaisseau. Puis à 24 heures, une poche endothéliale se forme autour de la cardiosphère permettant le passage de la cardiosphère dans le milieu extra-vasculaire à 72 heures par rupture de la paroi vasculaire (d'après Cheng et collaborateurs[279]).

Concernant les exosomes, la problématique était différente. En effet, étant donné la taille nanométrique de ces particules, leur extravasation et rétention au niveau du myocarde après leur injection intra-coronaire était incertaine étant donné le mécanisme d'extravasation des CDCs et cardiosphères (formation d'une « poche endothéliale »). Nous avons montré que les effets des exosomes sont très limités, voire inexistant après leur injection par voie intra-coronaire, alors qu'ils sont nettement plus importants après injection intra-myocardique. Ces observations ont été faites à la fois sur un modèle d'infarctus aigu et sur un modèle d'infarctus constitué. La détection par bioluminescence des exosomes injectés a permis de mettre en évidence une rétention de ces exosomes plus importante après leur injection intra-myocardique par rapport à la voie intra-coronaire, renforçant

l'hypothèse selon laquelle la plus grand efficacité de la voie intra-myocardique serait liée à un meilleur ciblage des exosomes au tissu lésé, les exosomes injectés par voie intra-coronaire traversant probablement la circulation coronaire sans occlure les micro-vaisseaux myocardiques, avec par conséquent, l'absence d'extravasation active possible. Le fait que seule l'obstruction micro-vasculaire soit diminuée lors de l'injection intra-coronaire d'exosomes n'est pas discordant et peut au contraire être expliqué. En effet, il est possible qu'après leur injection, les exosomes soient retenus au niveau des micro-vaisseaux occlus par le phénomène de *no-reflow* et qu'ils restent dans la microcirculation suffisamment longtemps pour passer dans le myocarde et modifier l'inflammation locale, diminuant ainsi le *no-reflow* dans cette zone. Néanmoins cette théorie est hypothétique et n'a pas été démontrée par les expériences réalisées.

D'un point de vue translationnel, les résultats de ce travail peuvent potentiellement compliquer l'utilisation des exosomes. En effet, ils suggèrent fortement que l'administration intra-myocardique est nécessaire pour les exosomes. Celle-ci peut être réalisée de deux façons, soit par voie chirurgicale, soit par voie trans-endocardique par le système NOGA. Dans la cardiopathie ischémique chronique, l'injection chirurgicale n'est envisageable qu'en cas d'indication de chirurgie cardiaque, le bénéfice actuel de la thérapie cellulaire ne justifiant pas à lui seul la lourdeur et les risques de cette chirurgie. L'injection trans-endocardique est une alternative séduisante mais celle-ci est moins largement disponible que l'injection intra-coronaire. Elle est par ailleurs potentiellement plus risquée que l'injection intra-coronaire. Concernant l'infarctus à sa phase aigu, l'administration intra-myocardique n'est actuellement pas réalisable. En effet, la chirurgie thoracique n'est pas acceptable éthiquement dans ce contexte. Quant à l'injection trans-endocardique, deux problèmes se posent. Tout d'abord, le temps nécessaire à l'obtention d'une cartographie du ventricule gauche puis à la réalisation des injections est trop long pour envisager une injection suffisamment précoce des cellules, l'augmentation du délai d'injection étant associé à une perte d'efficacité. De plus, la navigation dans le ventricule gauche et plus encore l'injection trans-endocardique en phase aigüe d'infarctus présente des risques d'arythmie potentiellement importants dans ce contexte. Par conséquent, l'administration des exosomes à la phase aiguë de l'infarctus ne pourra être envisagée qu'au prix d'une

modification de ces exosomes, par exemple un encapsulage pour augmenter leur taille, permettant ainsi une adminisration par voie intra-coronaire.

Propriétés des cardiosphères et des exosomes dérivés de CDCs

Les CDCs ont été largement étudiés en phase pré-clinique, permettant la réalisation et la mise en route de plusieurs essais thérapeutiques de phase I/II utilisant initialement des cellules autologues puis, plus récemment des cellules allogéniques. Ainsi la capacité des CDCs à diminuer la taille de la nécrose est maintenant admise[168]. Dans la première partie de ce travail, nous avons étudié les cardiosphères et confirmé leurs propriétés de lutte contre le remodelage inverse qui avaient été décrites chez les rongeurs en utilisant l'injection intra-myocardique. Dans notre travail, l'injection de cardiosphères a totalement stoppé le processus de dégradation de la fraction d'éjection. De plus, nous avons observé une amélioration de la cinétique segmentaire ainsi qu'une diminution de la fibrose, non seulement dans la zone infarcie mais également dans les zones non infarcies, suggérant un effet global sur le remodelage inverse. Les effets observés dans ce travail semblent au moins égaux, voire supérieurs à ceux observés à 1 mois suivant l'administration de CDCs (comparaison réalisée avec des études historiques de Yee[172] et collaborateurs et des résultats non publiés de Malliaras et collaborateurs, Figure 37A et B). Ces effets globaux sur le remodelage ventriculaire gauche et la fibrose sont potentiellement liés à la meilleure rétention des cardiosphères décrite précédemment ainsi qu'à leur sécrétion plus importante de facteurs de croissances notamment d'endogline et de métalloprotéinases matricielles[165,202]. Ces propriétés pourraient être responsables d'un effet paracrine plus important et plus durable, et, éventuellement d'une sécrétion d'exosomes plus importante voire d'exosomes différents bien que les secrétions d'exosomes des CDCs et des cardiosphères n'aient jamais été comparés. Il est raisonnable de penser que ces effets pourraient augmenter avec une durée de suivi plus longue, permettant ainsi d'obtenir un effet supérieur à celui décrit par Malliaras et collaborateurs avec les CDCs[124,175]. Néanmoins, la comparaison directe entre cardiosphères et CDCs n'était pas l'objectif de ce travail et nécessiterait un nombre d'animaux trop important pour être éthiquement et financièrement raisonnable. En plus de ces effets anti-fibrotiques et anti-remodelage, nous avons observé

un effet pro-angiogénique important. En effet, nous avons observé un nombre d'artérioles deux fois plus important dans les zones infarcies et bordantes des animaux traités par cardiosphères. Cet effet histologique aboutissait à une amélioration fonctionnelle puisque la perfusion myocardique évaluée par IRM et par la mesure de la réserve coronaire était améliorée chez les animaux traités. Ces propriétés pro-angiogéniques pourraient avoir un intérêt dans certaines situations cliniques, notamment l'angor réfractaire et la dysfonction micro-circulatoire.

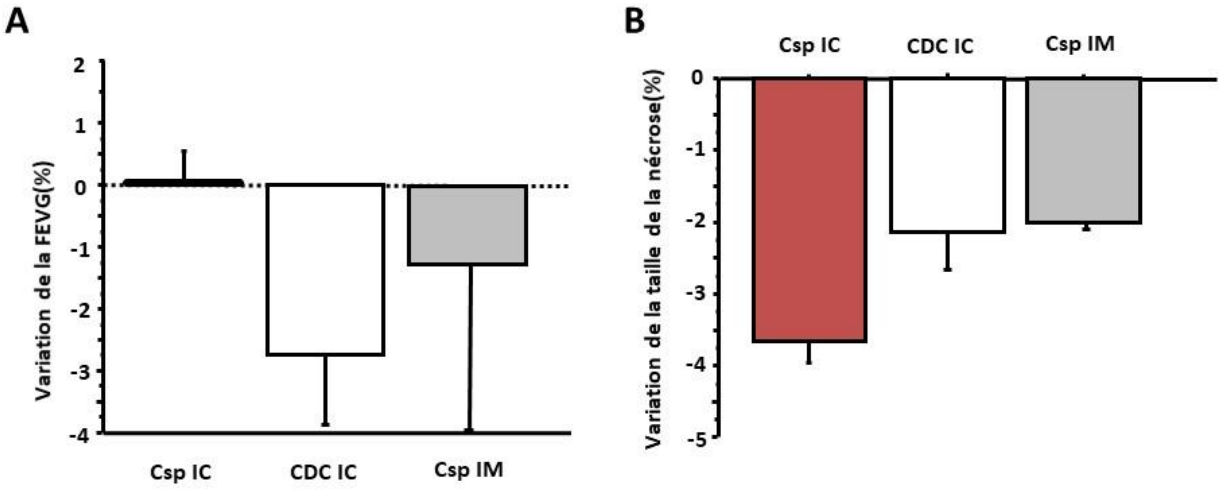


Figure 37 : Comparaison rétrospective des variations de fraction d'éjection et de taille de la cicatrice d'infarctus après l'administration de cardiosphères par voie intra-coronaire, de CDCs par voie intra-coronaire (résultats non publiés de Malliaras et collaborateurs) et d'une dose équivalente de cardiosphères par voie intra-myocardique (Yee et collaborateurs[172]).

Les exosomes ont également des propriétés comparables à celles des CDCs. En effet, à la phase aiguë d'infarctus, l'administration d'exosomes permet une diminution des lésions d'ischémie-reperfusion sur un plan macroscopique, avec diminution de l'obstruction microvasculaire et de la taille de l'infarctus, mais également sur un plan cellulaire avec une diminution de l'infiltration inflammatoire et de l'apoptose cardiomyocytaire. Les performances des exosomes sont proches de celles des CDCs en termes de réduction de la taille de l'infarctus et de l'obstruction microvasculaire, mais également de diminution du remodelage inverse et de la taille de la cicatrice. Tout ceci suggère que les exosomes sont

suffisants pour reproduire le bénéfice de la thérapie cellulaire et sont donc probablement les médiateurs de cet effet (Figure 38 A-D).

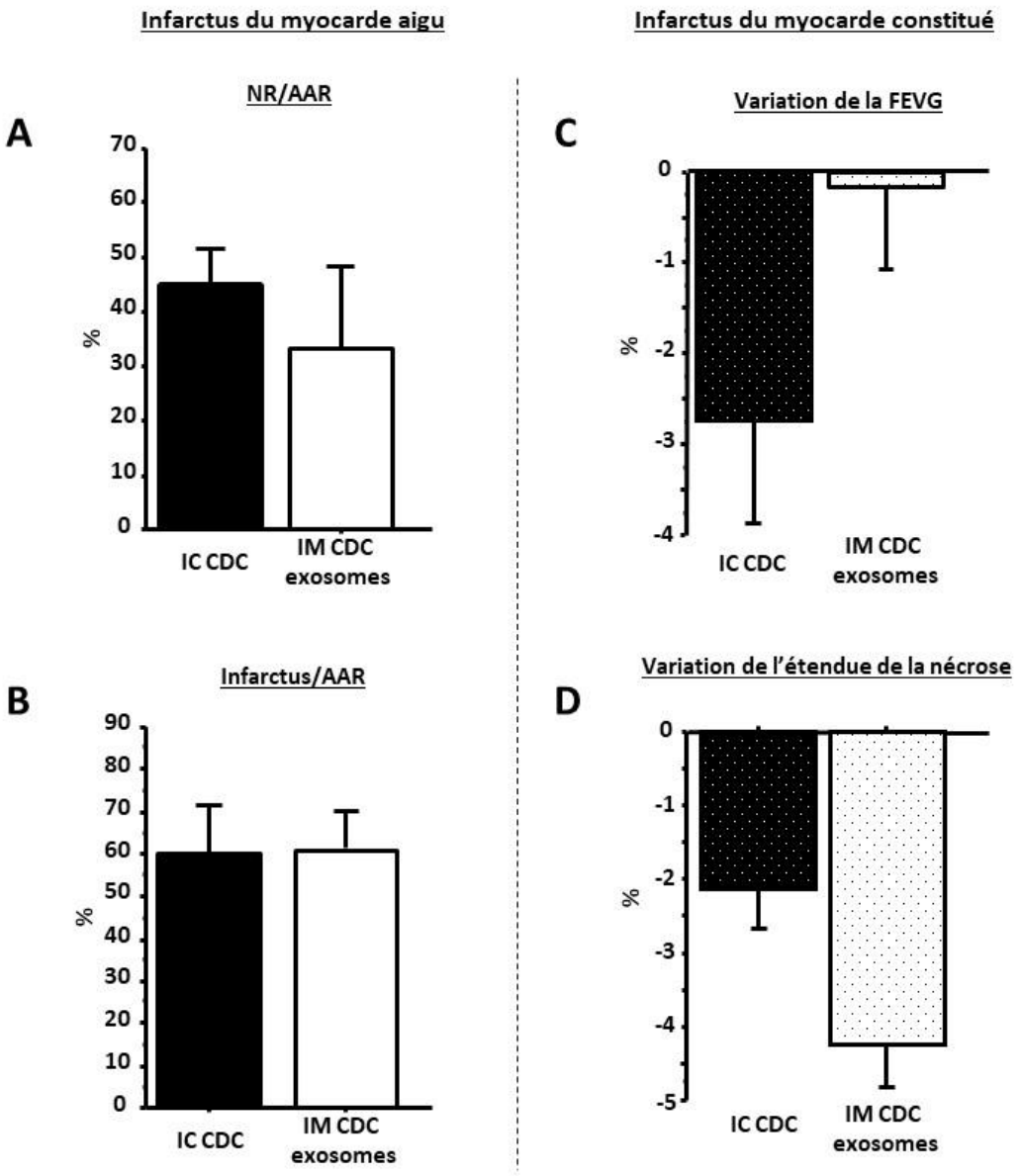


Figure 38 : Comparaison rétrospective de de l'effet des exosomes par voie intra-myocardique à l'effet des CDCs par voie intra-coronaire. Modèle d'infarctus aigu : les diminutions de no-reflow (A) et de taille d'infarctus (B) semblent équivalentes. Modèle d'infarctus constitué : la préservation de la fraction d'éjection (C) et la diminution de la taille de la cicatrice d'infarctus semblent au moins équivalentes. Comparaison aux résultats de Kanazawa et collaborateurs[128] pour l'infarctus à la phase aiguë et à des résultats non publiés de Malliaras et collaborateurs pour l'infarctus constitué.

La mise en évidence des propriétés anti-inflammatoires et anti-fibrotiques mais surtout les modifications phénotypiques de cellules cibles telles que les fibroblastes et les cellules inflammatoires ouvrent la voie à de nouvelles indications des cardiosphères, des CDCs et des exosomes. En effet il semble raisonnable de penser que les CDCs ou leurs exosomes sont capables de moduler des processus inflammatoires et fibrosants autres que ceux résultant de l'ischémie-reperfusion avec une activité potentiellement plus importante sur des pathologies chroniques à évolution plus lente et progressive. Dans un travail réalisé en parallèle de cette thèse, nous avons testé cette hypothèse dans un modèle de rat présentant une insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée[280,281]. Ce travail a permis confirmer les propriétés anti-inflammatoires et anti-fibrotiques majeures des CDCs, celles-ci étant associées à une modification profonde de l'expression génique dans les cœurs traités. De plus, ces modifications de la fibrose et de l'inflammation étaient à l'origine d'une normalisation phénotypique des rats traités aussi bien clinique qu'échographique et hémodynamique, aboutissant à une amélioration de la survie. Les résultats de ce travail ont par la suite été reproduits dans un modèle de rats sénescents[281]. De la même façon, plusieurs études préliminaires ont été réalisées dans de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite avec des résultats prometteurs[177,178], aboutissant à la mise en route d'essais thérapeutiques de phase II.

Mode d'action de la thérapie cellulaire et des exosomes

La capacité des exosomes à stopper ces processus pathologiques est liée à leur signature unique en micro-ARN et ARN non codants, lesquels vont être transférés aux cellules cibles, telles que les fibroblastes, les macrophages et les cardiomyocytes. Il a été démontré par Tseliou et collaborateurs que les exosomes étaient internalisés par les fibroblastes et qu'ils « reprogrammaient » ces cellules en modifiant profondément leur phénotype mais également leur expression génique (Figure 39)[282]. De plus, les exosomes de CDCs influaient sur le contenu des exosomes sécrétés par les fibroblastes, les rendant proches des exosomes de CDCs, induisant ainsi une modification en cascade des autres fibroblastes et amplifiant l'effet de la thérapie cellulaire. Ces modifications phénotypiques des fibroblastes vont aboutir à une augmentation de la dégradation de collagène par les MMPs et une diminution de sa production par l'inhibition de la voie du TGF-β, entraînant ainsi une diminution de la taille de la fibrose cicatricielle.

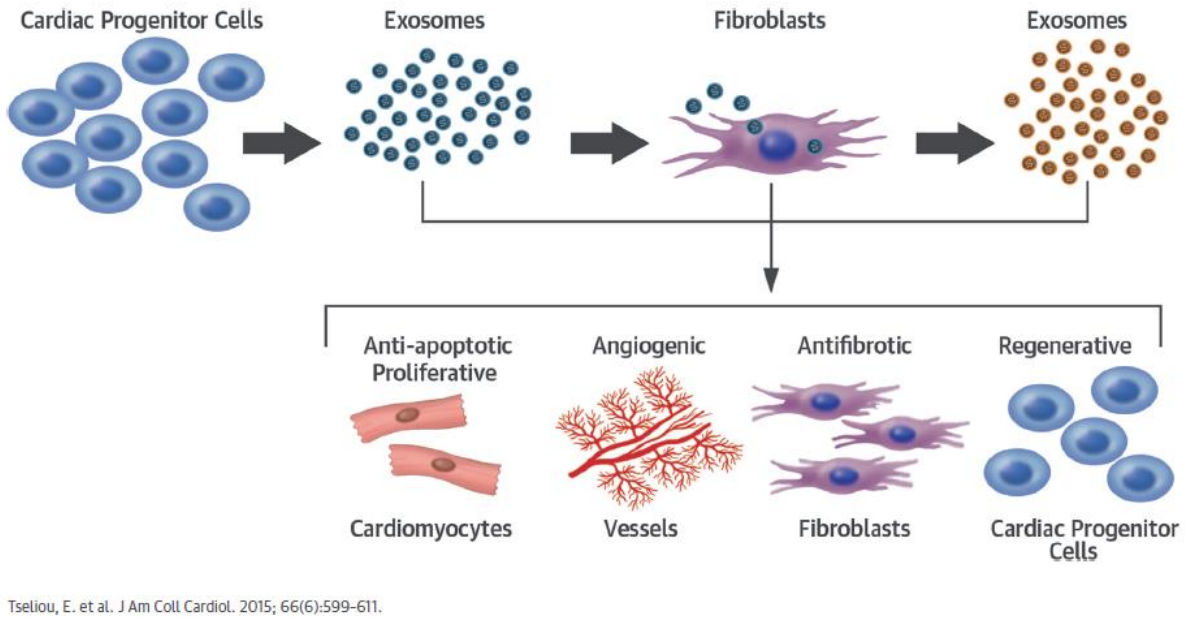


Figure 39 : Représentation schématique de l'action des exosomes de cellules souches sur les fibroblastes d'après Tseliou et collaborateurs[282].

Dans un autre travail concomitant de cette thèse, nous avons démontré un mode d'action similaire dans l'ischémie reperfusion[283]. Nous avons d'abord confirmé que l'administration d'exosomes dérivés des CDCs à la reperfusion chez des rats limitait la taille de l'infarctus. Celle-ci était associée à une diminution de l'infiltration des macrophages dans le myocarde mais également à une modification de leur phénotype. En effet, l'expression de certains gènes pro-inflammatoires par les macrophages présents dans le cœur des animaux traités par CDCs était réduite. De plus, in vitro, on observait une modification de la polarisation des macrophages exposés à des CDCs avec une augmentation de l'expression de gènes anti-inflammatoires. Les exosomes modifient donc le phénotype de ces macrophages en les orientant vers un phénotype plus anti-inflammatoire.

Au total, les exosomes, par l'intermédiaire des ARN non codants qu'ils contiennent et notamment des micro-ARN, sont donc capables de profondément modifier le phénotype des cellules cibles et de modifier leur expression génique d'une part mais également la composition des exosomes que celles-ci vont sécréter. Ces « nouveaux » exosomes vont à

leur tour être internalisés par la population cible, entraînant de fait une amplification de l'effet de la thérapie cellulaire. Ces concepts permettent d'expliquer et de rationnaliser plusieurs interrogations liées aux mécanismes d'action de la thérapie cellulaire. D'une part, cette action des exosomes permet d'expliquer pourquoi de relativement faibles doses de cellules sont efficaces, et pourquoi l'effet persiste jusqu'à plusieurs mois après une seule administration, alors que les cellules ne sont généralement plus retrouvées 15 jours suivant l'injection[124,126,177,178]. D'autre part, cela explique également pourquoi les CDCs sont capables de diminuer les lésions d'ischémie reperfusion jusqu'à 30 minutes après reperfusion alors que l'évaluation dans des délais si long des autres stratégies à jusqu'à présent été un échec[127,128,174].

Réponse immunitaire aux thérapies allogéniques

Le travail réalisé avec les cardiosphères a permis de confirmer les résultats observés précédemment avec les CDCs[123,124,126]. Les CDCs et les cardiosphères sont des cellules immuno-privilégiées qui n'induisent que très peu de réponse immunitaire. En effet, malgré l'absence de traitement immunosuppresseur, nous n'avons pas observé de réponse immunitaire supérieure au grade de l'ISHLT dans les tissus et le degré d'allo-anticorps détecté n'était pas différent du contrôle négatif après le traitement par cardiosphères. Les raisons pour lesquelles ces thérapies allogéniques ne génèrent pas de réponse immunitaire sont multiples. Tout d'abord, les CDCs expriment MHC1 mais n'expriment pas MHC2, CD80 et CD86. L'absence de MHC2 rend possible le fait que les CDCs échappent à la reconnaissance par les lymphocytes T CD4. De plus, les CD80 et CD86 nécessaires à l'induction de lymphocytes ne sont pas exprimés. Enfin, ces cellules ont une forte activité anti-inflammatoire paracrine et modifient l'inflammation locale et l'infiltration de cellules inflammatoires. Elles sont également sont capables de moduler le phénotype de ces cellules inflammatoires.

Cependant, bien que ces CDCs n'engendrent pas de réponse immunitaire importante, des doutes subsistent concernant d'une part l'utilisation de doses répétées de thérapie cellulaire allogénique et d'autre part l'utilisation chez les patients potentiellement éligibles à une transplantation cardiaque. Dans ce contexte, un des avantages des exosomes est qu'ils

sont acellulaires donc probablement moins immunogène que les CDCS ou les cardiosphères. Dans cette étude, nous nous sommes placés dans le cas de figure le plus défavorable, à savoir l'utilisation d'une thérapie xénogénique (utilisation d'exosomes humains) chez des porcs non immunodéprimés. Il a été démontré précédemment que la thérapie cellulaire xénogénique par CDCs est inefficace et hautement immunogène. Cependant, au cours de notre travail, avec les exosomes xénogéniques, nous avons reproduit le bénéfice observé avec les cellules autologues ou allogéniques, et ce, sans effet secondaire notable. En effet, nous n'avons observé qu'une réponse immunitaire de grade 1, réponse qui a été observée chez les animaux traités mais également chez les animaux contrôles. Ces données suggèrent que cette réponse inflammatoire est potentiellement d'avantage liée à la ponction par l'aiguille ou à la solution IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) utilisée pour resuspendre les exosomes et comme placebo, qu'aux exosomes eux-mêmes. Etant donné ces résultats favorables observés dans la situation la plus risquée (thérapie xénogénique), il est raisonnable de penser que l'utilisation de ces exosomes chez l'Homme (en allogénique) sera sans risque. La présence des anticorps observés chez les animaux traités est difficile à interpréter étant donné que ces anticorps ont également été observés chez les animaux contrôle bien qu'à des taux plus faibles. La question de l'action de ces anticorps sur la sécurité et l'efficacité de dose répétées d'exosomes reste ouverte et nécessitera des études additionnelles. Ces études seront nécessaires étant donnée la nécessité probable de doses répétées dans les pathologies comportant une dégénérescence myocardique évolutive (comme les cardiomyopathies d'origine génétique).

Limitations

Ce travail a plusieurs limitations. Tout d'abord, les animaux utilisés pour toutes les expériences sont des animaux jeunes et en bonne santé. Par conséquent leurs capacités à générer de nouveaux tissus est potentiellement supérieure à celles de patients âgés souffrant de maladies cardiovasculaires et présentant plusieurs comorbidités. L'effet des cellules et des exosomes sur des cellules sénescentes avec un contenu génétique et épigénétique altéré pourrait être moindre bien que certaines études récentes tendent à prouver le contraire.

Ensuite, la rétention des cellules et des exosomes n'a pas été évaluée de manière quantitative, rendant indirect les arguments en faveur d'une meilleur délivrance et rétention comme étant à l'origine de l'effet potentiellement supérieur des cardiosphères par rapport aux CDCs. L'effet des cardiosphères pourraient être en rapport avec une meilleure rétention que celui des cellules isolées, à une plus grande sécrétion de facteurs de croissance ou aux deux. Cependant la relation entre la rétention cellulaire et l'effet bénéfique sur le long terme reste controversée.

Enfin, dans les études d'ischémie-reperfusion, les paramètres de volume et de fonction ventriculaire gauche ont été évalués par ventriculographie et non par IRM qui est la technique de référence, en raison de l'impossibilité de réaliser une IRM entre la reperfusion et l'administration du traitement. Cependant, les critères principaux de jugement de cette étude étaient la taille de l'infarctus et la taille de l'obstruction micro-vasculaire, ces deux éléments ayant été évalués par la technique de référence qu'est l'histologie.

Conclusions et perspectives

Dans cette thèse, nous avons confirmé la capacité des cellules souches d'origine cardiaque et de leurs dérivés à limiter les conséquences myocardiques de l'infarctus du myocarde aussi bien en phase aiguë que dans l'infarctus constitué. Ces effets sont liés notamment à des propriétés anti-fibrotiques et anti-inflammatoires importantes qui peuvent être très intéressantes dans des pathologies d'évolution chronique et à bas bruit telles que les cardiomyopathies dilatées ou l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée.

De plus nous avons confirmé que ces effets sont liés à la sécrétion d'exosomes, ces derniers étant suffisants pour reproduire le bénéfice de la thérapie cellulaire. Par les modifications d'expression génique qu'ils vont entraîner sur les cellules filles, incluant une modification des exosomes secrétés par celles-ci, ces exosomes vont être responsable de l'amplification en cascade des effets de la thérapie cellulaire, permettant de réconcilier la survie cellulaire faible observée et les effets prolongés de ces cellules.

Enfin, nous avons précisé les modalités d'administration de ces différentes thérapeutiques en démontrant que des particules de grosse taille peuvent être administrées sans risque par voie intra-coronaire sous réserve de l'optimisation de la taille de ces particules et de la technique d'administration. A contrario, les exosomes qui sont des particules nanométriques sont de trop petite taille pour être administrées par voie intra-coronaire et nécessitent une injection intra-myocardique directe.

Plusieurs paramètres restent à évaluer. Tout d'abord, l'administration répétée de produits cellulaires semble avoir un intérêt clinique. Les résultats de nos études ne permettent pas de conclure avec certitude quant à la totale sécurité de l'administration de plusieurs doses étant donnés les taux d'anticorps observés. Ensuite, l'administration par voie intra-myocardique des exosomes rend impossible leur utilisation tel quel en phase aiguë d'infarctus et d'autres méthodes d'administration associées à des techniques de manufactures améliorant la rétention (encapsulage par exemple) doivent être évaluées. Enfin, ces études doivent permettre la mise en route d'essais chez l'Homme évaluant ces produits dans la prise en charge de l'infarctus. Ceux-ci permettront de confirmer ou d'infirmer ces résultats, ouvrant éventuellement la voie à une utilisation large.

AUTRES PUBLICATIONS ASSOCIEES

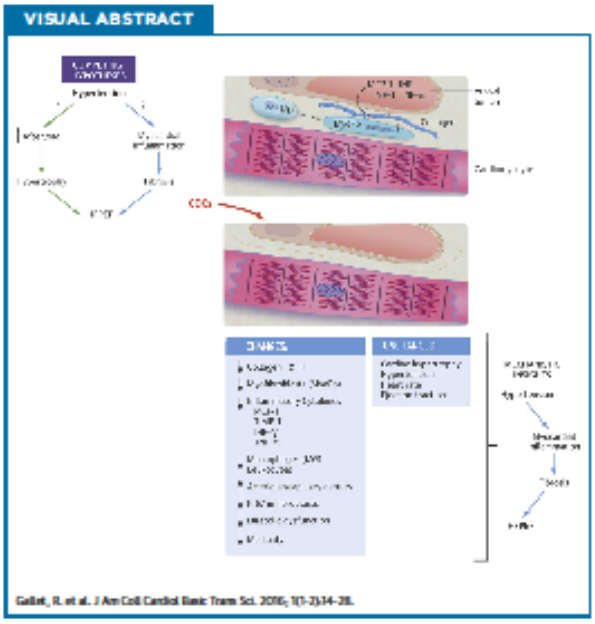
JACC: BASIC TO TRANSLATIONAL SCIENCE
VOL. 1, NO. 1-2, 2016
ISSN 2452-302X
http://dx.doi.org/10.1016/j.jacbts.2016.01.003
© 2016 THE AUTHORS. PUBLISHED BY ELSEVIER ON BEHALF OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY FOUNDATION. THIS IS AN OPEN ACCESS ARTICLE UNDER THE CC BY-NC-ND LICENSE (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

PRE-CLINICAL RESEARCH

Cardiosphere-Derived Cells Reverse Heart Failure With Preserved Ejection Fraction in Rats by Decreasing Fibrosis and Inflammation

Romain Gallet, MD,[a] Geoffrey de Couto, PhD,[a] Eli Simsolo, BS,[a] Jackelyn Valle, BS,[a] Baiming Sun, MD,[a] Weixin Liu, MS,[a] Eleni Tseliou, MD,[a] Michael R. Zile, MD,[b] Eduardo Marbán, MD, PhD[a]

VISUAL ABSTRACT



Gallet, R. et al. J Am Coll Cardiol Basic Trans Sci. 2016; 1(1-2):14-28.

HIGHLIGHTS

- The pathogenesis of heart failure with a preserved ejection fraction (HFpEF) is unclear.
- Cardiosphere-derived cells (CDCs) are heart-derived cell products with anti-fibrotic and anti-inflammatory properties, which have been implicated in HFpEF.
- Dahl salt-sensitive rats were fed a high-salt diet for 6 to7 weeks and randomized to receive intracoronary CDCs or placebo.
- Following CDC treatment, diastolic dysfunction resolved in treated rats but not in the placebo group. Treatment with CDCs also lower LV end-diastolic pressure, decrease lung congestion, and enhance survival.
- CDC treatment decreased LV fibrosis and inflammatory infiltrates, and reversed many of the transcriptomic changes associated with HFpEF, but had no effect on cardiac hypertrophy.
- By selectively reversing inflammation and fibrosis, CDCs may be beneficial in the treatment of HFpEF.

From the [a]Cedars-Sinai Heart Institute, Los Angeles, California; and the [b]Medical University of South Carolina and Ralph H. Johnson Department of Veterans Affairs Medical Center, Charleston, South Carolina. This study was funded by the Cedars-Sinai Board of Governors Heart Stem Cell Center. General support for the laboratory is provided by the National Institutes of Health. Dr. Gallet has received a grant from the French Society of Cardiology. Dr. Marbán owns equity in Capricor Inc. Dr. Zile has received consulting fees from Capricor Inc. as an external advisor. All other authors have reported that they have no relationships relevant to the contents of this paper to disclose. Drs. Gallet and de Couto contributed equally to this work.

Manuscript received December 3, 2015; revised manuscript received December 18, 2015, accepted December 21, 2015.

JACC: BASIC TO TRANSLATIONAL SCIENCE VOL. 1, NO. 1-2, 2016
JANUARY/FEBRUARY 2016:14–28

SUMMARY

The pathogenesis of heart failure with a preserved ejection fraction (HFpEF) is unclear. Myocardial fibrosis, inflammation, and cardiac hypertrophy have been suggested to contribute to the pathogenesis of HFpEF. Cardiosphere-derived cells (CDCs) are heart-derived cell products with antifibrotic and anti-inflammatory properties. This study tested whether rat CDCs were sufficient to decrease manifestations of HFpEF in hypertensive rats. Starting at 7 weeks of age, Dahl salt-sensitive rats were fed a high-salt diet for 6 to 7 weeks and randomized to receive intracoronary CDCs or placebo. Dahl rats fed normal chow served as controls. High-salt rats developed hypertension, left ventricular (LV) hypertrophy, and diastolic dysfunction, without impairment of ejection fraction. Four weeks after treatment, diastolic dysfunction resolved in CDC-treated rats but not in placebo. The improved LV relaxation was associated with lower LV end-diastolic pressure, decreased lung congestion, and enhanced survival in CDC-treated rats. Histology and echocardiography revealed no decrease in cardiac hypertrophy after CDC treatment, consistent with the finding of sustained, equally-elevated blood pressure in CDC- and placebo-treated rats. Nevertheless, CDC treatment decreased LV fibrosis and inflammatory infiltrates. Serum inflammatory cytokines were likewise decreased after CDC treatment. Whole-transcriptome analysis revealed that CDCs reversed changes in numerous transcripts associated with HFpEF, including many involved in inflammation and/or fibrosis. These studies suggest that CDCs normalized LV relaxation and LV diastolic pressure while improving survival in a rat model of HFpEF. The benefits of CDCs occurred despite persistent hypertension and cardiac hypertrophy. By selectively reversing inflammation and fibrosis, CDCs may be beneficial in the treatment of HFpEF. (J Am Coll Cardiol Basic Trans Sci 2016;1:14–28) © 2016 The Authors. Published by Elsevier on behalf of the American College of Cardiology Foundation. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) has become a major public health concern. Its increasing prevalence now exceeds that of heart failure with reduced ejection fraction (1–3). Outcomes of patients with HFpEF are poor (4,5), and so far, no treatment has been shown to decrease morbidity or mortality (3,6). HFpEF is associated with various cardiovascular risk factors (especially hypertension), extracardiac comorbidities, and aging. The net result is impaired diastolic relaxation and filling of the left ventricle, increased myocardial stiffness, impaired vascular compliance, and increased diastolic pressure (7,8). Myocardial fibrosis and inflammation have been associated with HFpEF (9–14) and with the transition from hypertensive left ventricular (LV) hypertrophy without HFpEF to hypertensive LV hypertrophy with HFpEF (15). Cardiosphere-derived cells (CDCs) are heart cell products with antifibrotic, anti-inflammatory, and angiogenic properties (16–20). CDCs, which are currently in phase 2 human trials for scar reduction after myocardial infarction (5), have been shown to be beneficial in models of ischemic (17,18,21) and nonischemic cardiomyopathy (16). Thus, we wondered whether CDCs might have disease-modifying activity in HFpEF.

Dahl salt-sensitive (DS) rats develop hypertension, hypertrophy, and, eventually, HFpEF on a high-salt diet (22–26). Increased fibrosis and inflammation

SEE PAGE 29

underlie the development of HFpEF, with resultant cachexia, pulmonary congestion, and accelerated mortality (22,26,27). Therefore, this model has been widely used to test new treatments for HFpEF (23,27–31). Here, we tested the efficacy of CDCs in improving LV structure and function and overall outcome in DS rats with HFpEF.

METHODS

An expanded "Methods" section is available in the Supplemental Appendix.

DS rats (Charles River, Wilmington, Massachusetts) were fed a 0.3% NaCl (low-salt) diet until 7 weeks of age. At that time, the diet was switched to an 8% NaCl (high-salt) diet in 54 rats by random assignment. DS rats fed the low-salt diet constituted the control group (n = 18). At 13 to 14 weeks of age, rats on the high-salt diet were randomized to

ABBREVIATIONS AND ACRONYMS

CDC = cardiosphere-derived cell

DS = Dahl salt-sensitive

E/A ratio = ratio of early to late ventricular filling velocity

HFpEF = heart failure with preserved ejection fraction

LV = left ventricular

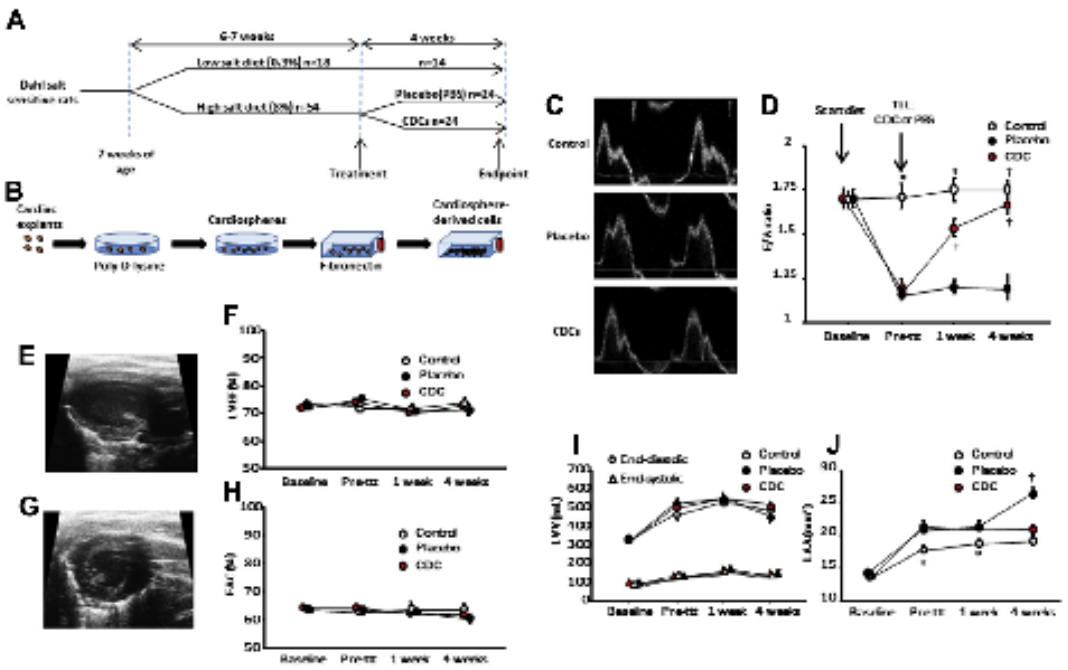
LVEDP = left ventricular end-diastolic pressure

LVEF = left ventricular ejection fraction

MMP = matrix metalloproteinase

TIMP = tissue inhibitor of metalloproteinase

FIGURE 1 Rat Model of HFpEF: Phenotype and Responsiveness to Treatment With Cardiosphere-Derived Cells



(A) Study design. (B) Cardiosphere-derived cell manufacturing protocol. (C) Representative images of transmitral flow by Doppler echocardiography at endpoint in control, placebo-treated, and cardiosphere-derived cell (CDC)-treated rats. (D) CDC treatment normalizes ratio of early to late ventricular filling velocity (E/A ratio) at 4 weeks, while the E/A ratio in placebo-treated rats remains depressed. Systolic function assessed by left ventricular ejection fraction (LVEF) (E,F) and by fractional area change (FAC) (G,H) is equivalent in all groups. Left ventricular end-diastolic and end-systolic volumes (I) are equivalent in all groups. (J) CDC treatment halts heart failure with preserved ejection fraction–related left atrial enlargement, while placebo does not. (Baseline and pre-treatment, n = 10 for control rats and n = 24 for placebo- and CDC-treated rats; 1 week post-treatment, n = 10 for control rats, n = 21 for placebo- and CDC-treated rats; at endpoint, n = 10 for control rats, n = 15 for placebo-treated rats, n = 18 for CDC-treated rats). *p < 0.05 versus placebo and CDC groups and †p < 0.05 versus placebo, both by analysis of variance. LAV = left atrial volume; LVV = left ventricular volume; PBS = phosphate-buffered saline; ttt = treatment.

receive allogeneic rat CDCs (5×10^5 resuspended in 100 µl phosphate-buffered saline) (Figure 1A) or vehicle (phosphate-buffered saline). CDCs were grown from a freshly explanted Wistar-Kyoto rat heart as previously described (19) (Figure 1B).

Echocardiography was performed at baseline, before treatment, and 1 and 4 weeks after treatment to assess systolic and diastolic function. Invasive hemodynamic measurements were performed at endpoint to record systemic pressure and LV pressures and volumes. Pressure-volume loops were generated from these recordings. Rats were then euthanized and hearts were harvested for analysis. Additional follow-up (7 rats in each group, randomly chosen from the rats alive at 4 weeks) was performed for extended survival analysis (up to 6 weeks) to investigate the longer term effects of treatment.

STATISTICAL ANALYSIS. Continuous variables are presented as mean ± SD in the text and mean ± SE in the figures. Categorical variables are expressed as absolute numbers and percentages. Normal distribution of variables was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test. If normality was established, independent groups (n = 2) were compared using unpaired Student *t* test, and multiple groups were compared using 1-way analysis of variance. For variables not normally distributed, the Mann-Whitney *U* test was used for comparisons of 2 groups, and the Kruskal-Wallis test

JACC: BASIC TO TRANSLATIONAL SCIENCE VOL. 1, NO. 1-2, 2016
JANUARY/FEBRUARY 2016:14–28

was used to compare multiple groups. Bonferroni correction was applied to every pairwise comparison performed after analysis of variance or the Kruskal-Wallis test. Survival analysis was performed using Kaplan-Meier analysis. A p value <0.05 was considered to indicate statistical significance.

RESULTS

BLOOD PRESSURE AND CARDIAC HYPERTROPHY. Table 1 shows characteristics of the high-salt and control animals at baseline and after 6 weeks of diet (13 weeks of age). As expected (25), rats fed a high-salt diet developed hypertension and cardiac hypertrophy after 6 weeks, but low-salt control rats did not. Those changes were associated with diastolic dysfunction, as shown by a decreased ratio of early (E) to late (A) ventricular filling velocity (E/A ratio) by echocardiography (1.7 ± 0.2 vs. 1.2 ± 0.2, p < 0.001), without any changes in LV volumes, LV ejection fraction (LVEF) or fractional area change (Table 1).

TABLE 1 Characteristics of Rats Fed High- and Low-Salt Diets Before (Baseline) and After 6 Weeks of Diet

	Baseline			6 Weeks		
	Low Salt	High Salt	p Value	Low Salt	High Salt	p Value
SBP (mm Hg)	NA	NA		133 ± 23	188 ± 17*	0.001
DBP (mm Hg)	NA	NA		92 ± 15	130 ± 12*	0.001
LVEF (%)	73.1 ± 4.8	73.0 ± 5.1	0.90	71.6 ± 3.8	74.4 ± 5.9	0.10
FAC (short axis) (%)	64.1 ± 3.0	64.2 ± 4.9	0.95	62.3 ± 4.6	63.2 ± 5.9	0.61
AW thickness (mm)	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.54	1.2 ± 0.1	1.8 ± 0.2*	<0.001
PW thickness (mm)	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	0.27	1.3 ± 0.1	2.0 ± 0.3*	<0.001
LVEDV (ml)	330 ± 46	329 ± 70	0.98	484 ± 112	510 ± 110	0.42
LVESV (ml)	89 ± 22	89 ± 28	0.98	142 ± 47	130 ± 50	0.37
E/A ratio	1.7 ± 0.2	1.7 ± 0.3	0.66	1.7 ± 0.2	1.2 ± 0.2*	<0.001
Left atrial area (mm²)	13.7 ± 1.9	14.1 ± 1.9	0.55	17.9 ± 1.7	21.2 ± 2.9*	<0.001
Heart weight (g)	NA	NA		1.42 ± 0.14	1.67 ± 0.10*	0.03
Heart weight/body weight (mg/g)	NA	NA		4.1 ± 0.4	5.2 ± 0.5*	0.016

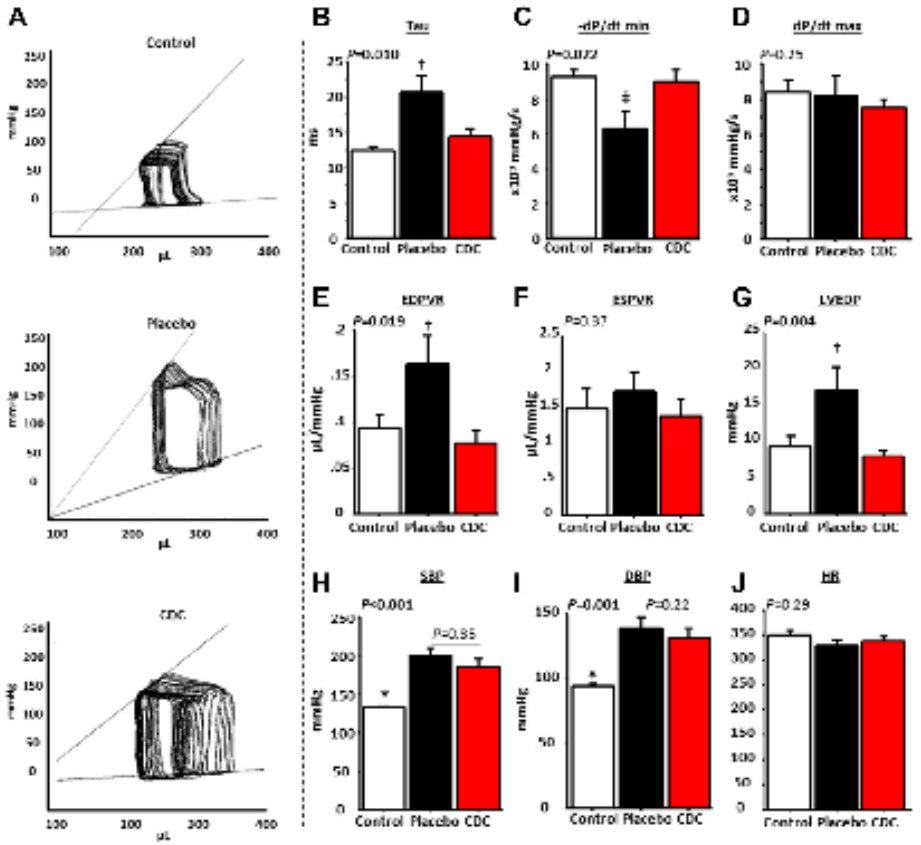
Values are mean ± SD. *p < 0.05 between high-salt and low-salt groups at 6 weeks.

AW = anterior wall; DBP = diastolic blood pressure; E/A ratio = ratio of early to late ventricular filling velocity; FAC = fractional area change; LVEDV = left ventricular end-diastolic volume; LVEF = left ventricular ejection fraction; LVESV = left ventricular end-systolic volume; NA = not available; PW = posterior wall; SBP = systolic blood pressure.

ECHOCARDIOGRAPHIC STUDIES: CDCs NORMALIZE E/A RATIO. Having confirmed the presence of cardiac hypertrophy and diastolic dysfunction, we randomly allocated rats to intracoronary CDC or vehicle infusion. Figure 1C shows representative images of transmitral flow at endpoint in control, placebo-treated, and CDC-treated animals. Pooled data (Figure 1D) revealed that after 6 weeks of diet but before treatment, E/A ratios were similar in the placebo and CDC groups but lower than in control rats. Likewise, left atrial size was higher in the high-salt-fed rats compared with control rats, indicating already increased LV filling pressure. After intracoronary infusion of CDCs (but not placebo), E/A ratio increased over time (Figure 1D), a change that was evident as soon as 1 week after treatment. At endpoint, E/A ratios had returned to control levels in CDC-treated animals (1.7 ± 0.2 for CDC-treated vs. 1.8 ± 0.16 for control rats, p = 0.36), whereas they remained depressed in placebo-treated animals (1.2 ± 0.3, p < 0.001 vs. CDC-treated rats and vs. control rats), indicating a likely normalization of LV relaxation with CDC treatment (an interpretation verified later by hemodynamic recordings). In addition, left atrial dimensions kept increasing in the placebo animals, while CDC treatment halted left atrial enlargement. In contrast, LVEF (measured in long-axis views) (Figures 1E and 1F), fractional area change (from short-axis views) (Figures 1G and 1H), and LV volumes (Figures 1I and 1J) were equivalent in all groups.

HEMODYNAMIC STUDIES: CDC TREATMENT NORMALIZES LV RELAXATION AND PREVENTS ELEVATION OF LV END-DIASTOLIC PRESSURE. Figure 2A shows representative recordings of pressure-volume loop families at endpoint. The time constant of isovolumic LV pressure fall (tau) was prolonged in placebo-treated animals compared with CDC-treated animals (21 ± 8 s vs. 13 ± 1 s in control rats [p = 0.011] and 14 ± 4 s in CDC-treated rats [p = 0.006]) (Figure 2B) and control rats, while −dP/dt minimum was lower, indicating impaired relaxation (Figure 2C) without changes in dP/dt maximum (Figure 2D). In parallel, pressure-volume loop analyses confirmed that LV distensibility was decreased in the placebo-treated animals, as demonstrated by the steeper slope of the end-diastolic pressure-volume relationship in placebo-treated animals compared with CDC-treated and control animals (Figure 2E), again without changes in the end-systolic pressure-volume relationship (Figure 2F). LVEDP was 2-fold higher in placebo-treated than in CDC-treated and control animals (17 ± 10 mm Hg vs. 9 ± 4 mm Hg in control rats [p = 0.015] and 8 ± 3 mm Hg in CDC-treated rats [p = 0.002]) (Figure 2G). The normalization of LVEDP and tau in CDC-treated rats confirms that the increase of E/A ratio over time in this group was due to normalization of LV relaxation rather than to progression toward a pseudonormal pattern of transmitral flow (which

FIGURE 2 Hemodynamic Analysis of Control (Low Salt), High Salt Placebo (HFpEF Phenotype), and High-Salt CDC-Treated Rats



(A) Representative pressure-volume (PV) loop recordings in control, placebo-treated, and cardiosphere-derived cell (CDC)-treated rats. CDCs normalize tau **(B)** and −dP/dt minimum **(C)** in rats with heart failure with preserved ejection fraction without change in dP/dt maximum **(D)**. PV loop analysis reveals normalization of the slope of the end-diastolic PV relationship (EDPVR) **(E)**, with no change in the end-systolic PV relationship (ESPVR) **(F)**. Left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) is normal in the CDC-treated but not the placebo-treated animals **(G)**. The differences between CDC- and placebo-treated rats are not related to changes in systolic blood pressure (SBP) **(H)** or diastolic blood pressure (DBP) **(I)** or heart rate (HR) **(J)** ($n = 8$ for control rats and $n = 12$ for placebo- and CDC-treated rats; for PV loop families, $n = 6$ for control rats, $n = 7$ for placebo-treated rats, and $n = 8$ for CDC-treated rats). *$p < 0.05$ versus placebo- and CDC-treated rats, †$p < 0.05$ versus control and CDC-treated rats, and ‡$p < 0.05$, all by analysis of variance.

would have been associated with increased LVEDP and tau [32]).

We did not observe any differences in blood pressure or heart rate between CDC- and placebo-treated animals that could have confounded relaxation and LVEDP measurements (although blood pressure was lower in the control group, as expected) (Figures 2H to 2J). Thus, the improvements in diastolic function were not due to antihypertensive or chronotropic effects of CDCs.

CDC TREATMENT IMPROVES SURVIVAL AND DECREASES LUNG CONGESTION. Consistent with the improvement of diastolic function, we observed a dramatic improvement of survival in CDC-treated rats (Kaplan-Meier survival curves) (Figure 3A) (log-rank

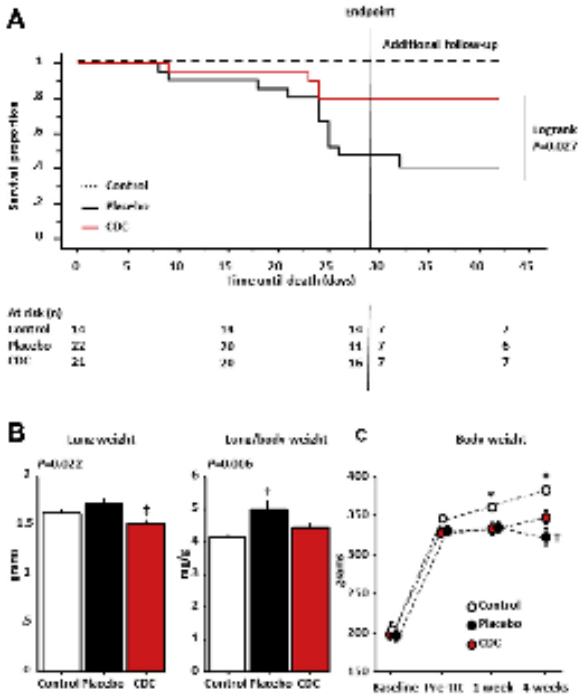
JACC: BASIC TO TRANSLATIONAL SCIENCE VOL. 1, NO. 1-2, 2016
JANUARY/FEBRUARY 2016:14–28

p = 0.027). Post-mortem lung weight and lung weight/body weight ratios were higher in placebo-treated rats, indicative of pulmonary congestion (Figure 3B). In parallel, Figure 3C shows that animals treated with CDCs resumed some physiological weight gain, while placebo rats lost weight, presumably because of cardiac cachexia (an impression that was confirmed visually).

MECHANISM. Improvement of LV relaxation is not associated with quantitative changes in cardiac hypertrophy. LV hypertrophy (both macroscopic and cellular) can occur with or without diastolic dysfunction. We quantified cardiac hypertrophy using LV wall thickness by echocardiography, heart weight, and cardiomyocyte cross-sectional area. Notably, the CDC-related improvement in diastolic function was not due to a decrease in cardiac hypertrophy: wall thickness by echocardiography (Figure 4A), as well as post-mortem heart weight and cardiomyocyte cross-sectional area (Figure 4B), remained equivalent in the CDC and placebo groups. Thus, CDCs were salutary without decreasing cardiac hypertrophy.

Antifibrotic effect of CDCs. Fibrosis is increased in HFpEF (10,12,33). We assessed fibrosis using picrosirius red staining for total collagen and semiquantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction to measure transcript levels for collagen 1 and 3. Figure 5A shows representative images of hearts stained with picrosirius red. Overall LV and right ventricular fibrosis was 2-fold higher in placebo- versus CDC-treated rats; fibrosis in the latter approached control values (Figures 5B and 5C). Concomitantly, collagen 1 and collagen 3 in the left ventricle (quantified by western blot) were higher in placebo-treated rats than in control or CDC-treated rats (Figure 5D). Moreover, cardiac myofibroblasts increased dramatically in placebo-treated, but not in CDC-treated, DS rats (Figure 5E). Also, transcript levels of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-7, MMP-9, and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 as well as collagen 1A1 and collagen 3 were higher in the placebo-treated animals compared with the control and CDC-treated animals (which had similar levels) (Supplemental Figure 1). These increased transcript levels are suggestive of increased extracellular matrix turnover associated with HFpEF, which is normalized by CDC treatment. Because we did not measure the extent of fibrosis before treatment, we cannot distinguish between CDC-induced prevention of new fibrosis and regression of established fibrosis in the present study. However, previous work in chronic myocardial infarction models (20,21,34) and in humans (35,36) has shown that CDCs (and cardiospheres) can reduce established scar.

FIGURE 3 Effects of CDCs on Mortality and Heart Failure

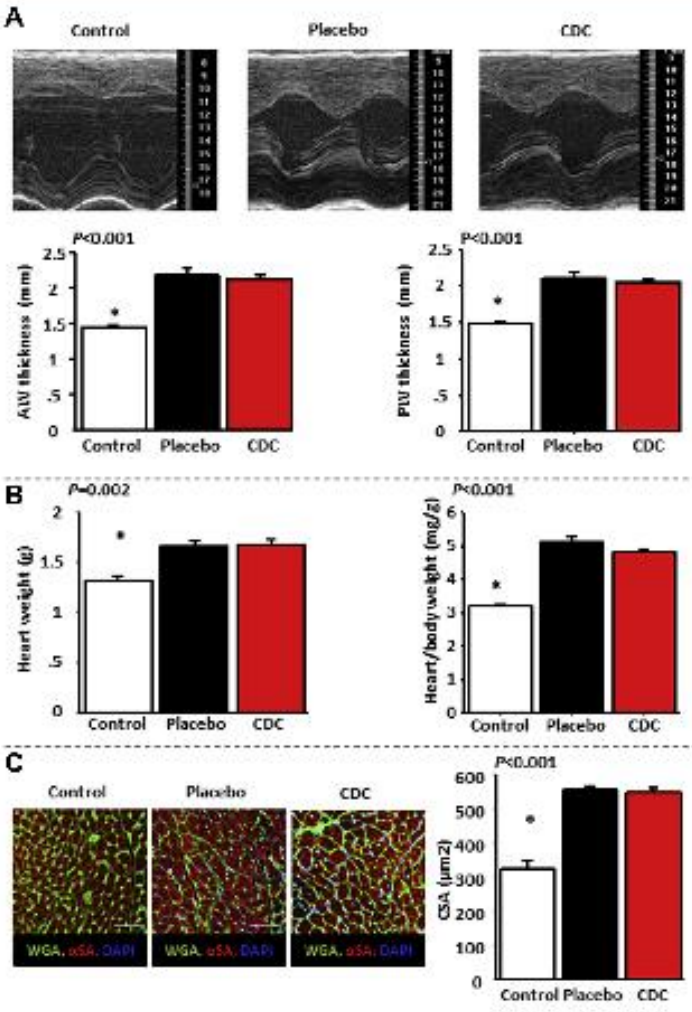


Cardiosphere-derived cell (CDC) treatment improves survival (A; X axis shows days from treatment, or equivalent age in control rats) and pulmonary congestion (B) (lung weight [left] and lung weight/body weight [right]) in rats with heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF). (C) At endpoint, body weight loss induced by HFpEF is partially restored by CDC treatment (n = 10 for control rats, n = 15 for placebo-treated rats, and n = 18 for CDC-treated rats). Log-rank for CDCs versus placebo. *p < 0.05 versus placebo- and CDC-treated rats, †p < 0.05 versus control and CDC-treated rats, and ‡p < 0.05 versus placebo-treated rats, all by analysis of variance. ttt = treatment.

Attenuation of inflammation. HFpEF is associated with increased levels of circulating cytokines and infiltration of macrophages and other inflammatory cells in the heart (9). Quantification of cytokines in the serum revealed lower levels of proinflammatory and profibrotic cytokines in CDC-treated rats compared with placebo-treated rats; the levels in CDC-treated rats were comparable with those in

JACC: BASIC TO TRANSLATIONAL SCIENCE VOL. 1, NO. 1-2, 2016
JANUARY/FEBRUARY 2016:14–30

FIGURE 4 Benefit of Cardiosphere-Derived Cell Treatment Is Not Related to Decreased Cardiac Hypertrophy



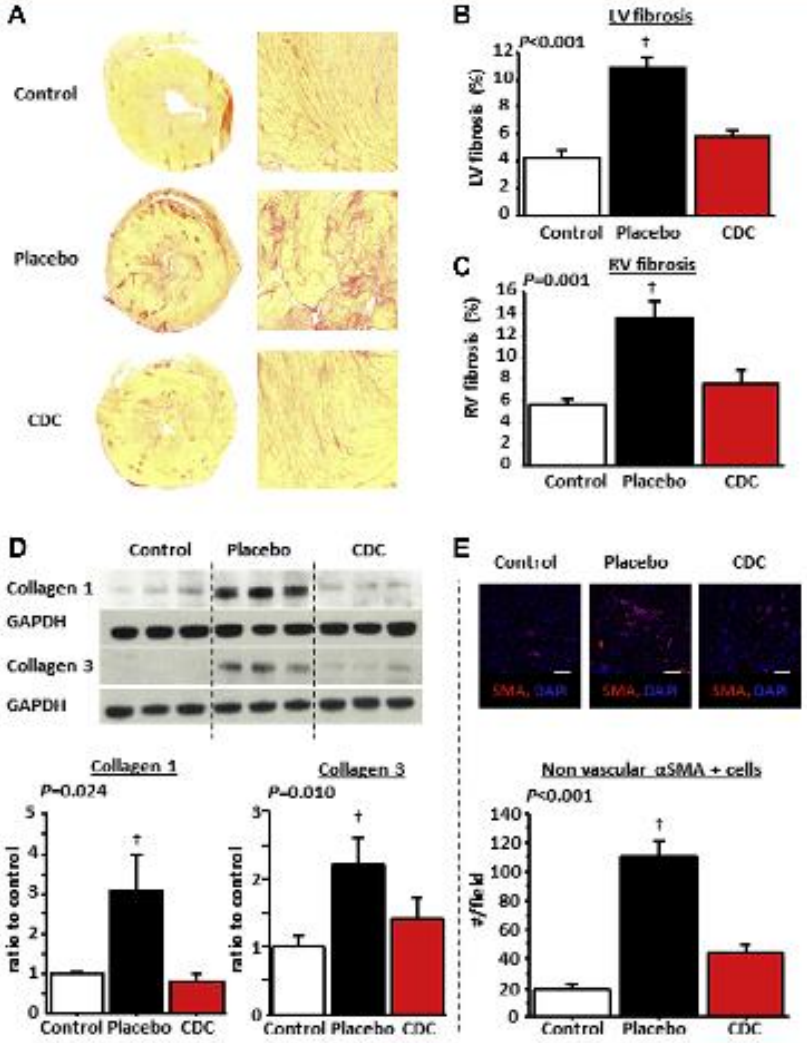
Cardiac anterior wall (AW) and posterior wall (PW) thickness by echocardiography (**A**), heart weight and heart weight/body weight ratio (**B**), and cross-sectional cardiomyocyte area (CSA) (**C**) are equally elevated in placebo- and cardiosphere-derived cell (CDC)-treated rats relative to control. n = 10 for control rats, n = 15 for placebo-treated rats, and n = 18 for CDC-treated rats in A; n = 6, n = 11, and n = 14, respectively, in B; n = 5 in each group in C. *p < 0.05 versus placebo- and CDC-treated rats by analysis of variance.

control rats (Figure 6A). Among those cytokines, some have been linked to the development of HFpEF (especially monocyte chemotactic protein-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor-α) and to the accumulation of collagen (TIMP-1) (12,37). CDC treatment was also associated with a 2-fold reduction of macrophages (CD68-positive cells) and leukocytes (CD45-positive cells) in the heart compared with placebo, approaching control levels (Figure 6B).

Vessel density and cell proliferation. Because microvascular rarefaction has been associated with HFpEF in numerous studies (38–40), we investigated

JACC: BASIC TO TRANSLATIONAL SCIENCE VOL. 1, NO. 1-2, 2016
JANUARY/FEBRUARY 2016:14–28

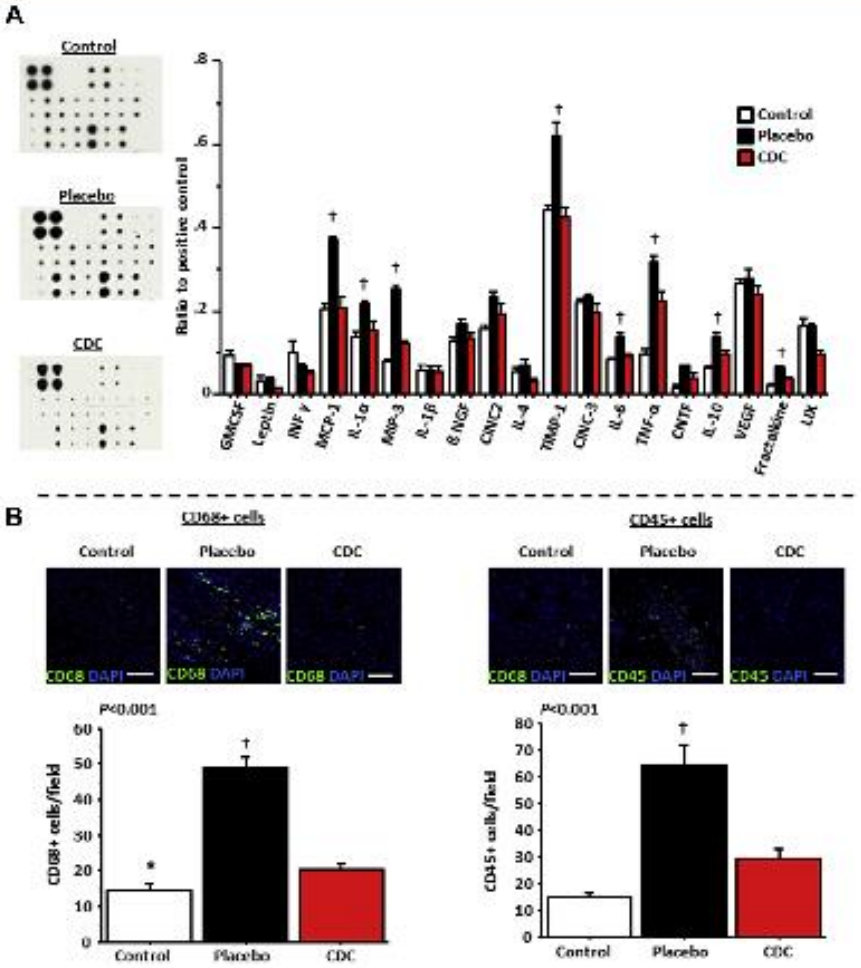
FIGURE 5 Antifibrotic Effects Underlie the Benefits of CDCs in HFpEF



(A) Representative heart sections stained with picrosirius red in control, placebo-treated, and cardiosphere-derived cell (CDC)-treated rats. Left ventricular (LV) fibrosis (B) and right ventricular (RV) fibrosis (C) quantified from such images is higher in placebo- than in CDC-treated and control rats. (D) Collagen 1A1 and collagen 3 content is higher in placebo- than in CDC-treated and control rats. (E) Immunostaining for α-smooth muscle actin (SMA) in control and placebo- and CDC-treated rats. Myofibroblast infiltration into the heart is higher in placebo- than in CDC-treated and control rats. n = 6 to 8 in each group. †p < 0.05 versus control and CDC-treated rats by analysis of variance.

arteriolar and capillary density in the left ventricle (Figure 7A). Both vascular densities were lower in placebo-treated rats compared with control rats (Figures 7B and 7C); CDC treatment normalized arteriolar density and significantly increased capillary density compared with placebo, although capillary density did not reach the value measured in control rats. Parallel measurements of cell proliferation using

FIGURE 6 Anti-Inflammatory Effects of CDCs in HFpEF



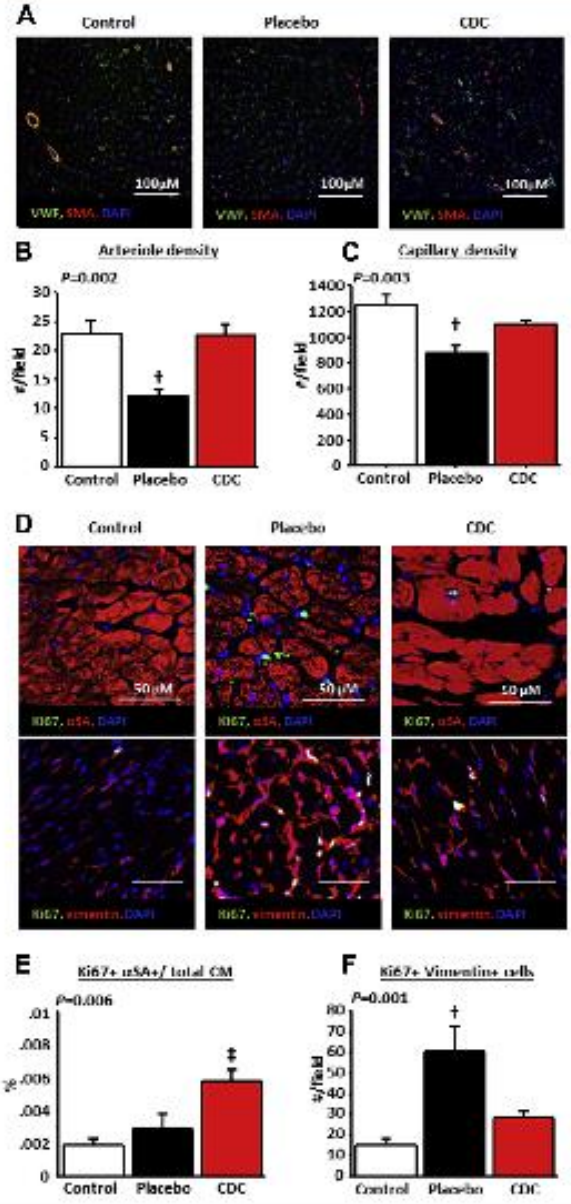
(A) Cardiosphere-derived cell (CDC) treatment normalizes the expression of proinflammatory and profibrotic cytokines in serum, including tumor necrosis factor (TNF)-α, interleukin (IL)-6, monocyte chemotactic protein (MCP)-1, and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 ($n = 4$ in each group). (B) CDC treatment decreases myocardial infiltration by macrophages (CD68) and leukocytes (CD45) in the left ventricle ($n = 5$ in each group). *$p < 0.05$ versus placebo- and CDC-treated rats and †$p < 0.05$ versus control and CDC-treated rats, by nonparametric tests for (A) and by analysis of variance for (B). CINC = cytokine-induced neutrophil chemoattractant; CINC = cytokine-induced neutrophil chemoattractant; CNTF = ciliary neurotrophic factor; GMCSF = granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; INF = interferon; IL = interleukin; NGF = nerve growth factor; VEGF = vascular endothelial growth factor.

Ki67 immunostaining (Figure 7D) revealed that CDCs stimulated cardiomyocyte proliferation (cells positive for both α-sarcomeric actinin and Ki67) (Figure 7E). In contrast, the number of proliferating fibroblasts (Ki67-positive, vimentin-positive cells) was greatly increased in placebo-treated (but not CDC-treated) high-salt DS rat hearts relative to low-salt control rats (Figure 7F).

Next-generation ribonucleic acid sequencing. Next-generation sequencing was performed in the

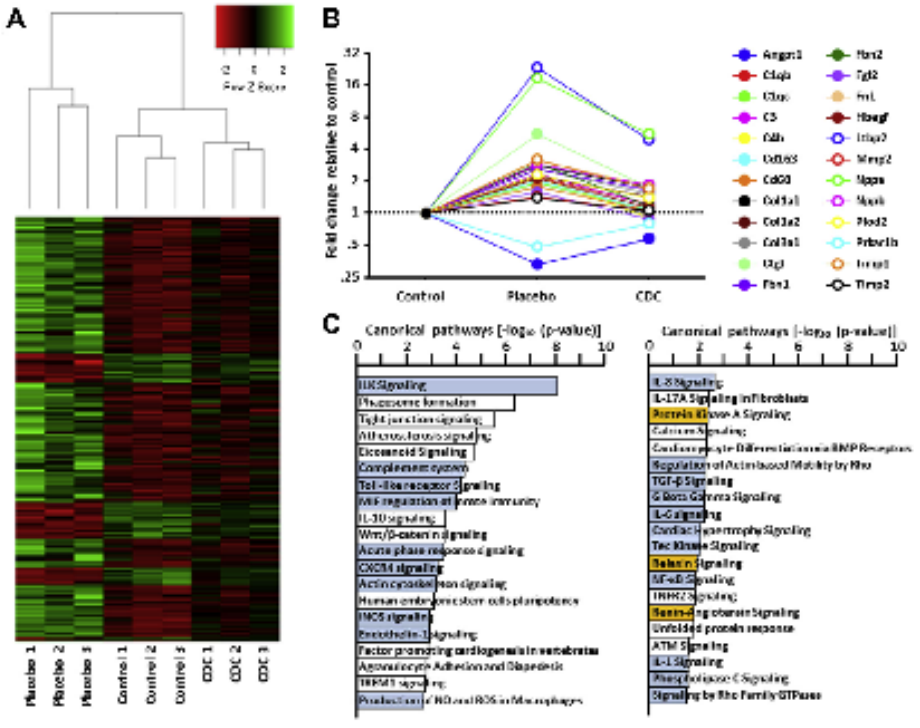
JACC: BASIC TO TRANSLATIONAL SCIENCE VOL. 1, NO. 1-2, 2016
JANUARY/FEBRUARY 2016:14–28

FIGURE 7 Microvascular Density and Cardiopoiesis Are Enhanced by CDCs, While Fibroblast Proliferation Is Suppressed



(**A**) Immunostaining for von Willebrand factor (VWF) and smooth muscle actin (SMA) in control, placebo-treated, and cardiosphere-derived cell (CDC)-treated rats. CDC treatment increases arteriolar (**B**) and capillary (**C**) density in the left ventricle. (**D**) Immunostaining for Ki67 and α-actinin (SA) and for Ki67 and vimentin in control, placebo-treated, and CDC-treated rats. CDC treatment increased cardiomyocyte (CM) proliferation (**E**) and decreased the proliferation of fibroblasts (**F**) compared with placebo. n = 5 in each group. †p < 0.05 versus control and CDC-treated rats, both by analysis of variance; ‡p < 0.05 versus control and placebo-treated rats. DAPI = 4′,6-diamidino-2-phenylindole.

FIGURE 8 Transcriptomic Analysis Reveals Profound CDC-Responsive Changes of Gene Expression in HFpEF



(A) Heat map showing the transcripts that are up- or downregulated by heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) and normalized partially or completely by cardiosphere-derived cell (CDC) treatment. (B) Selected genes involved in inflammation and fibrosis or associated with HFpEF that are rescued by CDC treatment (abbreviations in Supplemental Table 1). (C) Selected pathways modified by CDC treatment compared with placebo; **blue**, inhibited; **orange**, activated; **white**, not clear from the database (published research missing).

3 groups. Supplemental Figures 2A to 2C show head-to-head pairwise comparison of gene expression in the 3 groups. The heat maps reveal that the HFpEF phenotype is associated with major global changes in gene expression, as shown by the comparison between placebo and control groups (Supplemental Figure 2A). More important, the comparison between CDC- and placebo-treated rats (Supplemental Figure 2B) reveals that CDC treatment dramatically changed gene expression. Interestingly, >300 genes whose expression was up- or downregulated in HFpEF (i.e., in high-salt placebo hearts) had their expression levels "rescued" by CDC treatment (Figure 8A). Some of these transcript changes involved genes that underlie HFpEF-related pathophysiologic features that we and others have identified (a nonexhaustive list is shown in Figure 8B). Indeed, key genes involved in fibrosis, inflammation, and macrophage signaling, or associated with the consequences of HFpEF (brain natriuretic and atrial natriuretic peptides), were upregulated in placebo hearts but returned fully or partially to control levels after CDC treatment. These profound changes in the transcriptome reveal HFpEF-related activation, and CDC-induced inhibition, of key disease-associated signaling and effector pathways (Figure 8C).

DISCUSSION

The challenge of HFpEF is increasing as the population ages and comorbidities become more

JACC: BASIC TO TRANSLATIONAL SCIENCE VOL. 1, NO. 1-2, 2016
JANUARY/FEBRUARY 2016:14–28

prevalent. The HFpEF hospitalization rate is now greater than that for heart failure with reduced LVEF (3). So far, no treatment for HFpEF has proved effective (6). Here, we have demonstrated that cell therapy by CDCs can reverse the functional abnormalities of HFpEF and improve survival in a rat model of hypertension-induced HFpEF. The CDC-induced reversal of HFpEF occurred without a reduction in either blood pressure or cardiac hypertrophy. The selective correction of functional HFpEF abnormalities creates an unprecedented opportunity for mechanistic insights. Potentially causal pathways (i.e., those that accompany the abnormalities in HFpEF) can now be distinguished from those that are merely associative. Our findings support the concept that fibrosis and inflammation are causative in HFpEF (10): reductions in those 2 pathophysiological processes underlie the resolution of HFpEF, while hypertrophy and hypertension remain unchanged.

Cardiac hypertrophy has long been thought to be the linchpin in HFpEF (8,41,42). However, several recent studies in animal models and humans have implicated inflammation and collagen infiltration (10,12–14,43–45). Hypertension and other comorbidities can favor a systemic proinflammatory state with high circulating cytokine levels, including interleukin-6, tumor necrosis factor-α, and monocyte chemotactic protein-1 (9,10,37). Inflammation leads to activation, recruitment, and transendothelial migration of leukocytes and monocytes or macrophages into the heart. These inflammatory cells contribute to LV fibrosis by promoting the differentiation of fibroblasts into myofibroblasts (13,46,47). The resulting increase in LV collagen content is the main contributor to the increase in passive myocardial fiber stiffness, a major component of diastolic impairment in HFpEF (12). The observed phenotypic improvements after CDC treatment were associated with decreases in circulating inflammatory cytokines (including interleukin-6, tumor necrosis factor-α, and monocyte chemotactic protein-1) and less myocardial inflammation. In addition, myofibroblast infiltration, collagen content, and collagen production were increased in placebo-treated animals but fell markedly after CDC treatment. The parallel decrease in transcripts for MMPs and TIMPs (Supplemental Figure 1) suggests, but does not prove, increased extracellular matrix turnover in the placebo-treated animals that is normalized by CDC treatment. Increased extracellular matrix turnover in HFpEF has been described, and MMPs and TIMPs have been suggested as biomarkers for the diagnosis and prognosis of HFpEF (48–50). Taken together, these findings strengthen the hypothesis that proinflammatory and profibrotic stimuli play a major role in the development of HFpEF (10). Furthermore, our results suggest that modulating those stimuli may improve HFpEF phenotype and outcomes. The mechanism whereby CDCs modify inflammation and fibrosis clearly involves major changes in gene expression (Figure 8C). Such changes are long-lasting, as the transcriptome was analyzed 4 weeks after CDC injection (at which point injected allogeneic cells are no longer detectable) (18). Our working hypothesis posits that CDCs secrete exosomes laden with micro-ribonucleic acids and other noncoding ribonucleic acids that collectively mold the target transcriptome. Although in-depth exploration of this hypothesis is beyond the scope of this initial report, multiple lines of evidence in other models show that exosomes mediate the benefits of CDCs and modify phenotype and gene expression in recipient cells (51–53). We are intrigued by the possibility that the drastic changes in the expression of the genes involved in fibrosis and inflammation seen here may be in vivo manifestations of exosome-mediated phenotypic conversions such as those we have described in skin fibroblasts (52).

It is noteworthy that no changes in the magnitude of cardiac hypertrophy were observed after CDC treatment. Cardiac hypertrophy assessed using 3 different techniques (echocardiography, heart weight, and cardiomyocyte cross-sectional area) was present and virtually identical in both high-salt groups at endpoint but not in control rats. Here, decreased inflammation and fibrosis underlie the resolution of HFpEF, despite persistent hypertrophy and hypertension. Thus, attenuation of cardiac hypertrophy is not required to normalize diastolic function. Regarding the mechanical properties of the cardiomyocytes, we observed that CDCs enhance cardiomyocyte (but not fibroblast) proliferation. Nevertheless, the absolute number of new myocytes remains low, and cardiomyocytes remain hypertrophic after CDC treatment. Thus, the correction of altered mechanical properties is more likely related to intrinsic changes in preexisting cardiomyocytes than to a dominant effect of newly generated cardiomyocytes. Our ongoing characterization of cardiomyocytes isolated from the various groups is consistent with this prediction, but such studies are beyond the scope of this initial report.

Microvascular dysfunction and rarefaction have been reported as additional contributors to HFpEF. Several studies have shown that even in the absence of coronary artery disease, patients with HFpEF have fewer microvessels and lower coronary reserve (38-40). In addition to their anti-inflammatory and antifibrotic properties, CDCs are able to promote the growth of new vessels (18,21). We observed increases in the numbers of arterioles and capillaries in the left ventricle after CDC treatment (Figure 7). Although the vascular findings here are limited to histologic findings, we have previously demonstrated that cardiosphere-related increases in vessels by histology were associated with augmented myocardial perfusion and coronary reserve (54).

STUDY LIMITATIONS. HFpEF is a multifactorial disease involving aging and cardiovascular risk factors. Although DS rats reproduce most of the key features of HFpEF (including hypertension, inflammation, fibrosis, and microvascular rarefaction), some typical contributors to this disease (especially aging) are absent in this model. Also, our follow-up was relatively short. Because death and/or progression toward systolic dysfunction occurs in DS rats around 19 to 20 weeks of age (55,56), we decided to set the endpoint before the terminal decrease in LVEF, which might otherwise have confounded the analysis of HFpEF. Therefore, we have no information (other than the observed mortality benefit at 6 weeks) regarding the potential long-term persistence of the benefit. Regarding remodeling of the extracellular matrix, we have shown directionally appropriate changes in various transcripts and proteins, but we have not performed zymography to directly evaluate MMP activity. Finally, we have yet to demonstrate the involvement of exosomes and micro-ribonucleic acids in the dramatic changes observed after CDC treatment here. For now, the proposed mechanisms remain at the level of plausibility, as bolstered by previous studies (51,52).

CONCLUSIONS

CDCs normalized LV relaxation and improved survival in a rat model of HFpEF, without blunting hypertension or hypertrophy. Given that CDCs are already in advanced clinical testing for other indications (57), the present findings motivate clinical trials of CDCs in HFpEF.

REPRINT REQUESTS AND CORRESPONDENCE: Dr. Eduardo Marbán, Cedars-Sinai Heart Institute, 8700 Beverly Boulevard, Los Angeles, California 90048. E-mail: eduardo.marban@csmc.edu.

PERSPECTIVES

COMPETENCY IN MEDICAL KNOWLEDGE: Intracoronary CDC administration normalizes diastolic function and improves survival in rats with HFpEF. Reversal of inflammation and fibrosis, but not attenuation of cardiac hypertrophy, underlies these functional benefits.

TRANSLATIONAL OUTLOOK: Given that CDCs are already in advanced clinical testing for other indications, the present study motivates clinical trials of CDCs in HFpEF. Also, the selective correction of functional HFpEF abnormalities observed here creates an unprecedented opportunity for mechanistic insights.

REFERENCES

1. Hogg K, Swedberg K, McMurray J. Heart failure with preserved left ventricular systolic function; epidemiology, clinical characteristics, and prognosis. J Am Coll Cardiol 2004;43:317–27.

2. Lam CS, Donal E, Kraigher-Krainer E, Vasan RS. Epidemiology and clinical course of heart failure with preserved ejection fraction. Eur J Heart Fail 2011;13:18–28.

3. Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. N Engl J Med 2006;355:251–9.

4. Brouwers FP, de Boer RA, van der Harst P, et al. Incidence and epidemiology of new onset heart failure with preserved vs. reduced ejection fraction in a community-based cohort: 11-year follow-up of PREVEND. Eur Heart J 2013;34:1424–31.

5. Tribouilloy C, Rusinaru D, Mahjoub H, et al. Prognosis of heart failure with preserved ejection fraction: a 5 year prospective population-based study. Eur Heart J 2008;29:339–47.

6. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, et al. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. Eur Heart J 2012;33:1787–847.

7. Borlaug BA, Paulus WJ. Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment. Eur Heart J 2011;32:670–9.

8. Zile MR, Baicu CF, Gaasch WH. Diastolic heart failure—abnormalities in active relaxation and passive stiffness of the left ventricle. N Engl J Med 2004;350:1953–9.

9. Glezeva N, Baugh JA. Role of inflammation in the pathogenesis of heart failure with preserved ejection fraction and its potential as a therapeutic target. Heart Fail Rev 2014;19:681–94.

10. Paulus WJ, Tschope C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling

through coronary microvascular endothelial inflammation. J Am Coll Cardiol 2013;62:263–71.

11. van Empel V, Brunner-La Rocca HP. Inflammation in HFpEF: key or circumstantial? Int J Cardiol 2015;189:259–63.

12. Zile MR, Baicu CF, Ikonomidis JS, et al. Myocardial stiffness in patients with heart failure and a preserved ejection fraction: contributions of collagen and titin. Circulation 2015;131:1247–59.

13. Westermann D, Lindner D, Kasner M, et al. Cardiac inflammation contributes to changes in the extracellular matrix in patients with heart failure and normal ejection fraction. Circ Heart Fail 2011;4:44–52.

14. Kasner M, Westermann D, Lopez B, et al. Diastolic tissue Doppler indexes correlate with the degree of collagen expression and cross-linking in heart failure and normal ejection fraction. J Am Coll Cardiol 2011;57:977–85.

15. Dorn GW II. The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. Hypertension 2007;49:962–70.

16. Aminzadeh MA, Tseliou E, Sun B, et al. Therapeutic efficacy of cardiosphere-derived cells in a transgenic mouse model of non-ischaemic dilated cardiomyopathy. Eur Heart J 2015;36:751–62.

17. de Couto G, Liu W, Tseliou E, et al. Macrophages mediate cardioprotective cellular postconditioning in acute myocardial infarction. J Clin Invest 2015;125:3147–62.

18. Malliaras K, Li TS, Luthringer D, et al. Safety and efficacy of allogeneic cell therapy in infarcted rats transplanted with mismatched cardiosphere-derived cells. Circulation 2012;125:100–12.

19. Smith RR, Barile L, Cho HC, et al. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. Circulation 2007;115:896–908.

20. Tseliou E, Reich H, de Couto G, et al. Cardiospheres reverse adverse remodeling in chronic rat myocardial infarction: roles of soluble endoglin and Tgf-beta signaling. Basic Res Cardiol 2014;109:443.

21. Malliaras K, Smith RR, Kanazawa H, et al. Validation of contrast-enhanced magnetic resonance imaging to monitor regenerative efficacy after cell therapy in a porcine model of convalescent myocardial infarction. Circulation 2013;128:2764–75.

22. Doi R, Masuyama T, Yamamoto K, et al. Development of different phenotypes of hypertensive heart failure: systolic versus diastolic failure in Dahl salt-sensitive rats. J Hypertens 2000;18:111–20.

23. Horgan S, Watson C, Glezeva N, Baugh J. Murine models of diastolic dysfunction and heart failure with preserved ejection fraction. J Card Fail 2014;20:984–95.

24. Koshizuka R, Ishizu T, Kameda Y, Kawamura R, Seo Y, Aonuma K. Longitudinal strain impairment as a marker of the progression of heart failure with preserved ejection fraction in a rat model. J Am Soc Echocardiogr 2013;26:316–23.

25. Masuyama T, Yamamoto K, Sakata Y, et al. Evolving changes in Doppler mitral flow velocity pattern in rats with hypertensive hypertrophy. J Am Coll Cardiol 2000;36:2333–8.

26. Ishizu T, Seo Y, Kameda Y, et al. Left ventricular strain and transmural distribution of structural remodeling in hypertensive heart disease. Hypertension 2014;63:500–6.

27. Bowen TS, Rolim NP, Fischer T, et al. Heart failure with preserved ejection fraction induces molecular, mitochondrial, histological, and functional alterations in rat respiratory and limb skeletal muscle. Eur J Heart Fail 2015;17:263–72.

28. Bee S, Yalamarti B, Ke Q, et al. Preventing progression of cardiac hypertrophy and development of heart failure by paricalcitol therapy in rats. Cardiovasc Res 2011;91:632–9.

29. Kim S, Yoshiyama M, Izumi Y, et al. Effects of combination of ACE inhibitor and angiotensin receptor blocker on cardiac remodeling, cardiac function, and survival in rat heart failure. Circulation 2001;103:148–54.

30. Rimbaud S, Ruiz M, Piquereau J, et al. Resveratrol improves survival, hemodynamics and energetics in a rat model of hypertension leading to heart failure. PLoS One 2011;6:e26391.

31. Yazawa H, Miyachi M, Furukawa M, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition promotes coronary angiogenesis in the failing heart of Dahl salt-sensitive hypertensive rats. J Card Fail 2011;17:1041–50.

32. Appleton CP, Hatle LK, Popp RL. Relation of transmitral flow velocity patterns to left ventricular diastolic function: new insights from a combined hemodynamic and Doppler echocardiographic study. J Am Coll Cardiol 1988;12:426–40.

33. Kai H, Kuwahara F, Tokuda K, Imaizumi T. Diastolic dysfunction in hypertensive hearts: roles of perivascular inflammation and reactive myocardial fibrosis. Hypertens Res 2005;28:483–90.

34. Tseliou E, de Couto G, Terrovitis J, et al. Angiogenesis, cardiomyocyte proliferation and anti-fibrotic effects underlie structural preservation post-infarction by intramyocardially-injected cardiospheres. PLoS One 2014;9:e88590.

35. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. Lancet 2012;379:895–904.

36. Malliaras K, Makkar RR, Smith RR, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells after myocardial infarction: evidence of therapeutic regeneration in the final 1-year results of the CADUCEUS trial (Cardiosphere-Derived Autologous Stem Cells to Reverse Ventricular Dysfunction). J Am Coll Cardiol 2014;63:110–22.

37. Collier P, Watson CJ, Voon V, et al. Can emerging biomarkers of myocardial remodelling identify asymptomatic hypertensive patients at risk for diastolic dysfunction and diastolic heart failure? Eur J Heart Fail 2011;13:1087–95.

38. Goligorsky MS. Microvascular rarefaction: the decline and fall of blood vessels. Organogenesis 2010;6:1–10.

39. Hoenig MR, Bianchi C, Rosenzweig A, Sellke FW. The cardiac microvasculature in hypertension, cardiac hypertrophy and diastolic heart failure. Curr Vasc Pharmacol 2008;6:292–300.

40. Mohammed SF, Hussain S, Mirzoyev SA, Edwards WD, Maleszewski JJ, Redfield MM. Coronary microvascular rarefaction and myocardial fibrosis in heart failure with preserved ejection fraction. Circulation 2015;131:550–9.

41. Shah AM, Pfeffer MA. The many faces of heart failure with preserved ejection fraction. Nat Rev Cardiol 2012;9:555–6.

42. Maurer MS, King DL, El-Khoury Rumbarger L, Packer M, Burkhoff D. Left heart failure with a normal ejection fraction: identification of different pathophysiologic mechanisms. J Card Fail 2005;11:177–87.

43. Desai AS. Heart failure with preserved ejection fraction: time for a new approach? J Am Coll Cardiol 2013;62:272–4.

44. Kuwahara F. Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. Circulation 2002;106:130–6.

45. Melendez GC, McLarty JL, Levick SP, Du Y, Janicki JS, Brower GL. Interleukin 6 mediates myocardial fibrosis, concentric hypertrophy, and diastolic dysfunction in rats. Hypertension 2010;56:225–31.

46. Nicoletti A, Heudes D, Mandet C, Hinglais N, Bariety J, Michel JB. Inflammatory cells and myocardial fibrosis: spatial and temporal distribution in renovascular hypertensive rats. Cardiovasc Res 1996;32:1096–107.

47. Sciarretta S, Ferracci A, Ciavarella GM, et al. Markers of inflammation and fibrosis are related to cardiovascular damage in hypertensive patients with metabolic syndrome. Am J Hypertens 2007;20:784–91.

48. Zouein FA, de Castro Brás LE, da Costa DV, Lindsey ML, Kurdi M, Booz GW. Heart failure with preserved ejection fraction: emerging drug strategies. J Cardiovasc Pharmacol 2013;62:13–21.

49. Zile MR, Desantis SM, Baicu CF, et al. Plasma biomarkers that reflect determinants of matrix composition identify the presence of left ventricular hypertrophy and diastolic heart failure. Circ Heart Fail 2011;4:246–56.

50. Zannad F, Rossignol P, Iraqi W. Extracellular matrix fibrotic markers in heart failure. Heart Fail Rev 2010;15:319–29.

51. Ibrahim AG, Cheng K, Marban E. Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy. Stem Cell Reports 2014;2:606–19.

52. Tseliou E, Fouad J, Reich H, et al. Fibroblasts rendered antifibrotic, antiapoptotic, and angiogenic by priming with cardiosphere-derived extracellular membrane vesicles. J Am Coll Cardiol 2015;66:599–611.

53. de Couto G, Makkar N, Marbán E. Cardiosphere-derived cell exosomes confer acute cardioprotection following ischemia-reperfusion injury through macrophage polarization. Circulation 2015;132:A16991.

54. Gallet R, Tseliou E, Dawkins J, et al. Intracoronary delivery of self-assembling heart-derived microtissues (cardiospheres) for prevention of adverse remodeling in a pig model of convalescent myocardial infarction. Circ Cardiovasc Interv 2015;8.

55. Klotz S, Hay I, Zhang G, Maurer M, Wang J, Burkhoff D. Development of heart failure in chronic hypertensive Dahl rats: focus on heart failure with preserved ejection fraction. Hypertension 2006;47:901–11.

56. Qu P, Hamada M, Ikeda S, Hirata G, Shigematsu Y, Hiwada K. Time-course changes in left ventricular geometry and function during the development of hypertension in Dahl salt-sensitive rats. Hypertens Res 2000;23:613–23.

57. Marbán E. Breakthroughs in cell therapy for heart disease: focus on cardiosphere-derived cells. Mayo Clin Proc 2014;89:850–8.

KEY WORDS animal models, cell therapy, diastolic function, heart failure with preserved ejection fraction

APPENDIX For supplemental figures, please see the supplemental appendix.

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

Exosomal MicroRNA Transfer Into Macrophages Mediates Cellular Postconditioning

BACKGROUND: Cardiosphere-derived cells (CDCs) confer cardioprotection in acute myocardial infarction by distinctive macrophage (Mϕ) polarization. Here we demonstrate that CDC-secreted exosomes (CDC_{exo}) recapitulate the cardioprotective effects of CDC therapy known as cellular postconditioning.

METHODS: Rats and pigs underwent myocardial infarction induced by ischemia/reperfusion before intracoronary infusion of CDC_{exo}, inert fibroblast exosomes (Fb_{exo}; control), or vehicle. Two days later, infarct size was quantified. Macrophages were isolated from cardiac tissue or bone marrow for downstream analyses. RNA sequencing was used to determine exosome content and alterations in gene expression profiles in Mϕ.

RESULTS: Administration of CDC_{exo} but not Fb_{exo} after reperfusion reduces infarct size in rat and pig models of myocardial infarction. Furthermore, CDC_{exo} reduce the number of CD68+ Mϕ within infarcted tissue and modify the polarization state of Mϕ so as to mimic that induced by CDCs. CDC_{exo} are enriched in several miRNAs (including miR-146a, miR-181b, and miR-126) relative to Fb_{exo}. Reverse pathway analysis of whole-transcriptome data from CDC_{exo}-primed Mϕ implicated miR-181b as a significant (P=1.3x10^{-21}) candidate mediator of CDC-induced Mϕ polarization, and PKCδ (protein kinase C δ) as a downstream target. Otherwise inert Fb_{exo} loaded selectively with miR-181b alter Mϕ phenotype and confer cardioprotective efficacy in a rat model of myocardial infarction. Adoptive transfer of PKCδ-suppressed Mϕ recapitulates cardioprotection.

CONCLUSIONS: Our data support the hypothesis that exosomal transfer of miR-181b from CDCs into Mϕ reduces PKCδ transcript levels and underlies the cardioprotective effects of CDCs administered after reperfusion.

Geoffrey de Couto, PhD*
Romain Gallet, MD*
Linda Cambier, PhD
Ervin Jaghatspanyan, BA
Nupur Makkar, BSc
James Frederick Dawkins, DVM
Benjamin P. Berman, PhD
Eduardo Marbán, MD, PhD

*Drs de Couto and Gallet contributed equally.

Correspondence to: Eduardo Marbán, MD, PhD, or Benjamin P. Berman, PhD, 8700 Beverly Boulevard, Los Angeles, CA 90048. E-mail eduardo.marban@cshs.org or benjamin.berman@cshs.org

Sources of Funding, see page 213

Key Words: cardioprotection ■ exosome ■ macrophage ■ miRNA ■ myocardial infarction

© 2017 American Heart Association, Inc.

Downloaded from http://ahajournals.org by on October 16, 2018

Circulation. 2017;136:200–214. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024590

Clinical Perspective

What Is New?

- Here we discover that exosomes mediate the cardioprotective effects of cardiosphere-derived cells (CDCs) administered after reperfusion in rats with acute myocardial infarction.
- Treatment with either CDCs or their secreted exosomes reduces infarct size and improves functional recovery.
- A specific microRNA species within CDC-derived exosomes, acting on macrophages, is implicated as a key mediator of the cardioprotective benefits.

What Are the Clinical Implications?

- Allogeneic CDCs are already in advanced clinical testing when administered months after myocardial infarction (ALLSTAR trial; URL: ClinicalTrials.gov; Unique Identifier: NCT01458405).
- The present findings give new reason to test the idea that allogeneic CDCs may be efficacious in preventing scar formation and improving cardiac function when given in the early reperfusion period adjunctive to percutaneous coronary intervention.

Acute myocardial infarction (MI) elicits a robust innate immune response that mobilizes a large population of neutrophils and macrophages (Mϕ) to the myocardium. This response, which plays out over the first few days after injury, occurs in a phasic manner whereby a rapid infiltration of neutrophils is succeeded by a heterogeneous influx of monocytes/Mϕs.[1] The secondary phase of monocyte/Mϕ infiltration, which is implicated in the clearance of necrotic cellular debris, deposition of matrix, and maturation of scar tissue, critically determines ultimate infarct size (IS). Depletion of circulating monocytes/Mϕ[2] or selective depletion of M2-like healing Mϕ[3] exacerbates tissue injury and impairs cardiac function after MI. Although Mϕ heterogeneity exists within the myocardium at steady state[4] and after MI,[5] it is unclear which environmental cues confer the distinct polarization profile(s) observed in vivo.[6]

Cardiosphere-derived cell (CDC) therapy has been utilized as a strategy to treat ischemic heart disease in both small and large animals, as well as in humans. Despite limited retention within the host myocardial tissue after intracoronary or direct myocardial injection,[7] the beneficial effects of cell therapy are long-lasting.[8] Our laboratory has recently demonstrated that exosomes (nanosized lipid bilayer vesicles; ≈30–150nm) are a potent secretory component of CDC therapy after MI,[9] as confirmed by Barile et al.[10] These vesicles are secreted by many cell types throughout the body for local or remote cell-to-cell communication; they contain a specific payload of small RNAs (eg, miRNA, snoRNA, Y RNA, etc)[11] and protein (eg, transcription factors, transmembrane receptors, integrins, etc),[12] and are readily taken up by numerous cell types, including Mϕs,[13] fibroblasts,[14] and endothelial cells.[15] Here, we extend our recent work on cellular postconditioning by CDCs[16–18] by identifying CDC exosomes (CDC_{exo})[19] as key elements of the cellular secretome that confer cardioprotection in MI. We further demonstrate that miR-181b within CDC_{exo} is a critical mediator of Mϕ polarization in vitro and cardioprotection in vivo.

METHODS

Experimental Protocol, Animals, and Surgical Procedures

All studies were performed at Cedars-Sinai Medical Center in accordance with the Institutional Animal Care and Use Committee guidelines.

Rat

In vivo experimental protocols were performed on 7- to 10-week-old female Wistar-Kyoto rats (Charles River Labs). To induce ischemia/reperfusion (IR) injury, rats were provided general anesthesia, and then a thoracotomy was performed at the 4th intercostal space to expose the heart and left anterior descending coronary artery. A 7-0 silk suture was then used to ligate the left anterior descending coronary artery, which was subsequently removed after 45 minutes to allow for reperfusion. Twenty minutes later, cells ($5x10^5$; in 100 μl PBS) or exosomes (35 μg, 105 μg, or 350 μg; in 100 μL PBS) were injected into the left ventricular cavity with an aortic cross-clamp over a period of 20 seconds.

Pig

In vivo experimental protocols were performed on adult female Yucatan mini-pigs. To induce IR injury, pigs were provided general anesthesia, and then an angioplasty balloon was threaded into the mid-left anterior coronary artery just after the first diagonal branch and inflated for 90 minutes. Thirty minutes after reperfusion, animals were allocated to receive CDC_{exo} (7.5 mg) or placebo (Iscove's Modified Dulbecco's Medium). To rule out any complications with retention of CDC_{exo}, we performed a direct intramyocardial injection for delivery. This procedure was performed in an open-chest model (median sternotomy) using a 25 G needle. The infarcted area was identified (grey and stiff zone), and 10 sequential injections (0.75 mg) were administered at the perimeter of the infarct (border zone).

Cardiac Function Measurements

Rat

Transthoracic echocardiography (Vevo770, VisualSonics) was performed on rats at baseline (preischemia) and before euthanization (48 hours or 2 weeks). Two-dimensional short and long axes were visualized. Three representative cycles were captured for each animal/time point, and measurements for left ventricular (LV) end-systolic dimension, LV

Downloaded from http://ahajournals.org by on October 16, 2018

end-diastolic dimension, and fractional area of change were obtained and averaged.

Pig

To measure LV function, left ventriculograms were performed before infusion (after MI) and before euthanization (48 hours) using a pigtail catheter inserted into the LV. Two incidences were studied: a 45° left anterior oblique projection and a 30° right anterior oblique projection 20° cranial projection. LV ejection fraction was determined by averaging those 2 measurements.

IS Evaluation

Rat

Two days after IR injury, hearts were arrested in diastole after intraventricular injection of 10% KCl. Hearts were then excised, washed in PBS, and cut into serial sections of ≈1 mm in thickness (from apex to basal edge of infarction). Sections were incubated with 2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium chloride (TTC, 1% solution in PBS) for 20 minutes in the dark, washed with PBS, and then imaged and weighed. Infarcts were delineated from viable tissue (white versus red, respectively) and analyzed using ImageJ software as previously reported.[16] Infarct mass, viable mass, and LV mass were calculated by extrapolating for infarct and noninfarct volumes (based on the areas calculated from both sides of a tissue section) and weight of the tissue. Percentage infarct mass was calculated using (Infarct Mass/Viable Mass) ×100%.

Pig

Two days after infusion, animals underwent lateral thoracotomy. A catheter was inserted into the left appendage, and Thioflavin T (50 mL, 2%) was injected into the left atrium to assess microvascular obstruction. Then an angioplasty balloon was inflated at the same position used for the infarct, and Gentian violet (50 mL, 1.8%) was injected to assess area at risk (AAR). Animals were then euthanized, and the hearts were explanted and sectioned into 1 cm slices. TTC staining was performed to determine IS. IS, microvascular obstruction, and AAR were then determined as previously described.[17] AAR was reported as a percentage of the total LV mass, and both IS and microvascular obstruction were reported as a percentage of the AAR.[17]

In Vitro Cell Culture

Bone Marrow–Derived Mϕ

Bone marrow was isolated as described.[16] Briefly, bones from rat (femur) or pig (rib) were sterilized with ethanol (70% in H_2O), flushed with PBS (containing 1% FBS, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid), and filtered through a 70 μm filter. Red blood cells were lysed with ACK buffer (Invitrogen) and resuspended in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (containing 10% FBS, 10 ng/mL macrophage colony-stimulating factor). The resulting cell suspension was plated and grown for 7 days to obtain Mϕ. Polarization of Mϕ toward M1 (100 ng/mL LPS and 50 ng/mL interferon γ; Sigma-Aldrich and R&D Systems, respectively), M2 (10 ng/mL interleukin-4 and interleukin-13; R&D Systems), or M_{CDCexo} (105 μg) was performed on the night between days 7 and 8 (≈18 hours).

Cardiac Mϕ

Hearts were collected and processed to isolate cardiac Mϕ after ischemic injury as previously described.[16] Briefly, 2 days after MI, hearts from animals treated with fibroblast exosomes (Fb_{exo}) or CDC_{exo} were perfused with PBS and collected. Cardiac tissue was minced and digested, and the resulting suspension was filtered (70 μm) to generate a single-cell suspension. Mononuclear cells were separated by centrifugation using a density gradient (Histopaque-1083; Sigma) and then resuspended in Roswell Park Memorial Institute media (supplemented with 1% FBS) and plated (37°C, 5% CO_2). Two hours later, cardiac Mϕ were washed with PBS and used for downstream analyses.

Neonatal Rat Ventricular Myocytes

Cells were isolated and cultured as described.[16]

Human Umbilical Vein Endothelial Cells

Cells were purchased (ATCC) and cultured according to the distributor's recommendations.

Statistics for Nongenomic Data

Results are expressed as mean±SEM. Linear regression analysis was performed to test the linear relationship between groups. Each replicate value was considered as an individual point to determine R^2. To determine differences between groups at a single time point, data were tested using either 2-tailed, unpaired, Student's *t* test or 1-way analysis of variance followed by Tukey's multiple comparisons test (outliers were excluded if *Z* score was >3 or <−3). To determine differences between groups at different time points/conditions, data were tested using repeated measures analysis of variance followed by Sidak's multiple hypothesis correction, 2-way analysis of variance followed by Holm-Sidak's multiple hypothesis correction, or multiple *t* tests followed by Holm-Sidak's multiple hypothesis correction (as denoted within the figure legends). To test for linear trend, we performed a 1-way analysis of variance followed by a posttest for linear trend. All analyses were performed using Prism 5 software (GraphPad), and only differences with a $P<0.05$ were considered statistically significant.

Refer to the online-only Data Supplement for additional materials and methods.

RESULTS

Characterization of CDC Exosomes

CDC exosomes (CDC_{exo}) were isolated from serum-free media conditioned by human CDCs for 5 or 15 days in culture (Figure IA in the Data Supplement). The conditioned media were then collected or concentrated by ultrafiltration by centrifugation (UFC, Millipore) to assess particle number and size (Nanoparticle Tracking Analysis, Malvern Nanosight), as well as protein concentration and protein marker expression (Figure 1 and Figure IB in the online-only Data Supplement). The relationship between particle number and protein content was linear in

Downloaded from http://ahajournals.org by on October 16, 2018

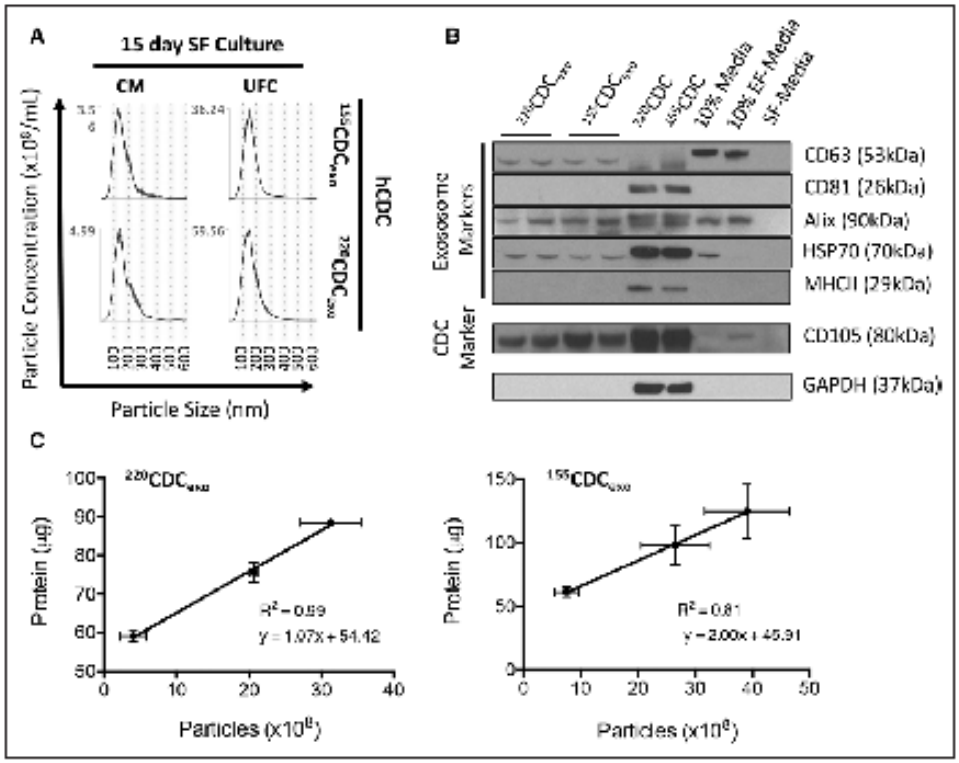


Figure 1. Exosome isolation and characterization.
A, Nanoparticle tracking analysis revealing particle size distribution and concentration within the conditioned media (CM) and after ultrafiltration by centrifugation (UFC), in human CDC lines (155: $^{155}CDC_{exo}$; 220: $^{220}CDC_{exo}$). **B**, Representative protein immunoblots of exosome (CD63, CD81, Alix, HSP70, and MHCII) and CDC (CD105) markers in human CDC exosomes. **C**, Correlation between particle number and protein amount in serially diluted samples of exosomes. Graphs depict mean ± SEM.

CDC_{exo} from each of 2 distinct human lines (Figure 1C). Concentration of exosomes by UFC reduced the suspension volume (>10-fold; Figure 1A) without a measurable loss of particles (Figure ID in the online-only Data Supplement). Human dermal Fb_{exo} (shown to be functionally inert in vivo[9]) served as a negative control and were isolated and characterized in parallel under equivalent conditions (Figure IC in the online-only Data Supplement). The mode particle size for CDC_{exo} was ≈150 nm in diameter, expressing typical exosome markers (including CD63, Alix, and HSP70), as well as the CDC surface marker CD105. Although this size distribution biases higher than what is generally quoted for exosomes on the basis of desiccation-prepared electron microscopy (30–100 nm),[20] the observed range is typical of hydrated exosomes measured by dynamic light scattering or nanoparticle tracking analysis.[20] For uniformity, given the elevated particle number, we performed all subsequent experiments using CDC_{exo} isolated from 15-day conditioned media.

CDC_{exo} Administered After Reperfusion in a Rat Model of Acute MI Mimic the Cardioprotective Effects of CDCs

To examine whether CDC_{exo} could recapitulate the cardioprotective effects observed with CDCs, we delivered CDC_{exo} in vivo. First, we demonstrated that CDC_{exo} were retained within the heart by prelabeling CDC_{exo} with DiI (Invitrogen), performing a modified version of our in vivo protocol (Figure 2A) by sacrificing rats after 2 hours of reperfusion, and examining exosome distribution by fluorescence imaging (Xenogen; Figure IIA in the online-only Data Supplement). Second, in dose-finding studies, rats underwent 45 minutes of ischemia followed by 20 minutes of reperfusion and then received vehicle (PBS), rat allogeneic CDCs (rCDCs), rCDCs with an exosome inhibitor (rCDC + GW4869), or 1 of several doses of CDC_{exo} (35 µg, 105 µg, or 350 µg). To improve efficacy after intracoronary delivery under aortic cross clamp, exosomes were precipitated with polyethylene glycol before delivery (Figure IIB in the online-only Data

Downloaded from http://ahajournals.org by on October 16, 2018

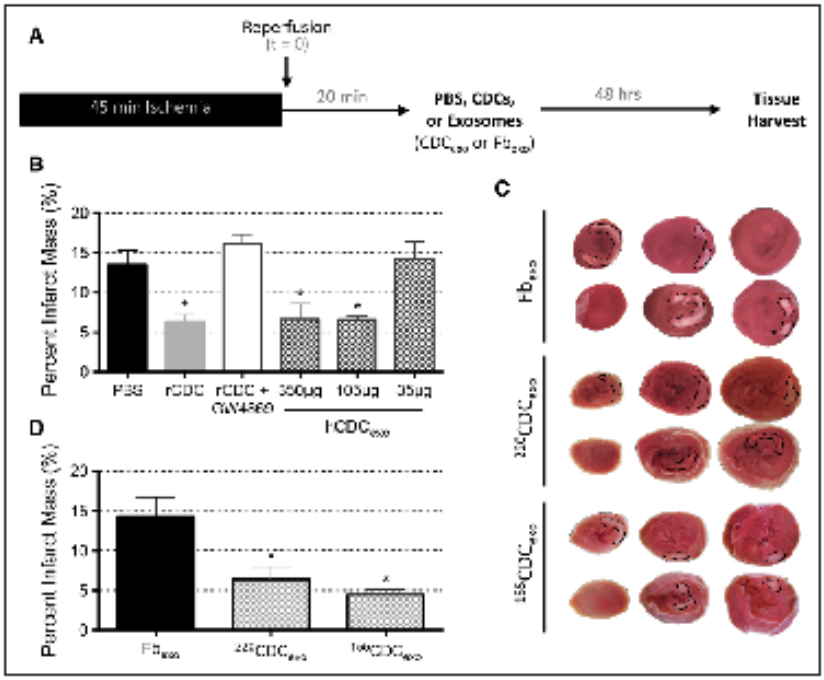


Figure 2. Intracoronary infusion of CDC_{exo} in rats reduces ischemic injury when delivered 20 minutes after reperfusion.

A, Protocol schematic for infusion of exosomes and tissue harvest. **B**, Quantification of infarct mass at 48 hours: dose-responsive effects, as measured by protein concentration, of CDC_{exo} (versus vehicle [PBS], rat allogeneic CDCs [rCDCs], and rCDC + GW4869). rCDC: allogeneic rat CDC; GW4869: exosome inhibitor. n=4 to 6/group. **C**, Representative 2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium chloride (TTC)-stained hearts from animals euthanized 48 hours after infusion of exosomes from either of 2 human CDC lines ($^{220}CDC_{exo}$, $^{155}CDC_{exo}$) or fibroblasts (Fb_{exo}; 350 µg). **D**, Quantification of infarct mass in hearts from groups defined in C (n=5/group, mean ± SEM). Statistical significance was determined using 1-way analysis of variance followed by Tukey's multiple corrections test. *P<0.05 versus PBS and Fb_{exo}, respectively.

Downloaded from http://ahajournals.org by on October 16, 2018

Supplement). Forty-eight hours later, animals were euthanized and hearts excised for IS determination by TTC staining. Confirming our earlier report,[16] rCDCs ($5x10^5$ cells) reduced IS. Pretreatment of rCDCs with GW4869 abrogated the cardioprotective efficacy of rCDCs, consistent with the idea that exosome secretion is required for rCDC bioactivity. We further tested this idea by applying human CDC_{exo} directly in lieu of cells. CDC_{exo} reduced IS to a similar level as rCDCs at doses of 350 µg and 105 µg but not at 35 µg (Figure 2B and Figure IIC in the online-only Data Supplement). Based on these data, we proceeded to test the potency of CDC_{exo} versus inert Fb_{exo}.[9,11] Third, utilizing 350 µg protein as our standard dose, we show that CDC_{exo} from 2 human CDC lines (220 and 155) reduced IS to a similar level as rCDCs, in contrast to Fb_{exo} and PBS controls (Figure 2C and 2D). These data were further validated with 3 additional human CDC_{exo} lines (Figure IID in the online-only Data Supplement). The data presented here represent findings of exosomes produced by 1 primary human CDC line (220, denoted herein as CDC_{exo}); confirmatory findings using exosomes from another human line are found in the online-only Data Supplement. Finally, we tested the durability of the cardioprotective effects of CDC_{exo}. When follow-up was extended to 2 weeks (Figure IIIA in the online-only Data Supplement), CDC_{exo} still reduced IS (Figure IIIB in the online-only Data Supplement) and preserved cardiac function (Figure IIIC and IIID in the online-only Data Supplement) relative to Fb_{exo} controls. Thus, the functional and structural benefits of CDC_{exo} extend beyond 48 hours, as did the benefits of CDCs.[16,18]

Intramyocardial Injection of CDC_{exo} Administered After Reperfusion in a Pig Model of AMI Mimics the Cardioprotective Effects of CDCs

To confirm these findings, we validated our work in the porcine model (Figure 3A). Briefly, Yucatan mini-

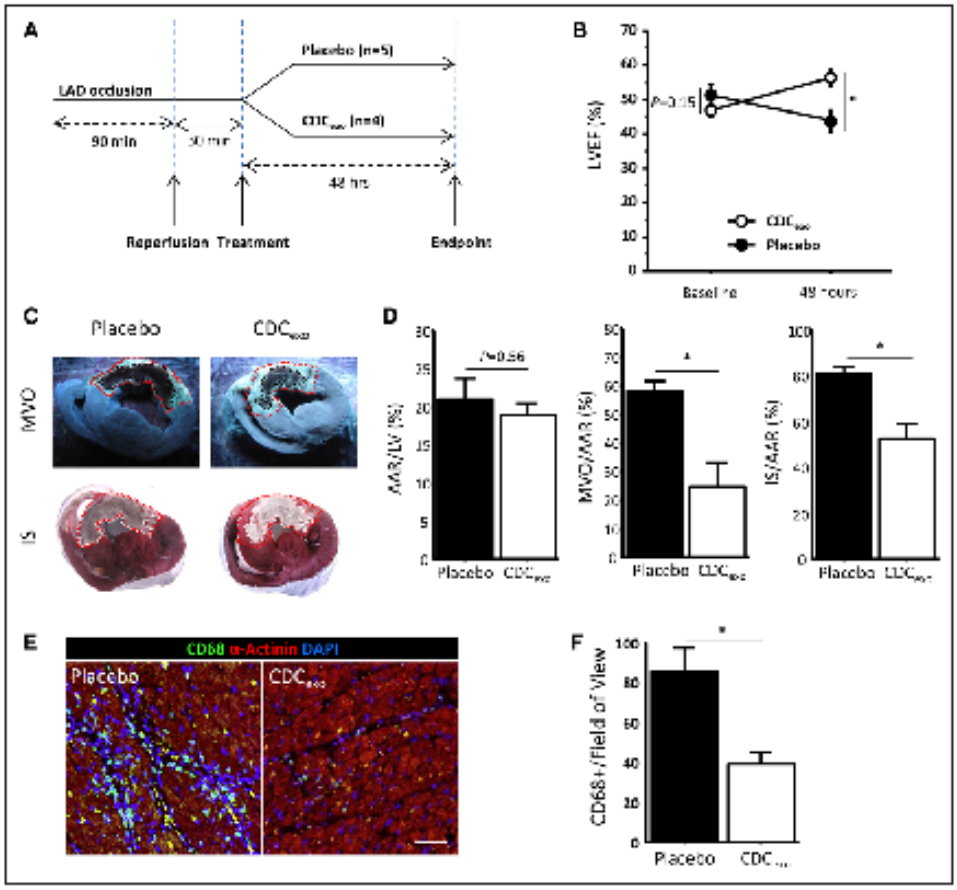


Figure 3. Direct intramyocardial injection of cardiosphere-derived cell exosomes (CDC_{exo}) in pigs reduces ischemic injury when delivered 30 minutes after reperfusion.
A, Schematic of protocol. **B**, Left ventricular ejection fraction (LVEF), measured by echocardiography, immediately after reperfusion (baseline, after reperfusion but before treatment) and after 48 hours. **C**, Representative TTC-stained placebo- and CDC_{exo}-treated pigs hearts at 48 hours. Area at risk (AAR; red dotted line), microvascular obstruction (MVO; black dotted line), and infarct size (IS; white dotted line). **D**, Quantification of AAR, MVO, and IS in pigs treated with placebo or CDC_{exo}. **E**, Representative immunohistochemical stain of CD68+ macrophage (Mϕ) within the infarct region of placebo- and CDC_{exo}-treated pigs. Scale bar: 50 μm. **F**, Quantification of CD68+ Mϕ described in (**E**). Graphs depict mean ± SEM (placebo, n=5; CDC_{exo}, n=4). Statistical significance was determined using Student's *t* test or repeated measures analysis of variance followed by Sidak's multiple corrections test. **P*<0.05.

pigs underwent 90 minutes of ischemia followed by 30 minutes of reperfusion before direct open-chest intramyocardial injection of CDC_{exo} (7.5 mg) or placebo. Cardiac function was assessed at 48 hours, with subsequent euthanasia and IS determination by TTC. After treatment with CDC_{exo}, LV ejection fraction was better preserved (Figure 3B; Figure IVA and IVB in the online-only Data Supplement), microvascular occlusion (microvascular obstruction/AAR) was reduced, and IS (IS/AAR) was attenuated relative to placebo (Figure 3C and 3D). Furthermore, we noted a reduction in CD68+ Mϕ infiltration into the infarct of CDC_{exo}-treated versus placebo animals (Figure 3E and 3F). Together these in vivo porcine data support the hypothesis that CDC_{exo} are key mediators of CDC-induced cardioprotection, not only in rodents but also in a clinically relevant large-animal model.

Implication of Uniquely Polarized Mϕ as Effectors of Cardioprotection

The first evidence that inflammation might be involved in cellular postconditioning came from our initial studies in rats,[16] where we found that CDCs modulate Mϕ

Downloaded from http://ahajournals.org by on October 16, 2018

toward a cardioprotective phenotype. Mimicking the effects of CDCs,[16] CDC_{exo} significantly reduced CD68+ Mϕ accumulation within the infarct border zone relative to Fb_{exo} control as measured by immunohistochemistry (Figure 4A and 4B, Figure IIE and IIIF in the online-only Data Supplement) and flow cytometry (Figure 4C

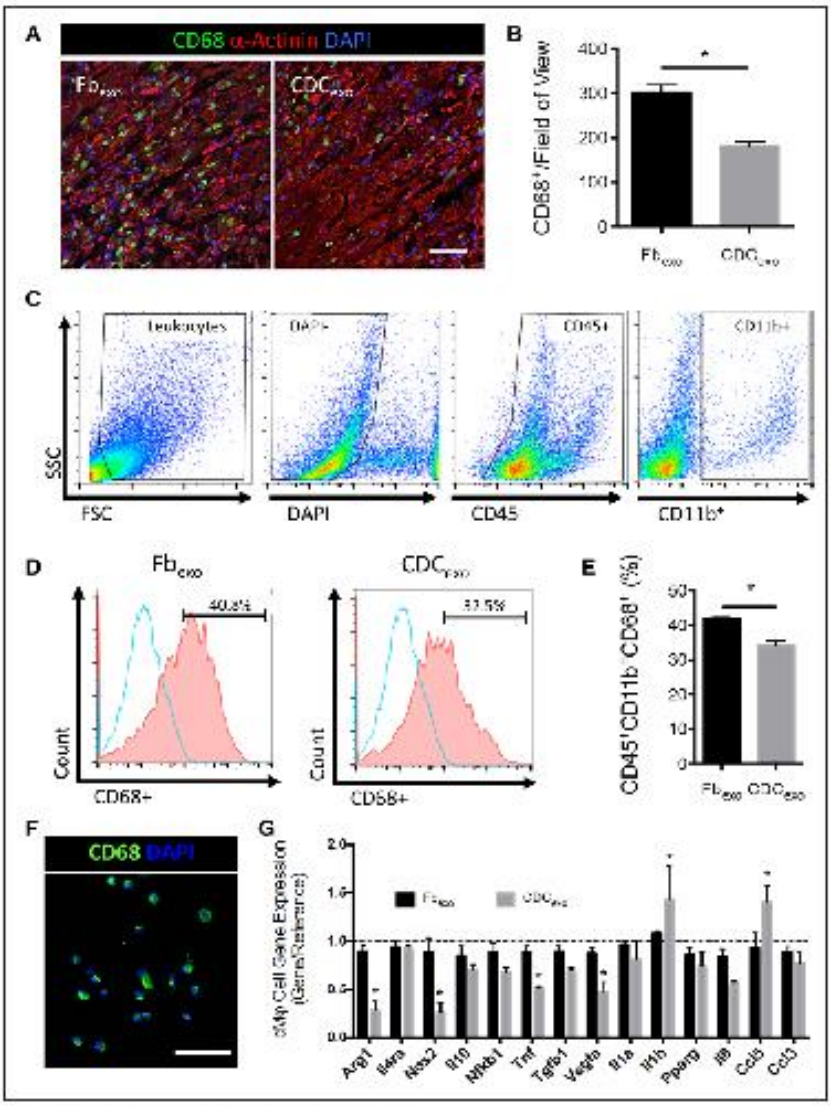


Figure 4. CDC_{exo} effects on Mϕ infiltration and polarization.
A, Representative confocal images of CD68+ Mϕ within the infarct border zone 48 hours after reperfusion. **B**, Quantification of CD68+ Mϕ in (**A**) (n=4/group). **C** and **D**, Representative flow cytometry plots showing the gating strategy used to determine CD45+CD11b+CD68+ cardiac Mϕ. **C**, Leukocytes were gated (FSC/SSC) and dead cells removed (DAPI−) before identification by CD45+ and CD11b+. **D**, Representative histograms of CD68+ cells from Fb_{exo} and CDC_{exo}-treated hearts as a result of gating according to **C**. Blue line, negative control. **E**, Quantification of flow cytometry data in **D** (n=4/group). **F**, Representative image of isolated cardiac Mϕ denoting CD68+ by immunohistochemistry. **G**, Gene expression profiles from cardiac Mϕ isolated from infarcted hearts treated with Fb_{exo} or CDC_{exo} (n=3/group). Scale bar: 50 μm. Graphs depict mean ± SEM. Statistical significance was determined using Student's *t* test or multiple *t* tests followed by Holm-Sidak's multiple corrections test. **P*<0.05.

Downloaded from http://ahajournals.org by on October 16, 2018

and 4E). Next, we harvested hearts from animals treated with either CDC_{exo} or Fb_{exo} 48 hours after MI and then isolated cardiac Mϕ (Figure 4F) as described.[16] Expression of proinflammatory genes *Nos2* and *Tnf* was significantly attenuated in cardiac Mϕ isolated from CDC_{exo}-treated animals (Figure 4G).

In vitro, rat bone marrow-derived Mϕ exposed to CDC_{exo} (Figure 5A) exhibit a distinctive shift in Mϕ polarization (not observed with Fb_{exo}), including elevation in anti-inflammatory gene expression levels of *Arg1*, *Il4ra*, *Tgfb1*, and *Vegfa* without any significant change in *Tnf* (Figure 5B). These effects occur dose-dependently (Figure 5C and Table I in the online-only Data Supplement), are consistent among donor lines (Figure VA in the online-only Data Supplement), and are stable after lyophilization and reconstitution (Figure VA in the online-only Data Supplement) or sequential freeze-thaw cycles (Figure VB and VC in the online-only Data Supplement). Pig bone marrow-derived Mϕ exposed to CDC_{exo} exhibited a similar polarization shift (Figure VIA in the online-only Data Supplement). An assay of phagocytosis revealed enhanced uptake of fluorescent beads in the CDC_{exo}-primed Mϕ group relative to M1, M2, or Fb_{exo}-primed Mϕ (Figure 5D and 5E, Figure VIB in the online-only Data Supplement), again recapitulating the effects of CDCs.[16] Together these data support the notion that CDC_{exo} are crucial in mediating the Mϕ responses underlying cellular postconditioning.[16]

CDC_{exo} Have a Distinct miRNA Signature

Exosomes are intriguing as signaling intermediates with cargo rich in small RNA molecules.[11,12] The composition of exosomes is not determined randomly but rather uniquely regulated by cell source and environmental stressors.[21] To understand how CDC_{exo} confer Mϕ polarization, we performed total RNA-sequencing (RNA-seq) on exosomes isolated from CDCs (CDC_{exo}) and Fbs (Fb_{exo}) and then aligned them to a database of both short and long RNA annotations. To identify the most biologically relevant changes, we performed 1 set of biological replicates using the Illumina RNA-seq platform and a second using the Ion Torrent platform (Figure 6).[22,23] Globally, the number of reads (and thus the RNA content) mapping to different classes of RNAs were similar between CDC_{exo} and Fb_{exo}; the greatest number of reads mapped to protein coding genes (RefSeq) and tRNAs, whereas fewer reads mapped to short RNAs (eg, miRNAs and piRNAs; even fewer mapped to scaRNAs and snoRNAs) (Figure VII in the online-only Data Supplement). However, the largest and most consistent proportional change was observed in

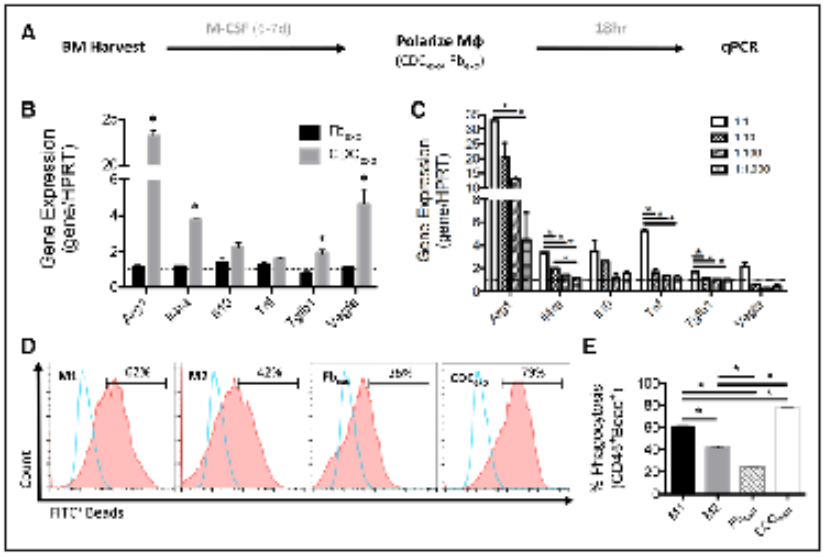


Figure 5. CDC_{exo} uniquely modulate bone marrow (BM)-derived Mϕ polarization.
A, Schematic of in vitro assay protocol, including BM harvest, Mϕ differentiation, and treatment. **B**, Gene expression changes in response to Fb_{exo} and CDC_{exo}. **C**, Dose-response gene expression changes in BM-derived Mϕ 18 hours after exposure to CDC_{exo}. **D**, Representative flow cytometry plots and quantification of fluorescent microsphere bead uptake by BM-derived Mϕ after polarization with M1 (LPS & IFNγ), M2 (IL-4 & IL-13), Fb_{exo}, and CDC_{exo}. Blue line, negative control. **E**, Quantification of flow cytometry data in **D**. Graphs depict mean ± SEM with n=3 to 5/group. Statistical significance was determined using 2-way analysis of variance followed by Holm-Sidak's multiple corrections test, 1-way analysis of variance followed by Tukey's multiple corrections test, or multiple *t* tests followed by Holm-Sidak's multiple corrections test. *$P<0.05$.

Downloaded from http://ahajournals.org by on October 16, 2018

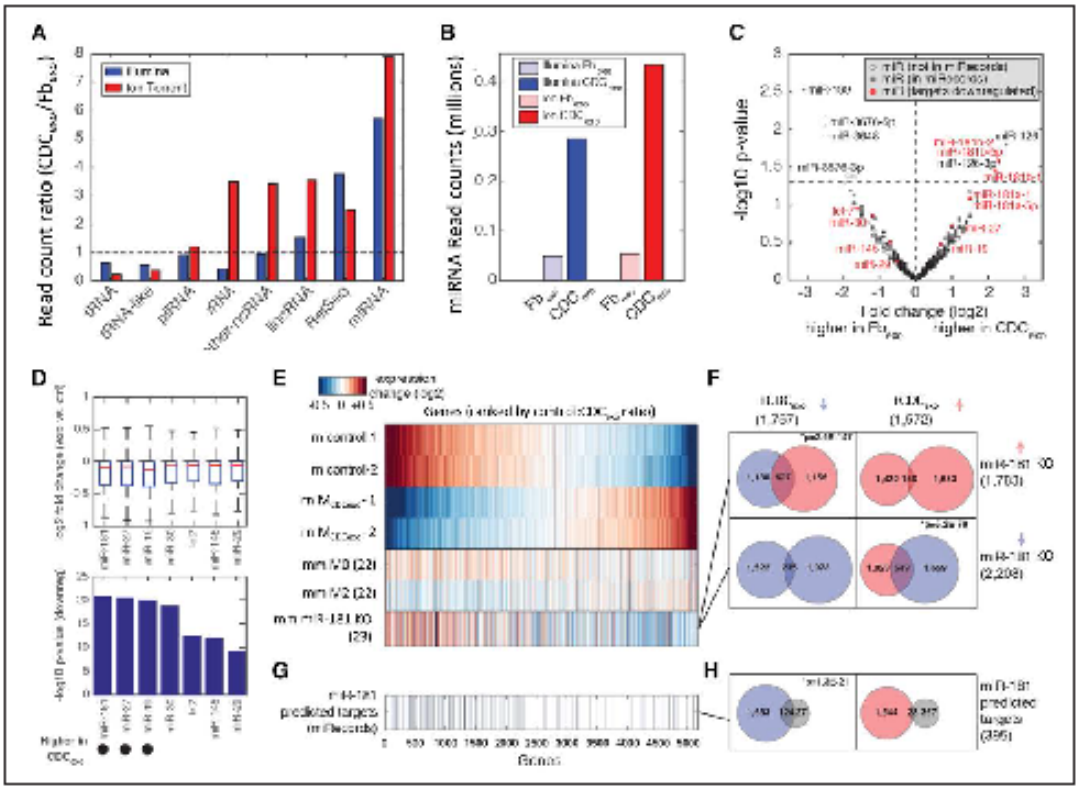


Figure 6. RNA-sequencing analysis of CDC$_{exo}$ and CDC$_{exo}$-primed Mϕ identify miR-181 as the top miRNA exosome candidate.

A, Total RNA-seq analysis depicting the change between Fb$_{exo}$ and CDC$_{exo}$ in the number of total RNA-seq reads for different RNA classes, shown as a fold-change ratio of Fb$_{exo}$/CDC$_{exo}$. RNA categories with <1000 reads aligned to all transcripts are omitted. The libraries sequenced using Illumina (blue) and Ion Torrent (red) sequencing platforms are shown separately, and the RNA classes are ordered by the average fold-change across both platforms. **B**, Raw read counts for each of the 4 samples for the miRNA class (the other classes are shown in Figure VII in the online-only Data Supplement). **C**, Volcano plot showing relative expression changes of 677 miRNAs between Fb$_{exo}$ and CDC$_{exo}$, with normalization and significance testing performed by DESeq2 using the Illumina libraries as 1 replicate and the Ion Torrent libraries as a second replicate (statistical significance reflects the concordance between the 2 platforms). Dashed horizontal line, uncorrected *P*-value of 0.05; filled points, miRNAs having predicted target genes present in the miRecords database and further analyzed in **D**–**H**; filled red points and red labels, miRNAs with targets downregulated in CDC$_{exo}$-polarized Mϕ (detailed in **D**). **D**, The 7 miRNAs with the most significant downregulation of predicted targets in CDC$_{exo}$-polarized Mϕ, ordered by significance. **Top,** Fold-change for all predicted miRNA gene targets. **Bottom,** Statistical significance (hypergeometric test; see Methods in the online-only Data Supplement) of the association between predicted miRNA targets and downregulated genes (–log$_{10}$ *P*-values); annotations at the bottom: miRNAs with overexpression in CDC$_{exo}$ compared with Fb$_{exo}$, from **C**. **E**, Comparison of untreated Mϕ (rn-control) and CDC$_{exo}$-primed Mϕ (rn-M$_{CDCexo}$) gene expression to published datasets.[25,26] Only genes with homology between rat (rn), human, and mouse (mm) are shown, whereas those with undetectably low expression in all our Mϕ samples are filtered out. Genes are sorted by differential expression in rn-M$_{CDCexo}$, from the most downregulated (**Left,** blue) to the most upregulated (**Right,** red). Gene expression values are shown as relative (log-transformed) fold change relative to other samples in the same study. **F**, Venn diagrams highlight the highly significant associations between genes sets of rn-M$_{CDCexo}$ to published miR-181a/b knockout (KO) (miR-181 KO) thymocytes[27]; significance values were calculated using a hypergeometric test (see Methods in the online-only Data Supplement). Downregulated genes in our model (+CDC$_{exo}$) were associated with genes upregulated in miR-181 KO thymocytes (**Upper Left**, P=2.6x10^{-147}) and vice versa (**Lower Right**, P=5.2x10^{-79}). These findings were not true for genes regulated in the same direction (**Upper Right** and **Lower Left**). **G**, Predicted miR-181 target genes from miRecords are shown in the same order as **E** and are concentrated in those genes downregulated rn-M$_{CDCexo}$ and upregulated miR-181 KO thymocytes. **H**, Venn diagrams show the strong association of predicted miR-181 targets and those genes downregulated in rn-M$_{CDCexo}$ (P=1.3x10^{-21}). Significance values were calculated using a hypergeometric test (see Methods in the online-only Data Supplement). Refer to the Methods in the online-only Data Supplement for sample size and additional methods.

Downloaded from http://ahajournals.org by on October 16, 2018

the miRNA class, where CDC_{exo} produced 5- and 8-fold greater reads than Fb_{exo} in the Illumina and Ion Torrent libraries, respectively (Figure 6A and 6B). Next, we focused on the reads that aligned to miRNA annotations and normalized both sets of libraries using DESeq 2 to identify the miRNAs with consistent changes in expression between CDC_{exo} and Fb_{exo} (Figure 6C). Although the 2 platforms (Illumina and Ion Torrent) had technical differences (Pearson correlation coefficient ≈0.6), several miRNAs stood out as having significant differential expression. The miRNAs that were uniquely enriched in Fb_{exo} included miR-199, miR-3676, and miR-3648, whereas those uniquely enriched in CDC_{exo} included miR-126 and miR-181b; in addition, miR-181a was enriched just below the threshold of significance in CDC_{exo}. Interestingly, miR-181a/b stood out as having large numbers of differentially expressed target genes in CDC_{exo}-treated Mϕ (marked as red in Figure 6C and described in detail below).

miR-181 as a Candidate Effector of CDC_{exo}-Mediated Mϕ Polarization

To investigate the effect of CDC_{exo} miRNAs on Mϕ, we performed RNA-seq on 2 biological replicates of unprimed (control) or CDC_{exo}-primed (CDC_{exo}) rat bone marrow-derived Mϕ. Then we used gene annotations from the NextBio functional annotation database (Illumina Inc.)[24] to investigate the functions of genes with altered expression after exposure to CDC_{exo}. Specifically, we compared differentially regulated genes to predicted miRNA targets from the miRecords database (reverse pathway analysis[25,26]) and found that target genes for several miRNAs enriched in CDC_{exo} were predominantly downregulated in CDC_{exo}-treated Mϕ (Figure 6D). This downregulation of miRNA target genes was not observed for randomly permuted gene sets of the same size (Figure VIIIA in the online-only Data Supplement). The fact that miRNAs with proportionally higher expression in Fb_{exo} (eg, miR-30 and let-7) were also downregulated in CDC_{exo}-primed Mϕ may reflect the higher absolute levels of these miRNAs in CDC_{exo} (Figure 6A). Consistent with this interpretation, we found a significant downregulation of predicted targets for all highly expressed miRNAs examined, whether they had proportionally higher expression in CDC_{exo} or Fb_{exo} (Figure VIIIB in the online-only Data Supplement). However, the 3 most significant miRNAs (miR-181, miR-27, and miR-19) were all proportionally higher in CDC_{exo} and thus represented strong candidates for conferring the functional changes observed in Mϕ (Figure 6D). miR-181 also had >10-fold higher proportional abundance in CDC_{exo} versus Fb_{exo} (Figure 6C), compared with miR-19 and miR-27 (both had <2-fold higher abundance). These data pointed to the miR-181 family as a strong candidate for the key regulatory cargo contained in CDC_{exo}.

To further explore transcriptional changes in CDC_{exo}-treated Mϕ, we performed an unbiased comparison of our RNA-seq dataset with 2 published rodent immune cell RNA-seq datasets (Figure 6E). First, we compared expression changes in our CDC_{exo}-treated cells to a mouse Mϕ RNA-seq dataset.[23] This comparison revealed a similar pattern of gene expression changes, with our unprimed rat Mϕ resembling the mouse M0 state and our CDC_{exo}-primed rat Mϕ resembling the mouse M2 state (Figure 6E). Because complete concordance was not observed between the 2 datasets, these findings support the notion[16] that CDC_{exo}-primed Mϕ are not ordinary M2 Mϕ but lie somewhere within (or outside) the M1–M2 spectrum. We next compared a mouse miR-181a/b knockout thymocyte dataset[22] with CDC_{exo}-primed Mϕ (Figure 6E and 6F). This particular perturbation came up as the most strongly related among thousands of gene perturbation datasets within the NextBio database, and our results demonstrated a strong degree of concordance (Figure 6E). Overlapping the genes with statistically significant expression changes across 2 replicates revealed that those downregulated in our model (+CDC_{exo}) were significantly associated ($P=2.6\times10^{-147}$) with genes upregulated in miR-181a/b knockout thymocytes (Figure 6F, Upper Left) and vice versa (Figure 6F, Lower Right; $P=5.2\times10^{-79}$). Further, when grouped based on their Gene Ontology annotation, these genes clustered in biological processes associated with increased translation, metabolism, and oxidative phosphorylation (Table II in the online-only Data Supplement). Genes downregulated in our model had no statistical association with genes downregulated in miR-181a/b knockout thymocytes (Figure 6F, Lower Left), nor did the converse (Figure 6F, Upper Right). This association is even stronger than the association with predicted miR-181 targets ($P=1.3\times10^{-21}$; Figure 6G and 6H), further supporting the notion that miR-181 may be a critical factor regulating CDC_{exo} function and by far the most promising single candidate mediator of the transcriptomic changes observed in CDC_{exo}-primed Mϕ.

miR-181b in Exosomes Confers Cardioprotection

The miR-181 family comprises 4 known members (miR-181a, miR-181b, miR-181c, and miR-181d), which have been implicated as modulators of myeloid leukemia and stem cell differentiation.[27] To better understand the functional effects of miR-181, we assessed the gene expression pattern of miR-181 family members in CDCs and CDC_{exo} (Figure 7A; miR-181c and miR-181d were undetectable by quantitative polymerase chain reaction and thus not presented). Levels of miR-181a but not miR-181b were higher in human CDCs relative to Fbs (Figure 7A). In contrast, CDC_{exo} were highly enriched for miR-181b but not miR-181a, indicative of highly se-

Downloaded from http://ahajournals.org by on October 16, 2018

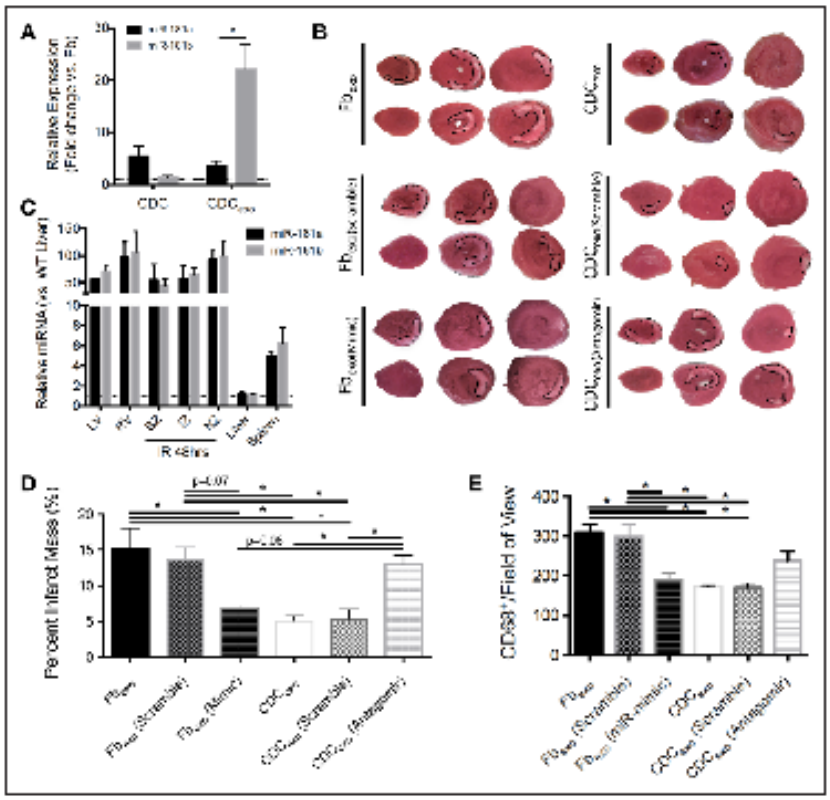


Figure 7. Exosomal transfer of miR-181b reduces infarct size after ischemia-reperfusion (IR) injury.
A, Human CDCs have elevated expression of miR-181a (but not miR-181b), whereas CDC_{exo} have enriched miR-181b (but not miR-181a) relative to Fb and Fb_{exo}, respectively (n=3/group). **B**, Representative TTC-stained hearts 48 hours after IR injury. $Fb_{exo(Scramble)}$ indicates Fb_{exo} with miR-181b scramble; $Fb_{exo(Mimic)}$, Fb_{exo} with miR-181b mimic; $CDC_{exo(Scramble)}$, CDC_{exo} with miR-181b scramble; and $CDC_{exo(Antagomir)}$, CDC_{exo} with miR-181b antagomir. **C**, Expression of miR-181a and miR-181b in tissue from non-infarcted and infarcted rats normalized to liver. LV indicates left ventricle; RV, right ventricle; BZ, border zone; IZ, infarct zone; and NZ, normal zone (n=4/group). **D**, Quantification of percent infarct mass in **C** (n=4–8/group). **E**, Quantification of CD68+ Mϕ in (Figure XI in the online-only Data Supplement). Graphs depict mean ± SEM. Statistical significance was determined using 2-way analysis of variance followed by Holm-Sidak's multiple corrections tests or 1-way analysis of variance followed by Tukey's multiple corrections test. *P<0.05.

lective transfer of miRNA cargo into CDC_{exo} (Figure 7A and Figure IXA in the online-only Data Supplement), as seen with other miRNAs in other cell types.[28] The expression levels of miR-181a and miR-181b differed in various isolated cardiac cell types (eg, cardiomyocytes, endothelial cells, Mϕ; Figure IXB in the online-only Data Supplement) and were not changed within the hearts of untreated animals before or after ischemic injury (Figure 7C).

We tested the effects of miR-181b on various cardiac cell types, including endothelial cells and Mϕ in vitro. Consistent with its known targets,[29] treatment with miR-181b but not miR-Scramble reduced transcript levels for E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1 in endothelial cells (Figure XA in the online-only Data Supplement). Interestingly, these effects were reproduced in a similar manner after CDC_{exo} or Fb_{exo} with miR-181b but not Fb_{exo} treatment (Figure XB in the online-only Data Supplement). Next, we performed a scratch assay to examine whether miR-181b modulates endothelial migration. Although CDC_{exo} enhanced scratch closure in vitro, miR-181b alone had no effect (Figure XC and XD in the online-only Data Supplement).

To further validate the functional efficacy of exosomal miR-181b in vivo, we overexpressed miR-181b in Fb_{exo} (naturally low in miR-181b) or antagonized miR-181b in CDC_{exo} and measured IS in our rat model (Figure 2A). Briefly, Fb_{exo} were transfected with miR-181b mimic ($Fb_{exo(Mimic)}$) (Figure IXC in the online-only Data Supplement) and CDC_{exo} were transfected with an

Downloaded from http://ahajournals.org by on October 16, 2018

antagomir to miR-181b ($CDC_{exo(Antagomir)}$); miR-scramble was used as a transfection control in both types of exosomes ($Fb_{exo(Scramble)}$ and $CDC_{exo(Scramble)}$). After 48 hours of reperfusion, $Fb_{exo(Mimic)}$ and $CDC_{exo(Scramble)}$ reduced IS and Mϕ infiltration, although not to the same extent as CDC_{exo} relative to Fb_{exo}, $Fb_{exo(Scramble)}$, and $CDC_{exo(Antagomir)}$ (Figure 7B, 7D, and 7E, Figure XI in the online-only Data Supplement). Thus, miR-181b reproduces the cardioprotective effects of CDC_{exo} while blocking miR-181b blunts those effects.

miR-181b Inhibits the Expression of PKCδ (Protein Kinase C δ)

To better understand how miR-181b may lead to cardioprotection, we honed in on the target genes for miR-181b within CDC_{exo}-treated Mϕ. Among known miR-181b targets, PKCδ (*prkcd*) was 1 of the most significantly downregulated ($4.82x10^{-30}$) (Figure 7F). Consistent with previous reports,[27] expression levels of *prkcd* were reduced in Mϕ transfected with miR-181b compared with miR-scramble control (Figure 8A). PKCδ enhances inflammatory gene expression (eg, tumor necrosis factor α),[30] as well as cell differentiation, growth, and death,[31] and PKCδ inhibitors are known to induce or enhance cardioprotection.[32,33] We thus hypothesized that PKCδ acts as a downstream effector of CDC_{exo}-mediated cardioprotection by miR-181b-induced suppression of *prkcd* in Mϕ. To test this hypothesis, we transfected Mϕ with a specific small interfering RNA (siRNA), which effectively suppressed *prkcd* (Figure 8B). Given our previous demonstration that adoptive transfer of CDC-conditioned Mϕ mimicked cardioprotection by CDCs, we modified our rat model of IR (Figure 2A) to adoptively transfer Mϕ transfected with either PKCδ siRNA ($Mϕ_{(PKCδ\ siRNA)}$) or scramble siRNA ($Mϕ_{(scramble\ siRNA)}$). Adoptive transfer of $Mϕ_{(PKCδ\ siRNA)}$ reduced IS (Figure 8C and 8D), mimicking the effects of CDC_{exo} (Figures 2 and 7). Thus, our data as well as published work are consistent with the hypothesis that PKCδ inhibition by miR-181b in CDC_{exo} underlies the cardioprotection induced by CDCs (Figure 8E).

Despite the compelling evidence pinpointing PKCδ as a likely downstream effector, it is clear that exosomes and their miRNAs have protean effects, which may be synergistic; picking a single candidate may oversimplify the actual biology. Table III in the online-only Data Supplement lists other miR-181b targets implicated in Mϕ polarization and downregulated in CDC_{exo}-primed Mϕ. Conversely, we observed upregulation (and downregulation in miR-181a/b knockout thymocytes; Figure 6F, Lower Right) in several genes associated with Mϕ polarization, oxidative phosphorylation, and phagocytosis (Table IV in the online-only Data Supplement). Together these data point to a dramatic shift in Mϕ polarization

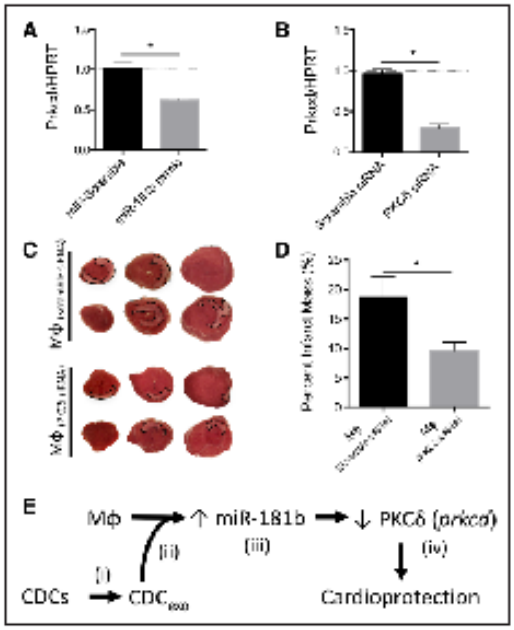


Figure 8. Adoptive transfer of Mϕ with reduced levels of PKCδ (prkcd) is cardioprotective.
A, Mϕ treated with miR-181b mimic have reduced *prkcd* expression (n=3–4/group). **B**, Mϕ treated with PKCδ small interfering RNA (siRNA) (10 nM) have reduced *prkcd* expression (n=3/group). **C**, Representative images of TTC-stained hearts 48 hours after IR injury and adoptive transfer of Mϕ as indicated. $Mϕ_{(PKCδ\ siRNA)}$ indicates Mϕ pretreated with PKCδ siRNA; and $Mϕ_{(Scramble)}$, Mϕ pretreated with scramble siRNA. **D**, Quantification of percent infarct mass in **C** (n=5/group). **E**, Schematic of our working hypothesis: **i**, CDCs secrete exosomes (CDC_{exo}) that are cardioprotective (evidence in Figures 1–3); **ii**, CDC_{exo}, rich in miR-181b, alter the polarization state of Mϕ (Figures 4–6); **iii**, enrichment of miR-181b within exosomes recapitulates cardioprotection (Figure 7); **iv**, downregulation of PKCδ in Mϕ by miR-181b is responsible, at least in part, for cardioprotective response of CDC_{exo} (Figure 8). Graphs depict mean ± SEM. Statistical significance was determined using Student's *t* test. **P*<0.05.

by CDC_{exo} that reduces proinflammatory signaling and enhances phagocytosis to promote a cardioprotective response in vivo.

DISCUSSION

Myocardial IR injury leads to necrosis and apoptosis of the underlying myocardium (myocytes, endothelial cells, etc).[34] The acute inflammatory response that follows IR injury is a physiologically archetypal sequence of events that begins with the mobilization and infiltration of neutrophils and follows with Mϕ influx.[35] Several

Downloaded from http://ahajournals.org by on October 16, 2018

studies have highlighted the importance of Mϕ in models of myocardial tissue injury, including Mϕ depletion studies in MI,[2,16,36] regenerative models of MI[4], or apical myocardial resection.[37] It is also becoming clearer that Mϕ heterogeneity (differences in polarization state in a spectrum typically defined by M1 and M2 states at the extremes[38]) is a nuanced process that is highly dependent on microenvironmental cues (protein-dependent,[38] extracellular vesicles,[39] or pH/ion imbalance[40]).

Over the past decade, cell therapy has demonstrated some success in the treatment of ischemic disease despite limited cell retention.[41] Our group recently demonstrated in pigs[17] and rats[16] the existence of a novel cardioprotective process known as cellular postconditioning: CDCs delivered in ≤30 minutes of reperfusion dramatically reduce IS. Macrophages are required for cellular postconditioning and appear to work by adopting a unique highly phagocytic polarization state (non-M1, non-M2) in response to CDCs.[16] We have also shown that CDC exosomes (CDC_{exo}) increase viable mass, promote angiogenesis, and reduce scar size in established MI.[9,14]

Exosomes are intriguing paracrine signals that can shuttle payloads from cell to cell.[12] Not surprisingly, exosomes are extremely diverse in their contents and vary greatly among cell types. Their characteristic traits are reflected in their vesicular composition (lipid, protein, small RNA, etc), heterogeneity (totality of loaded and unloaded vesicles), and concentration (number of particles secreted) in vivo and in vitro,[21] which are further modulated in time and space by environmental cues.[42] Our lab[9,14] and ≥2 others[10,43] have demonstrated the bioactivity of exosomes derived from cardiac stem cell populations.

Here we demonstrate that CDC_{exo} are a unique population of exosomes that have a distinct protein expression pattern (CD63, HSP70, and CD105) and miR profile (including high expression of miR-181b). In contrast to exosomes secreted by fibroblasts, CDC_{exo} do not exacerbate tissue injury[44]; instead, they confer cardioprotection when delivered after reperfusion by localizing to the ischemic tissue, reducing IS, reducing the total number of CD68+ Mϕ, and shifting the polarization state of Mϕ toward a distinct phenotype. Interestingly, CDC_{exo} appear to specifically home to the site of injury within infarcted myocardium. Localization to this area of interest may confer a local restructuring of the microenvironment and polarize recruited monocytes/Mϕ toward a reparative phenotype. Although the mechanisms for CDC_{exo} localization remain to be defined, homing signals, such as angiotensin II type I receptor (targets exosomes to cardiomyocytes, skeletal muscle, and mesenteric resistance arterioles),[45] may be responsible for exosome retention at the site of injury. Furthermore, CDC_{exo} enhance the endogenous phagocytic capacity of Mϕ, a characteristic trait that may enhance clearance of necrotic cell debris and alleviate excessive proinflammatory stress within the infarcted heart[35] (a salutary process known as efferocytosis[46]).

This work further expands our understanding of how CDCs confer cardioprotection and Mϕ polarization.[16] By reverse pathway analysis on transcriptomic data from both CDC_{exo} (cargo) and CDC_{exo}-primed Mϕ (recipient), we were able to pinpoint 1 key RNA component through which CDC_{exo} confer these functional benefits. Probing our own sequencing data against publicly available gene expression and miRNA target prediction databases, we identified miR-181b as our top candidate. This miRNA species displayed the highest relative abundance within CDC_{exo} and the strongest correlation in its downregulation of target genes in CDC_{exo}-primed Mϕ. miR-181b has been implicated in the attenuation of nuclear factor-κB signaling in endothelial cells[29,47] and suppression of myeloid differentiation in acute myeloid leukemia,[27] consistent with our findings that CDC_{exo}-primed Mϕ reduce proinflammatory gene expression and polarize Mϕ away from an M1 phenotype. Furthermore, the observed suppression of the miR-181b target PKCδ and concomitant increases in genes involved in translation and oxidative phosphorylation hint that CDC_{exo} shift the metabolic profile of Mϕ[48] toward a cardioprotective phenotype. Adding a miR-181b mimic to otherwise inert Fb_{exo} qualitatively reproduces CDC_{exo} cardioprotection, whereas blocking miR-181b in CDC_{exo} blunts cardioprotection. Although the evidence points to the functional efficacy of miR-181b in reducing IS and Mϕ polarization, the lack of complete congruence with our CDC_{exo} data are not surprising. CDC_{exo} contain a multitude of small RNAs and proteins, not only miR-181b. Many of the other components undoubtedly are bioactive, exerting the overall functional benefits as an ensemble.

Our data provide compelling evidence for the role of CDC_{exo} in polarizing Mϕ to a phenotype that improves the healing response after injury. Specifically, we demonstrate that miR-181b is a key component within CDC_{exo} that confers cardioprotection by targeting PKCδ within Mϕ to induce a distinctive polarization state. These data add to the list of cardioprotective/cardioregenerative properties previously attributed to CDC_{exo} (eg, antifibrotic effects, reduction of cardiomyocyte death and hypertrophy, myocardial regeneration, improved cardiac function, and angiogenesis).[9,11,14] Although we define miR-181b as 1 important component within CDC_{exo}, the remaining composition (other noncoding RNAs, as well as proteins and lipids) of CDC_{exo} requires further examination[49] to unravel the details of synthesis, release, homing, pathway regulation, and cellular uptake of CDC_{exo} in vitro and in vivo. Likewise, although we have implicated PKCδ as 1 downstream contributor to CDC_{exo}-mediated cardioprotection, other plausible effectors remain to be investigated. Such redundancy would

Downloaded from http://ahajournals.org by on October 16, 2018

be consistent with the notion that exosomes contain a plethora of bioactive molecules that can target multiple signaling pathways synergistically.[50]

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Jackie Valle, Elijah Kravets, Carolina Castillo, Baiming Sun, Antonio Echavez, and Xiaoyu Da for technical assistance.

SOURCES OF FUNDING

This work was supported by the Board of Governors of the Cedars-Sinai Medical Center. General laboratory support was provided by grants to Dr Marbán from the National Institutes of Health (R01HL124074) and the US Department of Defense (CSR205330).

DISCLOSURES

Dr Marbán owns founder's equity in and serves as an unpaid advisor to Capricor Inc. Dr de Couto is a paid consultant for Capricor. Capricor neither provided funding for this work nor did the company have approval rights over the manuscript. The other authors report no conflicts of interest.

AFFILIATIONS

From Cedars-Sinai Heart Institute, Los Angeles, CA (G.d.C., R.G., L.C., E.J., N.M., J.F.D., B.P.B., E.M.); and Cedars-Sinai Center for Bioinformatics and Functional Genomics, Los Angeles, CA (B.P.B.).

FOOTNOTES

Received July 20, 2016; accepted March 30, 2017.

The online-only Data Supplement is available with this article at http://circ.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.024590/-/DC1.

Circulation is available at http://circ.ahajournals.org.

REFERENCES

1. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med*. 2007;204:3037–3047. doi: 10.1084/jem.20070885.
2. van Amerongen MJ, Harmsen MC, van Rooijen N, Petersen AH, van Luyn MJ. Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice. *Am J Pathol*. 2007;170:818–829. doi: 10.2353/ajpath.2007.060547.
3. Ma Y, Halade GV, Zhang J, Ramirez TA, Levin D, Voorhees A, Jin YF, Han HC, Manicone AM, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase-28 deletion exacerbates cardiac dysfunction and rupture after myocardial infarction in mice by inhibiting M2 macrophage activation. *Circ Res*. 2013;112:675–688. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.300502.
4. Aurora AB, Porrello ER, Tan W, Mahmoud AI, Hill JA, Bassel-Duby R, Sadek HA, Olson EN. Macrophages are required for neonatal heart regeneration. *J Clin Invest*. 2014;124:1382–1392. doi: 10.1172/JCI72181.
5. Nahrendorf M, Swirski FK. Monocyte and macrophage heterogeneity in the heart. *Circ Res*. 2013;112:1624–1633. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.300890.
6. Okabe Y, Medzhitov R. Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages. *Cell*. 2014;157:832–844. doi: 10.1016/j.cell.2014.04.016.
7. Terrovitis JV, Smith RR, Marbán E. Assessment and optimization of cell engraftment after transplantation into the heart. *Circ Res*. 2010;106:479–494. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.208991.
8. Malliaras K, Ibrahim A, Tseliou E, Liu W, Sun B, Middleton RC, Seinfeld J, Wang L, Sharifi BG, Marbán E. Stimulation of endogenous cardioblasts by exogenous cell therapy after myocardial infarction. *EMBO Mol Med*. 2014;6:760–777. doi: 10.1002/emmm.201303626.
9. Ibrahim AG, Cheng K, Marbán E. Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy. *Stem Cell Reports*. 2014;2:606–619. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.04.006.
10. Barile L, Lionetti V, Cervio E, Matteucci M, Gherghiceanu M, Popescu LM, Torre T, Siclari F, Moccetti T, Vassalli G. Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2014;103:530–541. doi: 10.1093/cvr/cvu167.
11. Cambier L, de Couto G, Ibrahim A, Echavez AK, Valle J, Liu W, Kreke M, Smith RR, Marbán L, Marbán E. Y RNA fragment in extracellular vesicles confers cardioprotection via modulation of IL-10 expression and secretion. *EMBO Mol Med*. 2017;9:337–352. doi: 10.15252/emmm.201606924.
12. Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:569–579. doi: 10.1038/nri855.
13. Imai T, Takahashi Y, Nishikawa M, Kato K, Morishita M, Yamashita T, Matsumoto A, Charoenviriyakul C, Takakura Y. Macrophage-dependent clearance of systemically administered B16BL6-derived exosomes from the blood circulation in mice. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:26238.
14. Tseliou E, Fouad J, Reich H, Slipczuk L, de Couto G, Aminzadeh M, Middleton R, Valle J, Weixin L, Marbán E. Fibroblasts rendered antifibrotic, antiapoptotic, and angiogenic by priming with cardiosphere-derived extracellular membrane vesicles. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66:599–611. doi: 10.1016/j.jacc.2015.05.068.
15. Paggetti J, Haderk F, Seiffert M, Janji B, Distler U, Ammerlaan W, Kim YJ, Adam J, Lichter P, Solary E, Berchem G, Moussay E. Exosomes released by chronic lymphocytic leukemia cells induce the transition of stromal cells into cancer-associated fibroblasts. *Blood*. 2015;126:1106–1117. doi: 10.1182/blood-2014-12-618025.
16. de Couto G, Liu W, Tseliou E, Sun B, Makkar N, Kanazawa H, Arditi M, Marbán E. Macrophages mediate cardioprotective cellular postconditioning in acute myocardial infarction. *J Clin Invest*. 2015;125:3147–3162. doi: 10.1172/JCI81321.
17. Kanazawa H, Tseliou E, Malliaras K, Yee K, Dawkins JF, De Couto G, Smith RR, Kreke M, Seinfeld J, Middleton RC, Gallet R, Cheng K, Luthringer D, Valle I, Chowdhury S, Fukuda K, Makkar RR, Marbán L, Marbán E. Cellular postconditioning: allogeneic cardiosphere-derived cells reduce infarct size and attenuate microvascular obstruction when administered after reperfusion in pigs with acute myocardial infarction. *Circ Heart Fail*. 2015;8:322–332. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.114.001484.
18. Kanazawa H, Tseliou E, Dawkins JF, De Couto G, Gallet R, Malliaras K, Yee K, Kreke M, Valle I, Smith RR, Middleton RC, Ho CS, Dharmakumar R, Li D, Makkar RR, Fukuda K, Marban L and Marban E. Durable benefits of cellular postconditioning: long-term effects of allogeneic cardiosphere-derived cells infused after reperfusion in pigs with acute myocardial infarction. *J Am Heart Assoc*. 2016;5:e002796.
19. Gallet R, Dawkins J, Valle J, Simsolo E, de Couto G, Middleton R, Tseliou E, Luthringer D, Kreke M, Smith RR, Marban L, Ghaleb B, Marban E. Exosomes secreted by cardiosphere-derived cells reduce scarring, attenuate adverse remodelling, and improve function in acute and chronic porcine myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2016:ehw240.
20. Chernyshev VS, Rachamadugu R, Tseng YH, Belnap DM, Jia Y, Branch KJ, Butterfield AE, Pease LF 3rd, Bernard PS, Skliar M. Size and shape characterization of hydrated and desiccated exosomes. *Anal Bioanal Chem*. 2015;407:3285–3301. doi: 10.1007/s00216-015-8535-3.
21. Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, Colás E, Cordeiro-da Silva A, Fais S, Falcon-Perez JM, Ghobrial IM, Giebel B, Gimona M, Graner M, Gursel I, Gursel M, Heegaard NH, Hendrix A, Kierulf P, Kokubun K, Kosanovic M, Kralj-Iglic V, Krämer-Albers EM, Laitinen S, Lässer C, Lener T, Ligeti E, Linē A, Lipps G, Llorente A, Lötvall J, Manček-Keber M, Marcilla A, Mit-

Downloaded from http://ahajournals.org by on October 16, 2018

telbrunn M, Nazarenko I, Nolte-'t Hoen EN, Nyman TA, O'Driscoll L, Olivan M, Oliveira C, Pállinger É, Del Portillo HA, Reventós J, Rigau M, Rohde E, Sammar M, Sánchez-Madrid F, Santarém N, Schallmoser K, Ostenfeld MS, Stoorvogel W, Stukelj R, Van der Grein SG, Vasconcelos MH, Wauben MH, De Wever O. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:27066.

22. Henao-Mejia J, Williams A, Goff LA, Staron M, Licona-Limón P, Kaech SM, Nakayama M, Rinn JL, Flavell RA. The microRNA miR-181 is a critical cellular metabolic rheostat essential for NKT cell ontogenesis and lymphocyte development and homeostasis. *Immunity*. 2013;38:984–997. doi: 10.1016/j.immuni.2013.02.021.
23. Martinez FO, Helming L, Milde R, Varin A, Melgert BN, Draijer C, Thomas B, Fabbri M, Crawshaw A, Ho LP, Ten Hacken NH, Cobos Jiménez V, Kootstra NA, Hamann J, Greaves DR, Locati M, Mantovani A, Gordon S. Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. *Blood*. 2013;121:e57–e69. doi: 10.1182/blood-2012-06-436212.
24. Kupershmidt I, Su QJ, Grewal A, Sundaresh S, Halperin I, Flynn J, Shekar M, Wang H, Park J, Cui W, Wall GD, Wisotzkey R, Alag S, Akhtari S, Ronaghi M. Ontology-based meta-analysis of global collections of high-throughput public data. *PLoS One*. 2010;5:e13066.
25. Arora A, Simpson DA. Individual mRNA expression profiles reveal the effects of specific microRNAs. *Genome Biol*. 2008;9:R82. doi: 10.1186/gb-2008-9-5-r82.
26. Xiao F, Zuo Z, Cai G, Kang S, Gao X, Li T. miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(Database issue):D105–D110. doi: 10.1093/nar/gkn851.
27. Su R, Lin HS, Zhang XH, Yin XL, Ning HM, Liu B, Zhai PF, Gong JN, Shen C, Song L, Chen J, Wang F, Zhao HL, Ma YN, Yu J, Zhang JW. MIR-181 family: regulators of myeloid differentiation and acute myeloid leukemia as well as potential therapeutic targets. *Oncogene*. 2015;34:3226–3239. doi: 10.1038/onc.2014.274.
28. Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C, González S, Sánchez-Cabo F, González MÁ, Bernad A, Sánchez-Madrid F. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun*. 2011;2:282. doi: 10.1038/ncomms1285.
29. Sun X, Icli B, Wara AK, Belkin N, He S, Kobzik L, Hunninghake GM, Vera MP, Blackwell TS, Baron RM, Feinberg MW; MICU Registry. MicroRNA-181b regulates NF-κB-mediated vascular inflammation. *J Clin Invest*. 2012;122:1973–1990. doi: 10.1172/JCI61495.
30. Kontny E, Kurowska M, Szczepańska K, Maśliński W. Rottlerin, a PKC isozyme-selective inhibitor, affects signaling events and cytokine production in human monocytes. *J Leukoc Biol*. 2000;67:249–258.
31. Duquesnes N, Lezoualc'h F, Crozatier B. PKC-δ and PKC-ε: foes of the same family or strangers? *J Mol Cell Cardiol*. 2011;51:665–673. doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.07.013.
32. Sivaraman V, Hausenloy DJ, Kolvekar S, Hayward M, Yap J, Lawrence D, Di Salvo C, Yellon DM. The divergent roles of protein kinase C epsilon and delta in simulated ischaemia-reperfusion injury in human myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;46:758–764. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.02.013.
33. Yogalingam G, Hwang S, Ferreira JC, Mochly-Rosen D. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) phosphorylation by protein kinase Cδ (PKCδ) inhibits mitochondria elimination by lysosomal-like structures following ischemia and reoxygenation-induced injury. *J Biol Chem*. 2013;288:18947–18960. doi: 10.1074/jbc.M113.466870.
34. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death: 1: myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*. 1977;56:786–794.
35. Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat Rev Cardiol*. 2014;11:255–265. doi: 10.1038/nrcardio.2014.28.
36. Frantz S, Hofmann U, Fraccarollo D, Schäfer A, Kranepuhl S, Hagedorn I, Nieswandt B, Nahrendorf M, Wagner H, Bayer B, Pachel C, Schön MP, Kneitz S, Bobinger T, Weidemann F, Ertl G, Bauersachs J. Monocytes/macrophages prevent healing defects and left ventricular thrombus formation after myocardial infarction. *FASEB J*. 2013;27:871–881. doi: 10.1096/fj.12-214049.
37. Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, Sadek HA. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science*. 2011;331:1078–1080. doi: 10.1126/science.1200708.
38. Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:750–761. doi: 10.1038/nri3088.
39. Ismail N, Wang Y, Dakhlallah D, Moldovan L, Agarwal K, Batte K, Shah P, Wisler J, Eubank TD, Tridandapani S, Paulaitis ME, Piper MG, Marsh CB. Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood*. 2013;121:984–995. doi: 10.1182/blood-2011-08-374793.
40. Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, Cyrus N, Brokowski CE, Eisenbarth SC, Phillips GM, Cline GW, Phillips AJ, Medzhitov R. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature*. 2014;513:559–563. doi: 10.1038/nature13490.
41. Jansen OI Lorkeers SJ, Eding JE, Vesterinen HM, van der Spoel TI, Sena ES, Duckers HJ, Doevendans PA, Macleod MR, Chamuleau SA. Similar effect of autologous and allogeneic cell therapy for ischemic heart disease: systematic review and meta-analysis of large animal studies. *Circ Res*. 2015;116:80–86.
42. Simons M, Raposo G. Exosomes: vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol*. 2009;21:575–581. doi: 10.1016/j.ceb.2009.03.007.
43. Gray WD, French KM, Ghosh-Choudhary S, Maxwell JT, Brown ME, Platt MO, Searles CD, Davis ME. Identification of therapeutic covariant microRNA clusters in hypoxia-treated cardiac progenitor cell exosomes using systems biology. *Circ Res*. 2015;116:255–263. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.304360.
44. Bang C, Batkai S, Dangwal S, Gupta SK, Foinquinos A, Holzmann A, Just A, Remke J, Zimmer K, Zeug A, Ponimaskin E, Schmiedl A, Yin X, Mayr M, Halder R, Fischer A, Engelhardt S, Wei Y, Schober A, Fiedler J, Thum T. Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest*. 2014;124:2136–2146. doi: 10.1172/JCI70577.
45. Pironti G, Strachan RT, Abraham D, Mon-Wei Yu S, Chen M, Chen W, Hanada K, Mao L, Watson LJ, Rockman HA. Circulating exosomes induced by cardiac pressure overload contain functional angiotensin II type 1 receptors. *Circulation*. 2015;131:2120–2130. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.015687.
46. Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, Bratton DL, Oldenborg PA, Michalak M, Henson PM. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell*. 2005;123:321–334. doi: 10.1016/j.cell.2005.08.032.
47. Sun X, He S, Wara AK, Icli B, Shvartz E, Tesmenitsky Y, Belkin N, Li D, Blackwell TS, Sukhova GK, Croce K, Feinberg MW. Systemic delivery of microRNA-181b inhibits nuclear factor-κB activation, vascular inflammation, and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circ Res*. 2014;114:32–40. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.302089.
48. Kelly B, O'Neill LA. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Res*. 2015;25:771–784. doi: 10.1038/cr.2015.68.
49. Choi DS, Kim DK, Kim YK, Gho YS. Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. *Proteomics*. 2013;13:1554–1571. doi: 10.1002/pmic.201200329.
50. Vyas N, Dhawan J. Exosomes: mobile platforms for targeted and synergistic signaling across cell boundaries. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74:1567–1576. doi: 10.1007/s00018-016-2413-9.

Downloaded from http://ahajournals.org by on October 16, 2018

REFERENCES

1. World Health Organisation. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. 2011.
2. Schmidt M, Jacobsen JB, Lash TL, Botker HE, Sorensen HT. 25 year trends in first time hospitalisation for acute myocardial infarction, subsequent short and long term mortality, and the prognostic impact of sex and comorbidity: a Danish nationwide cohort study. *Bmj* 2012; **344**: e356.
3. Stiermaier T, Jobs A, de Waha S, et al. Optimized Prognosis Assessment in ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction Using a Cardiac Magnetic Resonance Imaging Risk Score. *Circ Cardiovasc Imaging* 2017; **10**(11).
4. Hombach V, Grebe O, Merkle N, et al. Sequelae of acute myocardial infarction regarding cardiac structure and function and their prognostic significance as assessed by magnetic resonance imaging. *Eur Heart J* 2005; **26**(6): 549-57.
5. van Kranenburg M, Magro M, Thiele H, et al. Prognostic value of microvascular obstruction and infarct size, as measured by CMR in STEMI patients. *JACC Cardiovasc Imaging* 2014; **7**(9): 930-9.
6. Heusch G. Cardioprotection: chances and challenges of its translation to the clinic. *The Lancet* 2013; **381**(9861): 166-75.
7. Lefer DJ, Marban E. Is Cardioprotection Dead? *Circulation* 2017; **136**(1): 98-109.
8. Smith RR, Barile L, Cho HC, et al. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation* 2007; **115**(7): 896-908.
9. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* 2007; **357**(11): 1121-35.
10. de Groot H, Rauen U. Ischemia-reperfusion injury: processes in pathogenetic networks: a review. *Transplant Proc* 2007; **39**(2): 481-4.
11. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* 2001; **94**(6): 1133-8.
12. Bonaventura A, Montecucco F, Dallegri F. Cellular recruitment in myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Eur J Clin Invest* 2016; **46**(6): 590-601.
13. Kloner RA, Braunwald E. Observations on experimental myocardial ischaemia. *Cardiovasc Res* 1980; **14**(7): 371-95.
14. Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest* 1974; **54**(6): 1496-508.
15. Ovize M, Kloner RA, Hale SL, Przyklenk K. Coronary cyclic flow variations "precondition" ischemic myocardium. *Circulation* 1992; **85**(2): 779-89.
16. Vinten-Johansen J, Gayheart PA, Johnston WE, Julian JS, Cordell AR. Regional function, blood flow, and oxygen utilization relations in repetitively occluded-reperfused canine myocardium. *Am J Physiol* 1991; **261**(2 Pt 2): H538-47.
17. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest* 2013; **123**(1): 92-100.
18. Hearse DJ, Humphrey SM, Chain EB. Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release. *J Mol Cell Cardiol* 1973; **5**(4): 395-407.
19. Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1998; **38**(2): 291-300.
20. Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2004; **61**(3): 481-97.
21. Kloner RA. The importance of no-reflow/microvascular obstruction in the STEMI patient. *Eur Heart J* 2017; **38**(47): 3511-3.
22. Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie RJ, Maroko PR, Vatner SF. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J Clin Invest* 1975; **56**(4): 978-85.

23. Ito H. No-reflow phenomenon and prognosis in patients with acute myocardial infarction. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006; **3**(9): 499-506.
24. Hearse DJ, Tosaki A. Free radicals and reperfusion-induced arrhythmias: protection by spin trap agent PBN in the rat heart. *Circ Res* 1987; **60**(3): 375-83.
25. Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lindsey ML, et al. IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury. *J Immunol* 2000; **165**(5): 2798-808.
26. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 1993; **122**(1): 103-11.
27. Morimoto H, Takahashi M, Izawa A, et al. Cardiac overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in transgenic mice prevents cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Circ Res* 2006; **99**(8): 891-9.
28. Ertl G, Frantz S. Healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2005; **66**(1): 22-32.
29. Westman PC, Lipinski MJ, Luger D, et al. Inflammation as a Driver of Adverse Left Ventricular Remodeling After Acute Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 2016; **67**(17): 2050-60.
30. Tseliou E, Reich H, de Couto G, et al. Cardiospheres reverse adverse remodeling in chronic rat myocardial infarction: roles of soluble endoglin and Tgf-beta signaling. *Basic Res Cardiol* 2014; **109**(6): 443.
31. Lindsey ML, Mann DL, Entman ML, Spinale FG. Extracellular matrix remodeling following myocardial injury. *Ann Med* 2003; **35**(5): 316-26.
32. Weisman HF, Bush DE, Mannisi JA, Weisfeldt ML, Healy B. Cellular mechanisms of myocardial infarct expansion. *Circulation* 1988; **78**(1): 186-201.
33. Weisman HF, Healy B. Myocardial infarct expansion, infarct extension, and reinfarction: pathophysiologic concepts. *Prog Cardiovasc Dis* 1987; **30**(2): 73-110.
34. Erlebacher JA, Weiss JL, Weisfeldt ML, Bulkley BH. Early dilation of the infarcted segment in acute transmural myocardial infarction: role of infarct expansion in acute left ventricular enlargement. *J Am Coll Cardiol* 1984; **4**(2): 201-8.
35. Fraccarollo D, Galuppo P, Bauersachs J. Novel therapeutic approaches to post-infarction remodelling. *Cardiovasc Res* 2012; **94**(2): 293-303.
36. Simoons ML, Serruys PW, vd Brand M, et al. Improved survival after early thrombolysis in acute myocardial infarction. A randomised trial by the Interuniversity Cardiology Institute in The Netherlands. *Lancet* 1985; **2**(8455): 578-82.
37. Grines CL, Browne KF, Marco J, et al. A comparison of immediate angioplasty with thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. The Primary Angioplasty in Myocardial Infarction Study Group. *N Engl J Med* 1993; **328**(10): 673-9.
38. Weaver WD, Simes RJ, Betriu A, et al. Comparison of primary coronary angioplasty and intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review. *JAMA* 1997; **278**(23): 2093-8.
39. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; **74**(5): 1124-36.
40. Heusch G. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ Res* 2015; **116**(4): 674-99.
41. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; **285**(2): H579-88.
42. Engstrom T, Kelbaek H, Helqvist S, et al. Effect of Ischemic Postconditioning During Primary Percutaneous Coronary Intervention for Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiol* 2017; **2**(5): 490-7.
43. Le Page S, Bejan-Angoulvant T, Angoulvant D, Prunier F. Remote ischemic conditioning and cardioprotection: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Basic Res Cardiol* 2015; **110**(2): 11.

44. Heusch G, Botker HE, Przyklenk K, Redington A, Yellon D. Remote ischemic conditioning. *J Am Coll Cardiol* 2015; **65**(2): 177-95.
45. Jeanneteau J, Hibert P, Martinez MC, et al. Microparticle release in remote ischemic conditioning mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012; **303**(7): H871-7.
46. Verouhis D, Sorensson P, Gourine A, et al. Effect of remote ischemic conditioning on infarct size in patients with anterior ST-elevation myocardial infarction. *Am Heart J* 2016; **181**: 66-73.
47. Botker HE, Kharbanda R, Schmidt MR, et al. Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial. *Lancet* 2010; **375**(9716): 727-34.
48. Saku K, Kakino T, Arimura T, et al. Total Mechanical Unloading Minimizes Metabolic Demand of Left Ventricle and Dramatically Reduces Infarct Size in Myocardial Infarction. *PLoS One* 2016; **11**(4): e0152911.
49. Kapur NK, Paruchuri V, Urbano-Morales JA, et al. Mechanically unloading the left ventricle before coronary reperfusion reduces left ventricular wall stress and myocardial infarct size. *Circulation* 2013; **128**(4): 328-36.
50. LeDoux JF, Tamareille S, Felli PR, Amirian J, Smalling RW. Left ventricular unloading with intra-aortic counter pulsation prior to reperfusion reduces myocardial release of endothelin-1 and decreases infarction size in a porcine ischemia-reperfusion model. *Catheter Cardiovasc Interv* 2008; **72**(4): 513-21.
51. Kapur NK, Qiao X, Paruchuri V, et al. Mechanical Pre-Conditioning With Acute Circulatory Support Before Reperfusion Limits Infarct Size in Acute Myocardial Infarction. *JACC Heart Fail* 2015; **3**(11): 873-82.
52. Wei X, Li T, Hagen B, et al. Short-term mechanical unloading with left ventricular assist devices after acute myocardial infarction conserves calcium cycling and improves heart function. *JACC Cardiovasc Interv* 2013; **6**(4): 406-15.
53. Piot C, Croisille P, Staat P, et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2008; **359**(5): 473-81.
54. Cung TT, Morel O, Cayla G, et al. Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med* 2015; **373**(11): 1021-31.
55. Ibanez B, Macaya C, Sanchez-Brunete V, et al. Effect of early metoprolol on infarct size in ST-segment-elevation myocardial infarction patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: the Effect of Metoprolol in Cardioprotection During an Acute Myocardial Infarction (METOCARD-CNIC) trial. *Circulation* 2013; **128**(14): 1495-503.
56. Garcia-Ruiz JM, Fernandez-Jimenez R, Garcia-Alvarez A, et al. Impact of the Timing of Metoprolol Administration During STEMI on Infarct Size and Ventricular Function. *J Am Coll Cardiol* 2016; **67**(18): 2093-104.
57. Garcia-Prieto J, Villena-Gutierrez R, Gomez M, et al. Neutrophil stunning by metoprolol reduces infarct size. *Nat Commun* 2017; **8**: 14780.
58. Timmers L, Henriques JP, de Kleijn DP, et al. Exenatide reduces infarct size and improves cardiac function in a porcine model of ischemia and reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol* 2009; **53**(6): 501-10.
59. Alburquerque-Bejar JJ, Barba I, Inserte J, et al. Combination therapy with remote ischaemic conditioning and insulin or exenatide enhances infarct size limitation in pigs. *Cardiovasc Res* 2015; **107**(2): 246-54.
60. Heusch G, Gersh BJ. The pathophysiology of acute myocardial infarction and strategies of protection beyond reperfusion: a continual challenge. *Eur Heart J* 2017; **38**(11): 774-84.
61. Lonborg J, Vejlstrup N, Kelbaek H, et al. Exenatide reduces reperfusion injury in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Eur Heart J* 2012; **33**(12): 1491-9.
62. Kohlhauer M, Berdeaux A, Ghaleb B, Tissier R. Therapeutic hypothermia to protect the heart against acute myocardial infarction. *Arch Cardiovasc Dis* 2016; **109**(12): 716-22.

63. Goldbourt U, Behar S, Reicher-Reiss H, Zion M, Mandelzweig L, Kaplinsky E. Early administration of nifedipine in suspected acute myocardial infarction. The Secondary Prevention Reinfarction Israel Nifedipine Trial 2 Study. *Arch Intern Med* 1993; **153**(3): 345-53.
64. Flaherty JT, Pitt B, Gruber JW, et al. Recombinant human superoxide dismutase (h-SOD) fails to improve recovery of ventricular function in patients undergoing coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circulation* 1994; **89**(5): 1982-91.
65. The ESPRIM trial: short-term treatment of acute myocardial infarction with molsidomine. European Study of Prevention of Infarct with Molsidomine (ESPRIM) Group. *Lancet* 1994; **344**(8915): 91-7.
66. Wall TC, Califf RM, Blankenship J, et al. Intravenous Fluosol in the treatment of acute myocardial infarction. Results of the Thrombolysis and Angioplasty in Myocardial Infarction 9 Trial. TAMI 9 Research Group. *Circulation* 1994; **90**(1): 114-20.
67. Effect of 48-h intravenous trimetazidine on short- and long-term outcomes of patients with acute myocardial infarction, with and without thrombolytic therapy; A double-blind, placebo-controlled, randomized trial. The EMIP-FR Group. European Myocardial Infarction Project--Free Radicals. *Eur Heart J* 2000; **21**(18): 1537-46.
68. Rusnak JM, Kopecky SL, Clements IP, et al. An anti-CD11/CD18 monoclonal antibody in patients with acute myocardial infarction having percutaneous transluminal coronary angioplasty (the FESTIVAL study). *Am J Cardiol* 2001; **88**(5): 482-7.
69. Zeymer U, Suryapranata H, Monassier JP, et al. The Na(+)/H(+) exchange inhibitor eniporide as an adjunct to early reperfusion therapy for acute myocardial infarction. Results of the evaluation of the safety and cardioprotective effects of eniporide in acute myocardial infarction (ESCAMI) trial. *J Am Coll Cardiol* 2001; **38**(6): 1644-50.
70. Bar FW, Tzivoni D, Dirksen MT, et al. Results of the first clinical study of adjunctive CAldaret (MCC-135) in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention for ST-Elevation Myocardial Infarction: the randomized multicentre CASTEMI study. *Eur Heart J* 2006; **27**(21): 2516-23.
71. Mahaffey KW, Granger CB, Nicolau JC, et al. Effect of pexelizumab, an anti-C5 complement antibody, as adjunctive therapy to fibrinolysis in acute myocardial infarction: the COMPlement inhibition in myocardial infarction treated with thromboLYtics (COMPLY) trial. *Circulation* 2003; **108**(10): 1176-83.
72. Investigators AA, Armstrong PW, Granger CB, et al. Pexelizumab for acute ST-elevation myocardial infarction in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA* 2007; **297**(1): 43-51.
73. Magnesium in Coronaries Trial I. Early administration of intravenous magnesium to high-risk patients with acute myocardial infarction in the Magnesium in Coronaries (MAGIC) Trial: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; **360**(9341): 1189-96.
74. Kitakaze M, Asakura M, Kim J, et al. Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction (J-WIND): two randomised trials. *Lancet* 2007; **370**(9597): 1483-93.
75. Erlinge D, Gotberg M, Lang I, et al. Rapid endovascular catheter core cooling combined with cold saline as an adjunct to percutaneous coronary intervention for the treatment of acute myocardial infarction. The CHILL-MI trial: a randomized controlled study of the use of central venous catheter core cooling combined with cold saline as an adjunct to percutaneous coronary intervention for the treatment of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2014; **63**(18): 1857-65.
76. Siddiqi N, Neil C, Bruce M, et al. Intravenous sodium nitrite in acute ST-elevation myocardial infarction: a randomized controlled trial (NIAMI). *Eur Heart J* 2014; **35**(19): 1255-62.
77. Atar D, Arheden H, Berdeaux A, et al. Effect of intravenous TRO40303 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute ST-elevation myocardial infarction: MITOCARE study results. *Eur Heart J* 2015; **36**(2): 112-9.
78. Foody JM, Farrell MH, Krumholz HM. beta-Blocker therapy in heart failure: scientific review. *JAMA* 2002; **287**(7): 883-9.

79. Kiowski W, Sutsch G, Dossegger L. Clinical benefit of angiotensin-converting enzyme inhibitors in chronic heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; **27 Suppl 2**: S19-24.
80. McMurray JJ, Packer M, Desai AS, et al. Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N Engl J Med* 2014; **371**(11): 993-1004.
81. Weber KT. Aldosterone and spironolactone in heart failure. *N Engl J Med* 1999; **341**(10): 753-5.
82. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 1999; **341**(10): 709-17.
83. Sanganalmath SK, Bolli R. Cell therapy for heart failure: a comprehensive overview of experimental and clinical studies, current challenges, and future directions. *Circ Res* 2013; **113**(6): 810-34.
84. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 2001; **108**(3): 407-14.
85. Chong JJ, Yang X, Don CW, et al. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature* 2014; **510**(7504): 273-7.
86. Menard C, Hagege AA, Agbulut O, et al. Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium: a preclinical study. *Lancet* 2005; **366**(9490): 1005-12.
87. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; **126**(4): 663-76.
88. Pfannkuche K, Liang H, Hannes T, et al. Cardiac myocytes derived from murine reprogrammed fibroblasts: intact hormonal regulation, cardiac ion channel expression and development of contractility. *Cell Physiol Biochem* 2009; **24**(1-2): 73-86.
89. Chachques JC, Acar C, Herreros J, et al. Cellular cardiomyoplasty: clinical application. *Ann Thorac Surg* 2004; **77**(3): 1121-30.
90. Farahmand P, Lai TY, Weisel RD, et al. Skeletal myoblasts preserve remote matrix architecture and global function when implanted early or late after coronary ligation into infarcted or remote myocardium. *Circulation* 2008; **118**(14 Suppl): S130-7.
91. Fukushima S, Coppen SR, Lee J, et al. Choice of cell-delivery route for skeletal myoblast transplantation for treating post-infarction chronic heart failure in rat. *PLoS One* 2008; **3**(8): e3071.
92. Gavira JJ, Perez-Ilzarbe M, Abizanda G, et al. A comparison between percutaneous and surgical transplantation of autologous skeletal myoblasts in a swine model of chronic myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2006; **71**(4): 744-53.
93. Chachques JC, Duarte F, Cattadori B, et al. Angiogenic growth factors and/or cellular therapy for myocardial regeneration: a comparative study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; **128**(2): 245-53.
94. Ghostine S, Carrion C, Souza LC, et al. Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction. *Circulation* 2002; **106**(12 Suppl 1): I131-6.
95. Pouly J, Hagege AA, Vilquin JT, et al. Does the functional efficacy of skeletal myoblast transplantation extend to nonischemic cardiomyopathy? *Circulation* 2004; **110**(12): 1626-31.
96. Shintani Y, Fukushima S, Varela-Carver A, et al. Donor cell-type specific paracrine effects of cell transplantation for post-infarction heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2009; **47**(2): 288-95.
97. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001; **357**(9252): 279-80.
98. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003; **41**(7): 1078-83.
99. Menasche P, Alfieri O, Janssens S, et al. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* 2008; **117**(9): 1189-200.
100. Dimmeler S, Zeiher AM. Cell therapy of acute myocardial infarction: open questions. *Cardiology* 2009; **113**(3): 155-60.

101. Waksman R, Fournadjiev J, Baffour R, et al. Transepicardial autologous bone marrow-derived mononuclear cell therapy in a porcine model of chronically infarcted myocardium. *Cardiovasc Radiat Med* 2004; **5**(3): 125-31.
102. Bel A, Messas E, Agbulut O, et al. Transplantation of autologous fresh bone marrow into infarcted myocardium: a word of caution. *Circulation* 2003; **108 Suppl 1**: II247-52.
103. Malliaras K, Marban E. Cardiac cell therapy: where we've been, where we are, and where we should be headed. *Br Med Bull* 2011; **98**: 161-85.
104. Nguyen PK, Rhee JW, Wu JC. Adult Stem Cell Therapy and Heart Failure, 2000 to 2016: A Systematic Review. *JAMA Cardiol* 2016; **1**(7): 831-41.
105. Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2005; **112**(8): 1128-35.
106. Mazo M, Gavira JJ, Abizanda G, et al. 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* 2010; **19**(3): 313-28.
107. Li L, Zhang S, Zhang Y, Yu B, Xu Y, Guan Z. Paracrine action mediate the antifibrotic effect of transplanted mesenchymal stem cells in a rat model of global heart failure. *Mol Biol Rep* 2009; **36**(4): 725-31.
108. Mazo M, Planat-Benard V, Abizanda G, et al. Transplantation of adipose derived stromal cells is associated with functional improvement in a rat model of chronic myocardial infarction. *Eur J Heart Fail* 2008; **10**(5): 454-62.
109. Schuleri KH, Feigenbaum GS, Centola M, et al. Autologous mesenchymal stem cells produce reverse remodelling in chronic ischaemic cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2009; **30**(22): 2722-32.
110. Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskouei BN, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ Res* 2010; **107**(7): 913-22.
111. Williams AR, Suncion VY, McCall F, et al. Durable scar size reduction due to allogeneic mesenchymal stem cell therapy regulates whole-chamber remodeling. *J Am Heart Assoc* 2013; **2**(3): e000140.
112. Natsumeda M, Florea V, Rieger AC, et al. A Combination of Allogeneic Stem Cells Promotes Cardiac Regeneration. *J Am Coll Cardiol* 2017; **70**(20): 2504-15.
113. Suzuki G, Iyer V, Lee TC, Canty JM, Jr. Autologous mesenchymal stem cells mobilize cKit+ and CD133+ bone marrow progenitor cells and improve regional function in hibernating myocardium. *Circ Res* 2011; **109**(9): 1044-54.
114. Williams AR, Hatzistergos KE, Addicott B, et al. 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* 2013; **127**(2): 213-23.
115. Weil BR, Suzuki G, Leiker MM, Fallavollita JA, Canty JM, Jr. Comparative Efficacy of Intracoronary Allogeneic Mesenchymal Stem Cells and Cardiosphere-Derived Cells in Swine with Hibernating Myocardium. *Circ Res* 2015; **117**(7): 634-44.
116. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Role of cardiac stem cells in cardiac pathophysiology: a paradigm shift in human myocardial biology. *Circ Res* 2011; **109**(8): 941-61.
117. Urbanek K, Torella D, Sheikh F, et al. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**(24): 8692-7.
118. Linke A, Muller P, Nurzynska D, et al. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**(25): 8966-71.
119. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003; **114**(6): 763-76.
120. Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N, et al. Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2004; **279**(12): 11384-91.
121. Jiang S, Kh Haider H, Ahmed RP, Idris NM, Salim A, Ashraf M. Transcriptional profiling of young and old mesenchymal stem cells in response to oxygen deprivation and reparability of the infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2008; **44**(3): 582-96.

122. Malliaras K, Kreke M, Marban E. The stuttering progress of cell therapy for heart disease. *Clin Pharmacol Ther* 2011; **90**(4): 532-41.
123. Malliaras K, Li TS, Luthringer D, et al. Safety and efficacy of allogeneic cell therapy in infarcted rats transplanted with mismatched cardiosphere-derived cells. *Circulation* 2012; **125**(1): 100-12.
124. Malliaras K, Smith RR, Kanazawa H, et al. Validation of contrast-enhanced magnetic resonance imaging to monitor regenerative efficacy after cell therapy in a porcine model of convalescent myocardial infarction. *Circulation* 2013; **128**(25): 2764-75.
125. Quevedo HC, Hatzistergos KE, Oskouei BN, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**(33): 14022-7.
126. Tseliou E, Pollan S, Malliaras K, et al. Allogeneic cardiospheres safely boost cardiac function and attenuate adverse remodeling after myocardial infarction in immunologically mismatched rat strains. *J Am Coll Cardiol* 2013; **61**(10): 1108-19.
127. Kanazawa H, Tseliou E, Dawkins JF, et al. Durable Benefits of Cellular Postconditioning: Long-Term Effects of Allogeneic Cardiosphere-Derived Cells Infused After Reperfusion in Pigs with Acute Myocardial Infarction. *J Am Heart Assoc* 2016; **5**(2).
128. Kanazawa H, Tseliou E, Malliaras K, et al. Cellular postconditioning: allogeneic cardiosphere-derived cells reduce infarct size and attenuate microvascular obstruction when administered after reperfusion in pigs with acute myocardial infarction. *Circ Heart Fail* 2015; **8**(2): 322-32.
129. Marban E. Breakthroughs in cell therapy for heart disease: focus on cardiosphere-derived cells. *Mayo Clin Proc* 2014; **89**(6): 850-8.
130. Johnston PV, Sasano T, Mills K, et al. Engraftment, differentiation, and functional benefits of autologous cardiosphere-derived cells in porcine ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 2009; **120**(12): 1075-83, 7 p following 83.
131. Tseliou E, Kanazawa H, Dawkins J, et al. Widespread Myocardial Delivery of Heart-Derived Stem Cells by Nonocclusive Triple-Vessel Intracoronary Infusion in Porcine Ischemic Cardiomyopathy: Superior Attenuation of Adverse Remodeling Documented by Magnetic Resonance Imaging and Histology. *PLoS One* 2016; **11**(1): e0144523.
132. Freyman T, Polin G, Osman H, et al. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *Eur Heart J* 2006; **27**(9): 1114-22.
133. Golpanian S, Schulman IH, Ebert RF, et al. Concise Review: Review and Perspective of Cell Dosage and Routes of Administration From Preclinical and Clinical Studies of Stem Cell Therapy for Heart Disease. *Stem cells translational medicine* 2016; **5**(2): 186-91.
134. Tuma J, Fernandez-Vina R, Carrasco A, et al. Safety and feasibility of percutaneous retrograde coronary sinus delivery of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with chronic refractory angina. *J Transl Med* 2011; **9**: 183.
135. Butler J, Epstein SE, Greene SJ, et al. Intravenous Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for Nonischemic Cardiomyopathy: Safety and Efficacy Results of a Phase II-A Randomized Trial. *Circ Res* 2017; **120**(2): 332-40.
136. Bartolucci J, Verdugo FJ, Gonzalez PL, et al. Safety and Efficacy of the Intravenous Infusion of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Patients With Heart Failure: A Phase 1/2 Randomized Controlled Trial (RIMECARD Trial [Randomized Clinical Trial of Intravenous Infusion Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells on Cardiopathy]). *Circ Res* 2017; **121**(10): 1192-204.
137. Dib N, Khawaja H, Varner S, McCarthy M, Campbell A. Cell therapy for cardiovascular disease: a comparison of methods of delivery. *J Cardiovasc Transl Res* 2011; **4**(2): 177-81.
138. Kanelidis AJ, Premer C, Lopez J, Balkan W, Hare JM. Route of Delivery Modulates the Efficacy of Mesenchymal Stem Cell Therapy for Myocardial Infarction: A Meta-Analysis of Preclinical Studies and Clinical Trials. *Circ Res* 2017; **120**(7): 1139-50.
139. Pavo N, Charwat S, Nyolczas N, et al. Cell therapy for human ischemic heart diseases: critical review and summary of the clinical experiences. *J Mol Cell Cardiol* 2014; **75**: 12-24.

140. Assmus B. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002; **106**(24): 3009-17.
141. Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, et al. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation* 2006; **113**(10): 1287-94.
142. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, et al. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J* 2006; **27**(23): 2775-83.
143. Schachinger V, Assmus B, Erbs S, et al. Intracoronary infusion of bone marrow-derived mononuclear cells abrogates adverse left ventricular remodelling post-acute myocardial infarction: insights from the reinfusion of enriched progenitor cells and infarct remodelling in acute myocardial infarction (REPAIR-AMI) trial. *Eur J Heart Fail* 2009; **11**(10): 973-9.
144. Assmus B, Leistner DM, Schachinger V, et al. Long-term clinical outcome after intracoronary application of bone marrow-derived mononuclear cells for acute myocardial infarction: migratory capacity of administered cells determines event-free survival. *Eur Heart J* 2014; **35**(19): 1275-83.
145. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2006; **367**(9505): 113-21.
146. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; **355**(12): 1199-209.
147. Roncalli J, Mouquet F, Piot C, et al. Intracoronary autologous mononucleated bone marrow cell infusion for acute myocardial infarction: results of the randomized multicenter BONAMI trial. *Eur Heart J* 2011; **32**(14): 1748-57.
148. Traverse JH, Henry TD, Pepine CJ, et al. Effect of the use and timing of bone marrow mononuclear cell delivery on left ventricular function after acute myocardial infarction: the TIME randomized trial. *JAMA* 2012; **308**(22): 2380-9.
149. Traverse JH, Henry TD, Ellis SG, et al. Effect of intracoronary delivery of autologous bone marrow mononuclear cells 2 to 3 weeks following acute myocardial infarction on left ventricular function: the LateTIME randomized trial. *JAMA* 2011; **306**(19): 2110-9.
150. Tendera M, Wojakowski W, Ruzyllo W, et al. 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. *Eur Heart J* 2009; **30**(11): 1313-21.
151. Quyyumi AA, Vasquez A, Kereiakes DJ, et al. PreSERVE-AMI: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial of Intracoronary Administration of Autologous CD34+ Cells in Patients With Left Ventricular Dysfunction Post STEMI. *Circ Res* 2017; **120**(2): 324-31.
152. Chen SL, Fang WW, Ye F, et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2004; **94**(1): 92-5.
153. Hare JM, Traverse JH, Henry TD, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2009; **54**(24): 2277-86.
154. Houtgraaf JH, den Dekker WK, van Dalen BM, et al. First experience in humans using adipose tissue-derived regenerative cells in the treatment of patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2012; **59**(5): 539-40.
155. Gao LR, Chen Y, Zhang NK, et al. Intracoronary infusion of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction: double-blind, randomized controlled trial. *BMC Med* 2015; **13**: 162.
156. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 2003; **107**(18): 2294-302.

157. Assmus B, Honold J, Schachinger V, et al. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; **355**(12): 1222-32.
158. Perin EC, Willerson JT, Pepine CJ, et al. Effect of transendocardial delivery of autologous bone marrow mononuclear cells on functional capacity, left ventricular function, and perfusion in chronic heart failure: the FOCUS-CCTRN trial. *JAMA* 2012; **307**(16): 1717-26.
159. Heldman AW, DiFede DL, Fishman JE, et al. Transendocardial mesenchymal stem cells and mononuclear bone marrow cells for ischemic cardiomyopathy: the TAC-HFT randomized trial. *JAMA* 2014; **311**(1): 62-73.
160. Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, et al. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA* 2012; **308**(22): 2369-79.
161. Perin EC, Sanz-Ruiz R, Sanchez PL, et al. Adipose-derived regenerative cells in patients with ischemic cardiomyopathy: The PRECISE Trial. *Am Heart J* 2014; **168**(1): 88-95 e2.
162. Bartunek J, Terzic A, Davison BA, et al. Cardiopoietic cell therapy for advanced ischaemic heart failure: results at 39 weeks of the prospective, randomized, double blind, sham-controlled CHART-1 clinical trial. *Eur Heart J* 2017; **38**(9): 648-60.
163. Bolli R, Chugh AR, D'Amario D, et al. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet* 2011; **378**(9806): 1847-57.
164. Messina E, De Angelis L, Frati G, et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res* 2004; **95**(9): 911-21.
165. Li TS, Cheng K, Lee ST, et al. Cardiospheres recapitulate a niche-like microenvironment rich in stemness and cell-matrix interactions, rationalizing their enhanced functional potency for myocardial repair. *Stem Cells* 2010; **28**(11): 2088-98.
166. Davis DR, Ruckdeschel Smith R, Marban E. Human cardiospheres are a source of stem cells with cardiomyogenic potential. *Stem Cells* 2010; **28**(5): 903-4.
167. Davis DR, Zhang Y, Smith RR, et al. Validation of the cardiosphere method to culture cardiac progenitor cells from myocardial tissue. *PLoS One* 2009; **4**(9): e7195.
168. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *The Lancet* 2012; **379**(9819): 895-904.
169. Cho HJ, Lee HJ, Youn SW, et al. Secondary sphere formation enhances the functionality of cardiac progenitor cells. *Mol Ther* 2012; **20**(9): 1750-66.
170. Lee HJ, Cho HJ, Kwon YW, Park YB, Kim HS. Phenotypic modulation of human cardiospheres between stemness and paracrine activity, and implications for combined transplantation in cardiovascular regeneration. *Biomaterials* 2013; **34**(38): 9819-29.
171. Lee ST, White AJ, Matsushita S, et al. Intramyocardial injection of autologous cardiospheres or cardiosphere-derived cells preserves function and minimizes adverse ventricular remodeling in pigs with heart failure post-myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2011; **57**(4): 455-65.
172. Yee K, Malliaras K, Kanazawa H, et al. Allogeneic cardiospheres delivered via percutaneous transendocardial injection increase viable myocardium, decrease scar size, and attenuate cardiac dilatation in porcine ischemic cardiomyopathy. *PLoS One* 2014; **9**(12): e113805.
173. Li TS, Cheng K, Malliaras K, et al. Direct comparison of different stem cell types and subpopulations reveals superior paracrine potency and myocardial repair efficacy with cardiosphere-derived cells. *J Am Coll Cardiol* 2012; **59**(10): 942-53.
174. de Couto G, Liu W, Tseliou E, et al. Macrophages mediate cardioprotective cellular postconditioning in acute myocardial infarction. *J Clin Invest* 2015; **125**(8): 3147-62.
175. Malliaras K, Makkar RR, Smith RR, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells after myocardial infarction: evidence of therapeutic regeneration in the final 1-year results of the CADUCEUS trial (CArdiosphere-Derived aUtologous stem CElls to reverse ventricUlar dySfunction). *J Am Coll Cardiol* 2014; **63**(2): 110-22.

176. Chun JL, O'Brien R, Song MH, Wondrasch BF, Berry SE. Injection of vessel-derived stem cells prevents dilated cardiomyopathy and promotes angiogenesis and endogenous cardiac stem cell proliferation in mdx/utrn-/- but not aged mdx mouse models for duchenne muscular dystrophy. *Stem cells translational medicine* 2013; **2**(1): 68-80.
177. Aminzadeh MA, Rogers RG, Fournier M, et al. Exosome-Mediated Benefits of Cell Therapy in Mouse and Human Models of Duchenne Muscular Dystrophy. *Stem Cell Reports* 2018; **10**(3): 942-55.
178. Aminzadeh MA, Tseliou E, Sun B, et al. Therapeutic efficacy of cardiosphere-derived cells in a transgenic mouse model of non-ischaemic dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2015; **36**(12): 751-62.
179. Seth S, Bhargava B, Narang R, et al. The ABCD (Autologous Bone Marrow Cells in Dilated Cardiomyopathy) trial a long-term follow-up study. *J Am Coll Cardiol* 2010; **55**(15): 1643-4.
180. Hamshere S, Arnous S, Choudhury T, et al. Randomized trial of combination cytokine and adult autologous bone marrow progenitor cell administration in patients with non-ischaemic dilated cardiomyopathy: the REGENERATE-DCM clinical trial. *Eur Heart J* 2015; **36**(44): 3061-9.
181. Martino H, Brofman P, Greco O, et al. Multicentre, randomized, double-blind trial of intracoronary autologous mononuclear bone marrow cell injection in non-ischaemic dilated cardiomyopathy (the dilated cardiomyopathy arm of the MiHeart study). *Eur Heart J* 2015; **36**(42): 2898-904.
182. Vrtovec B, Poglajen G, Lezaic L, et al. Effects of intracoronary CD34+ stem cell transplantation in nonischemic dilated cardiomyopathy patients: 5-year follow-up. *Circ Res* 2013; **112**(1): 165-73.
183. Hare JM, DiFede DL, Rieger AC, et al. Randomized Comparison of Allogeneic Versus Autologous Mesenchymal Stem Cells for Nonischemic Dilated Cardiomyopathy: POSEIDON-DCM Trial. *J Am Coll Cardiol* 2017; **69**(5): 526-37.
184. Beeres SL, Bax JJ, Dibbets-Schneider P, et al. Sustained effect of autologous bone marrow mononuclear cell injection in patients with refractory angina pectoris and chronic myocardial ischemia: twelve-month follow-up results. *Am Heart J* 2006; **152**(4): 684 e11-6.
185. Tse HF, Thambar S, Kwong YL, et al. Prospective randomized trial of direct endomyocardial implantation of bone marrow cells for treatment of severe coronary artery diseases (PROTECT-CAD trial). *Eur Heart J* 2007; **28**(24): 2998-3005.
186. van Ramshorst J, Bax JJ, Beeres SL, et al. Intramyocardial bone marrow cell injection for chronic myocardial ischemia: a randomized controlled trial. *JAMA* 2009; **301**(19): 1997-2004.
187. Patel AN, Mittal S, Turan G, et al. REVIVE Trial: Retrograde Delivery of Autologous Bone Marrow in Patients With Heart Failure. *Stem cells translational medicine* 2015; **4**(9): 1021-7.
188. Losordo DW, Henry TD, Davidson C, et al. Intramyocardial, autologous CD34+ cell therapy for refractory angina. *Circ Res* 2011; **109**(4): 428-36.
189. Wang S, Cui J, Peng W, Lu M. Intracoronary autologous CD34+ stem cell therapy for intractable angina. *Cardiology* 2010; **117**(2): 140-7.
190. Povsic TJ, Henry TD, Traverse JH, et al. The RENEW Trial: Efficacy and Safety of Intramyocardial Autologous CD34(+) Cell Administration in Patients With Refractory Angina. *JACC Cardiovasc Interv* 2016; **9**(15): 1576-85.
191. Jimenez-Quevedo P, Gonzalez-Ferrer JJ, Sabate M, et al. Selected CD133(+) progenitor cells to promote angiogenesis in patients with refractory angina: final results of the PROGENITOR randomized trial. *Circ Res* 2014; **115**(11): 950-60.
192. Wojakowski W, Jadczyk T, Michalewska-Wludarczyk A, et al. Effects of Transendocardial Delivery of Bone Marrow-Derived CD133(+) Cells on Left Ventricle Perfusion and Function in Patients With Refractory Angina: Final Results of Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled REGENT-VSEL Trial. *Circ Res* 2017; **120**(4): 670-80.
193. Hossne NA, Cruz E, Buffolo E, et al. Long-Term and Sustained Therapeutic Results of a Specific Promonocyte Cell Formulation in Refractory Angina: ReACT((R)) (Refractory Angina Cell Therapy) Clinical Update and Cost-Effective Analysis. *Cell transplantation* 2015; **24**(6): 955-70.
194. Henry TD, Losordo DW, Traverse JH, et al. Autologous CD34+ cell therapy improves exercise capacity, angina frequency and reduces mortality in no-option refractory angina: a patient-level pooled analysis of randomized double-blinded trials. *Eur Heart J* 2018; **39**(23): 2208-16.

195. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; **275**(5302): 964-7.
196. Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest* 2005; **115**(3): 572-83.
197. Yoon YS, Wecker A, Heyd L, et al. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest* 2005; **115**(2): 326-38.
198. Caspi O, Huber I, Kehat I, et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial performance in infarcted rat hearts. *J Am Coll Cardiol* 2007; **50**(19): 1884-93.
199. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; **410**(6829): 701-5.
200. Manginas A, Goussetis E, Koutelou M, et al. Pilot study to evaluate the safety and feasibility of intracoronary CD133(+) and CD133(-) CD34(+) cell therapy in patients with nonviable anterior myocardial infarction. *Catheter Cardiovasc Interv* 2007; **69**(6): 773-81.
201. Bolli R, Tang XL, Sanganalmath SK, et al. Intracoronary delivery of autologous cardiac stem cells improves cardiac function in a porcine model of chronic ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 2013; **128**(2): 122-31.
202. Chimenti I, Smith RR, Li TS, et al. Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice. *Circ Res* 2010; **106**(5): 971-80.
203. Malliaras K, Ibrahim A, Tseliou E, et al. Stimulation of endogenous cardioblasts by exogenous cell therapy after myocardial infarction. *EMBO Mol Med* 2014; **6**(6): 760-77.
204. Nguyen CT, Dawkins J, Bi X, Marban E, Li D. Diffusion Tensor Cardiac Magnetic Resonance Reveals Exosomes From Cardiosphere-Derived Cells Preserve Myocardial Fiber Architecture After Myocardial Infarction. *JACC Basic Transl Sci* 2018; **3**(1): 97-109.
205. Sosnovik DE, Mekkaoui C, Huang S, et al. Microstructural impact of ischemia and bone marrow-derived cell therapy revealed with diffusion tensor magnetic resonance imaging tractography of the heart in vivo. *Circulation* 2014; **129**(17): 1731-41.
206. Gnecchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res* 2008; **103**(11): 1204-19.
207. Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* 2004; **10**(5): 494-501.
208. Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 2003; **425**(6961): 968-73.
209. Loffredo FS, Steinhauser ML, Gannon J, Lee RT. Bone marrow-derived cell therapy stimulates endogenous cardiomyocyte progenitors and promotes cardiac repair. *Cell Stem Cell* 2011; **8**(4): 389-98.
210. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol* 1996; **166**(3): 585-92.
211. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 2004; **94**(5): 678-85.
212. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006; **98**(5): 1076-84.
213. Li H, Zuo S, He Z, et al. Paracrine factors released by GATA-4 overexpressed mesenchymal stem cells increase angiogenesis and cell survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; **299**(6): H1772-81.
214. Mirotsou M, Zhang Z, Deb A, et al. Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**(5): 1643-8.

215. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 2004; **109**(12): 1543-9.
216. Timmers L, Lim SK, Hoefer IE, et al. Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. *Stem Cell Res* 2011; **6**(3): 206-14.
217. Timmers L, Lim SK, Arslan F, et al. Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem Cell Res* 2007; **1**(2): 129-37.
218. Malliaras K, Zhang Y, Seinfeld J, et al. Cardiomyocyte proliferation and progenitor cell recruitment underlie therapeutic regeneration after myocardial infarction in the adult mouse heart. *EMBO Mol Med* 2013; **5**(2): 191-209.
219. Rota M, Padin-Iruegas ME, Misao Y, et al. Local activation or implantation of cardiac progenitor cells rescues scarred infarcted myocardium improving cardiac function. *Circ Res* 2008; **103**(1): 107-16.
220. Tang XL, Rokosh G, Sanganalmath SK, et al. Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction. *Circulation* 2010; **121**(2): 293-305.
221. Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 2009; **136**(5): 964-77.
222. Jujo K, Ii M, Losordo DW. Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2008; **45**(4): 530-44.
223. Urbich C, Aicher A, Heeschen C, et al. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol* 2005; **39**(5): 733-42.
224. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003; **107**(8): 1164-9.
225. Bonaros N, Rauf R, Wolf D, et al. Combined transplantation of skeletal myoblasts and angiopoietic progenitor cells reduces infarct size and apoptosis and improves cardiac function in chronic ischemic heart failure. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006; **132**(6): 1321-8.
226. Gnecchi M, He H, Noiseux N, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J* 2006; **20**(6): 661-9.
227. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**(7): 3422-7.
228. Schuldiner M, Itskovitz-Eldor J, Benvenisty N. Selective ablation of human embryonic stem cells expressing a "suicide" gene. *Stem Cells* 2003; **21**(3): 257-65.
229. Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999; **100**(19 Suppl): II247-56.
230. Sartiani L, Bettiol E, Stillitano F, Mugelli A, Cerbai E, Jaconi ME. Developmental changes in cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells: a molecular and electrophysiological approach. *Stem Cells* 2007; **25**(5): 1136-44.
231. Tseliou E, de Couto G, Terrovitis J, et al. Angiogenesis, cardiomyocyte proliferation and anti-fibrotic effects underlie structural preservation post-infarction by intramyocardially-injected cardiospheres. *PLoS One* 2014; **9**(2): e88590.
232. Ibrahim A, Marban E. Exosomes: Fundamental Biology and Roles in Cardiovascular Physiology. *Annu Rev Physiol* 2016; **78**: 67-83.
233. Schageman J, Zeringer E, Li M, et al. The complete exosome workflow solution: from isolation to characterization of RNA cargo. *Biomed Res Int* 2013; **2013**: 253957.
234. Kowal J, Arras G, Colombo M, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; **113**(8): E968-77.
235. Kourembanas S. Exosomes: vehicles of intercellular signaling, biomarkers, and vectors of cell therapy. *Annu Rev Physiol* 2015; **77**: 13-27.

236. Zakharova L, Svetlova M, Fomina AF. T cell exosomes induce cholesterol accumulation in human monocytes via phosphatidylserine receptor. *J Cell Physiol* 2007; **212**(1): 174-81.
237. Subra C, Grand D, Laulagnier K, et al. Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J Lipid Res* 2010; **51**(8): 2105-20.
238. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 2008; **319**(5867): 1244-7.
239. Kim HS, Choi DY, Yun SJ, et al. Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells. *J Proteome Res* 2012; **11**(2): 839-49.
240. Simpson RJ, Jensen SS, Lim JW. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics* 2008; **8**(19): 4083-99.
241. Hessvik NP, Phuyal S, Brech A, Sandvig K, Llorente A. Profiling of microRNAs in exosomes released from PC-3 prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2012; **1819**(11-12): 1154-63.
242. Bellingham SA, Coleman BM, Hill AF. Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic Acids Res* 2012; **40**(21): 10937-49.
243. Mittelbrunn M, Gutierrez-Vazquez C, Villarroya-Beltri C, et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun* 2011; **2**: 282.
244. Lotvall J, Valadi H. Cell to cell signalling via exosomes through esRNA. *Cell Adh Migr* 2007; **1**(3): 156-8.
245. Roma-Rodrigues C, Fernandes AR, Baptista PV. Exosome in tumour microenvironment: overview of the crosstalk between normal and cancer cells. *Biomed Res Int* 2014; **2014**: 179486.
246. Barile L, Moccetti T, Marban E, Vassalli G. Roles of exosomes in cardioprotection. *Eur Heart J* 2017; **38**(18): 1372-9.
247. Gupta S, Knowlton AA. HSP60 trafficking in adult cardiac myocytes: role of the exosomal pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; **292**(6): H3052-6.
248. van Balkom BW, de Jong OG, Smits M, et al. Endothelial cells require miR-214 to secrete exosomes that suppress senescence and induce angiogenesis in human and mouse endothelial cells. *Blood* 2013; **121**(19): 3997-4006, S1-15.
249. Feng Y, Huang W, Wani M, Yu X, Ashraf M. Ischemic preconditioning potentiates the protective effect of stem cells through secretion of exosomes by targeting Mecp2 via miR-22. *PLoS One* 2014; **9**(2): e88685.
250. Barile L, Lionetti V, Cervio E, et al. Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2014; **103**(4): 530-41.
251. Ibrahim AG, Cheng K, Marban E. Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy. *Stem Cell Reports* 2014; **2**(5): 606-19.
252. Gray WD, French KM, Ghosh-Choudhary S, et al. Identification of therapeutic covariant microRNA clusters in hypoxia-treated cardiac progenitor cell exosomes using systems biology. *Circ Res* 2015; **116**(2): 255-63.
253. Vicencio JM, Yellon DM, Sivaraman V, et al. Plasma exosomes protect the myocardium from ischemia-reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol* 2015; **65**(15): 1525-36.
254. Li J, Rohailla S, Gelber N, et al. MicroRNA-144 is a circulating effector of remote ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol* 2014; **109**(5): 423.
255. Pironti G, Strachan RT, Abraham D, et al. Circulating Exosomes Induced by Cardiac Pressure Overload Contain Functional Angiotensin II Type 1 Receptors. *Circulation* 2015; **131**(24): 2120-30.
256. de Jong OG, Verhaar MC, Chen Y, et al. Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes. *J Extracell Vesicles* 2012; **1**.
257. Halkein J, Tabruyn SP, Ricke-Hoch M, et al. MicroRNA-146a is a therapeutic target and biomarker for peripartum cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2013; **123**(5): 2143-54.
258. Bang C, Batkai S, Dangwal S, et al. Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest* 2014; **124**(5): 2136-46.

259. Gambim MH, do Carmo Ade O, Marti L, Verissimo-Filho S, Lopes LR, Janiszewski M. Platelet-derived exosomes induce endothelial cell apoptosis through peroxynitrite generation: experimental evidence for a novel mechanism of septic vascular dysfunction. *Crit Care* 2007; **11**(5): R107.
260. Wang X, Huang W, Liu G, et al. Cardiomyocytes mediate anti-angiogenesis in type 2 diabetic rats through the exosomal transfer of miR-320 into endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 2014; **74**: 139-50.
261. Fredj S, Bescond J, Louault C, Potreau D. Interactions between cardiac cells enhance cardiomyocyte hypertrophy and increase fibroblast proliferation. *J Cell Physiol* 2005; **202**(3): 891-9.
262. Tian J, Guo X, Liu XM, et al. Extracellular HSP60 induces inflammation through activating and up-regulating TLRs in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2013; **98**(3): 391-401.
263. Xu C, Lu Y, Pan Z, et al. The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes. *J Cell Sci* 2007; **120**(Pt 17): 3045-52.
264. Belevych AE, Sansom SE, Terentyeva R, et al. MicroRNA-1 and -133 increase arrhythmogenesis in heart failure by dissociating phosphatase activity from RyR2 complex. *PLoS One* 2011; **6**(12): e28324.
265. Giricz Z, Varga ZV, Baranyai T, et al. Cardioprotection by remote ischemic preconditioning of the rat heart is mediated by extracellular vesicles. *J Mol Cell Cardiol* 2014; **68**: 75-8.
266. Lai RC, Arslan F, Lee MM, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res* 2010; **4**(3): 214-22.
267. Arslan F, Lai RC, Smeets MB, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res* 2013; **10**(3): 301-12.
268. Lee C, Mitsialis SA, Aslam M, et al. Exosomes mediate the cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2012; **126**(22): 2601-11.
269. Sahoo S, Klychko E, Thorne T, et al. Exosomes from human CD34(+) stem cells mediate their proangiogenic paracrine activity. *Circ Res* 2011; **109**(7): 724-8.
270. Jakob P, Doerries C, Briand S, et al. Loss of angiomiR-126 and 130a in angiogenic early outgrowth cells from patients with chronic heart failure: role for impaired in vivo neovascularization and cardiac repair capacity. *Circulation* 2012; **126**(25): 2962-75.
271. Mackie AR, Klyachko E, Thorne T, et al. Sonic hedgehog-modified human CD34+ cells preserve cardiac function after acute myocardial infarction. *Circ Res* 2012; **111**(3): 312-21.
272. St John Sutton M, Pfeffer MA, Plappert T, et al. Quantitative two-dimensional echocardiographic measurements are major predictors of adverse cardiovascular events after acute myocardial infarction. The protective effects of captopril. *Circulation* 1994; **89**(1): 68-75.
273. de Jong R, Houtgraaf JH, Samiei S, Boersma E, Duckers HJ. Intracoronary stem cell infusion after acute myocardial infarction: a meta-analysis and update on clinical trials. *Circ Cardiovasc Interv* 2014; **7**(2): 156-67.
274. Houtgraaf JH, de Jong R, Monkhorst K, et al. Feasibility of intracoronary GLP-1 eluting CellBead infusion in acute myocardial infarction. *Cell transplantation* 2013; **22**(3): 535-43.
275. Wright EJ, Farrell KA, Malik N, et al. Encapsulated glucagon-like peptide-1-producing mesenchymal stem cells have a beneficial effect on failing pig hearts. *Stem cells translational medicine* 2012; **1**(10): 759-69.
276. Hashemi SM, Ghods S, Kolodgie FD, et al. A placebo controlled, dose-ranging, safety study of allogenic mesenchymal stem cells injected by endomyocardial delivery after an acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2008; **29**(2): 251-9.
277. Ishikawa K. Intracoronary injection of large stem cells: size matters. *Circ Cardiovasc Interv* 2015; **8**(5).
278. Bourdarias JP. Coronary reserve: concept and physiological variations. *Eur Heart J* 1995; **16 Suppl I**: 2-6.

279. Cheng K, Shen D, Xie Y, Cingolani E, Malliaras K, Marban E. Brief report: Mechanism of extravasation of infused stem cells. *Stem Cells* 2012; **30**(12): 2835-42.
280. Gallet R, de Couto G, Simsolo E, et al. Cardiosphere-derived cells reverse heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) in rats by decreasing fibrosis and inflammation. *JACC Basic Transl Sci* 2016; **1**(1-2): 14-28.
281. Grigorian-Shamagian L, Liu W, Fereydooni S, et al. Cardiac and systemic rejuvenation after cardiosphere-derived cell therapy in senescent rats. *Eur Heart J* 2017; **38**(39): 2957-67.
282. Tseliou E, Fouad J, Reich H, et al. Fibroblasts Rendered Antifibrotic, Antiapoptotic, and Angiogenic by Priming With Cardiosphere-Derived Extracellular Membrane Vesicles. *J Am Coll Cardiol* 2015; **66**(6): 599-611.
283. de Couto G, Gallet R, Cambier L, et al. Exosomal MicroRNA Transfer Into Macrophages Mediates Cellular Postconditioning. *Circulation* 2017; **136**(2): 200-14.

Résumé

Contexte : Parmi les nouveaux traitements de l'infarctus du myocarde, les cellules d'origine cardiaque dérivées des cardiosphères (CDCs) semblent prometteuses. Leur administration diminue la taille de la lésion dans l'infarctus constitué (études précliniques et cliniques) ainsi qu'à la phase aigüe de l'infarctus (ischémie reperfusion). Plusieurs études réalisées chez le rongeur suggèrent que 1) les cardiosphères pourraient avoir un potentiel thérapeutique supérieur à celui des CDCs, 2) les exosomes sécrétés par les CDCs seraient les médiateurs des effets observés et 3) l'injection des exosomes seuls pourrait mimer les effets des CDCs. L'objectif de cette thèse a donc été d'évaluer les effets des cardiosphères et des exosomes sécrétés par les CDCs dans des modèles porcins d'ischémie reperfusion et d'infarctus constitué.

Méthodes : La taille des cardiosphères a été optimisée en modifiant les conditions de culture. Les cardiosphères obtenues ont ensuite été administrées par voie intra-coronaire chez des porcs sains puis chez des animaux ayant subi un infarctus dans le cadre d'une étude randomisée contre placebo. Dans une deuxième étude, des exosomes sécrétés par les CDCs ont été testés. La dose ainsi que les modalités d'administration (intra-coronaire ou intra-myocardique) ont été déterminées dans un modèle d'ischémie reperfusion puis une étude randomisée contre placebo a été réalisée dans un modèle d'infarctus constitué. Le critère de jugement choisi a été la diminution de taille de la lésion d'infarctus mesurée par l'IRM pour les modèles d'infarctus constitués et par l'histologie pour les modèles d'ischémie reperfusion.

Résultats : L'optimisation des conditions de culture des cardiosphères a permis une perfusion par voie intra-coronaire sans risque chez les animaux sains et infarcis. Ces cardiosphères permettaient de bloquer le processus de remodelage inverse (préservation de la fraction d'éjection et de la fonction segmentaire) et de diminuer la taille de la zone infarcie. De plus, la perfusion coronaire mesurée de manière invasive et par IRM était améliorée. L'analyse histologique a confirmé ces données en montrant une diminution de la fibrose et une augmentation de la densité vasculaire. En revanche, l'administration par voie intra-coronaire des exosomes ne permettait pas de diminuer la taille d'infarctus alors que leur administration intra-myocardique le permettait (dans l'ischémie reperfusion et l'infarctus constitué). Cette diminution de taille d'infarctus s'accompagnait d'une préservation de la fraction d'éjection. Sur le plan histologique, ces modifications de fonction s'accompagnaient d'une diminution de l'inflammation et de l'apoptose dans le modèle d'ischémie reperfusion et d'une diminution de la fibrose et de l'hypertrophie cardiomyocytaire dans l'infarctus constitué.

Conclusion : Les cardiosphères permettent une diminution de la taille de l'infarctus et du remodelage inverse. De plus l'optimisation de leur taille permet une délivrance sans risque par voie intra-coronaire. Les exosomes peuvent remplacer les cellules dans l'ischémie reperfusion et dans l'infarctus constitué mais au prix d'une administration par voie intra-myocardique.

Mots clés : thérapie cellulaire ; Infarctus du myocarde ; modèles animaux ; exosomes

Abstract

Background: Among the new treatments that are under investigation for myocardial infarction, heart derived cardiosphere derived cells (CDCs) are promising. They are able to decrease infarct size in both chronic and acute myocardial infarction. Several preclinical studies conducted in rodents indicate that 1) the self-assembling microtissues known as cardiospheres may be more effective than dispersed CDCs, 2) the exosomes derived from CDCs may be the mediator of their effect and 3) the administration of exosomes might recapitulate the effects of CDCs. The aim of this thesis was to investigate the effect of cardiospheres and CDC-secreted exosomes in pig models of acute and chronic myocardial infarction.

Methods: We standardized the size of cardiospheres by modifying culture conditions. Then, the manufactured cardiospheres were delivered through the intra-coronary route, first to healthy pigs and then to infarcted pigs in a placebo controlled randomized study. In a second study, CDC-secreted exosomes were tested. Dosage and delivery route were optimized with an acute myocardial infarction model. Then, a placebo controlled randomized study was performed using a chronic myocardial infarction model. The endpoint was infarct size measured by MRI in the chronic model and by histology in the acute model.

Results: Optimized cardiospheres were safely delivered through the intra-coronary route both in healthy and infarcted pigs. These cardiospheres were able to halt adverse remodeling (preservation of ejection fraction and regional function) and to decrease infarct size. Moreover, coronary perfusion measured invasively and by MRI was improved. Consistently, histological analyses revealed reduced fibrosis and increased vascular density in cardiosphere treated animals. Unlike cardiospheres, intra-coronary exosomes did not reduce infarct size but intra-myocardial administration of exosomes did, both during acute and chronic myocardial infarction. The reduction in infarct size was associated with preserved ejection fraction. Histologically, we observed less inflammation and apoptosis in acute myocardial infarction and a decrease in fibrosis and cardiomyocyte hypertrophy in chronic myocardial infarction.

Conclusion: Intracoronary cardiospheres are effective in decreasing scar and halting adverse remodeling. Moreover, optimization of their size allows a safe intra-coronary delivery. In acute and chronic myocardial infarction, exosomes may be used instead of the cells but require intra-myocardial delivery.

Key words: Cell therapy; Myocardial infarction; animal models; exosomes

Utilisation de dérives cellulaires d'origine cardiaque au cours de l'ischémie reperfusion et du remodelage post-ischémique

Résumé

Contexte : Parmi les nouveaux traitements de l'infarctus du myocarde, les cellules d'origine cardiaque dérivées des cardiosphères (CDCs) semblent prometteuses. Leur administration diminue la taille de la lésion dans l'infarctus constitué (études précliniques et cliniques) ainsi qu'à la phase aigüe de l'infarctus (ischémie reperfusion). Plusieurs études réalisées chez le rongeur suggèrent que 1) les cardiosphères pourraient avoir un potentiel thérapeutique supérieur à celui des CDCs, 2) les exosomes sécrétés par les CDCs seraient les médiateurs des effets observés et 3) l'injection des exosomes seuls pourrait mimer les effets des CDCs. L'objectif de cette thèse a donc été d'évaluer les effets des cardiosphères et des exosomes sécrétés par les CDCs dans des modèles porcins d'ischémie reperfusion et d'infarctus constitué. Méthodes : La taille des cardiosphères a été optimisée en modifiant les conditions de culture. Les cardiosphères obtenues ont ensuite été administrées par voie intra-coronaire chez des porcs sains puis chez des animaux ayant subi un infarctus dans le cadre d'une étude randomisée contre placebo. Dans une deuxième étude, des exosomes sécrétés par les CDCs ont été testés. La dose ainsi que les modalités d'administration (intra-coronaire ou intra-myocardique) ont été déterminées dans un modèle d'ischémie reperfusion puis une étude randomisée contre placebo a été réalisée dans un modèle d'infarctus constitué. Le critère de jugement choisi a été la diminution de taille de la lésion d'infarctus mesurée par l'IRM pour les modèles d'infarctus constitués et par l'histologie pour les modèles d'ischémie reperfusion. Résultats : L'optimisation des conditions de culture des cardiosphères a permis une perfusion par voie intra-coronaire sans risque chez les animaux sains et infarcis. Ces cardiosphères permettaient de bloquer le processus de remodelage inverse (préservation de la fraction d'éjection et de la fonction segmentaire) et de diminuer la taille de la zone infarcie. De plus, la perfusion coronaire mesurée de manière invasive et par IRM était améliorée. L'analyse histologique a confirmé ces données en montrant une diminution de la fibrose et une augmentation de la densité vasculaire. En revanche, l'administration par voie intra-coronaire des exosomes ne permettait pas de diminuer la taille d'infarctus alors que leur administration intra-myocardique le permettait (dans l'ischémie reperfusion et l'infarctus constitué). Cette diminution de taille d'infarctus s'accompagnait d'une préservation de la fraction d'éjection. Sur le plan histologique, ces modifications de fonction s'accompagnaient d'une diminution de l'inflammation et de l'apoptose dans le modèle d'ischémie reperfusion et d'une diminution de la fibrose et de l'hypertrophie cardiomyocytaire dans l'infarctus constitué. Conclusion : Les cardiosphères permettent une diminution de la taille de l'infarctus et du remodelage inverse. De plus l'optimisation de leur taille permet une délivrance sans risque par voie intra-coronaire. Les exosomes peuvent remplacer les cellules dans l'ischémie reperfusion et dans l'infarctus constitué mais au prix d'une administration par voie intra-myocardique.

Mots clés : thérapie cellulaire ; Infarctus du myocarde ; modèles animaux ; exosomes

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

Université Paris-Est Créteil
8 Rue du Général Sarrail, 94000 Créteil