

Sciences médicales / Medical sciences

La thérapie cellulaire en cardiologie

Philippe Menasché

Département de chirurgie cardiovasculaire, hôpital européen Georges-Pompidou, Assistance publique-Hôpitaux de Paris, faculté de médecine, université Paris-5, Inserm U633, 20, rue Leblanc, 75908 Paris cedex 15, France

Reçu le 24 octobre 2006 ; accepté après révision le 4 mai 2007

Disponible sur Internet le 29 juin 2007

Présenté par Jean-François Bach et Nicole Le Douarin

Résumé

La thérapie cellulaire cardiaque a été conçue initialement pour régénérer des zones infarctées du myocarde en y implantant des cellules susceptibles d'en restaurer la fonctionnalité. Six ans après l'introduction de cette nouvelle approche en pratique clinique, l'heure est venue du bilan des premiers essais randomisés dans les trois indications principales que sont l'infarctus du myocarde, l'insuffisance cardiaque et l'angor réfractaire. Force est d'admettre que ces résultats sont mitigés, avec un bénéfice nul, transitoire et, au mieux, marginal. Les enseignements tirés de cette première vague d'études cliniques et des données expérimentales collectées simultanément sont toutefois riches et nombreux. Ils indiquent que les cellules adultes, musculaires ou médullaires, sont incapables de donner naissance à de nouveaux cardiomyocytes. Ils suggèrent que les éventuels bénéfices sont donc médiés par d'autres mécanismes, tels la limitation de la dilatation ventriculaire ou l'activation paracrine de voies de signalisation impliquées dans l'angiogenèse. Ils soulignent enfin le fait que l'effet thérapeutique des cellules ne pourra pleinement s'exprimer qu'après qu'auront été améliorés les techniques optimisant le transfert et la survie du greffon. Ces observations permettent ainsi de mieux focaliser la recherche des années à venir, dont l'un des objectifs majeurs reste le développement de cellules permettant une véritable régénération du myocarde détruit. Dans cette perspective, les plus grands espoirs sont aujourd'hui représentés par les cellules souches embryonnaires humaines. **Pour citer cet article : P. Menasché, C. R. Biologies 330 (2007).**

© 2007 Publié par Elsevier Masson SAS pour l'Académie des sciences.

Abstract

Cellular therapy in cardiology. Cardiac cell therapy has been initially designed to regenerate the infarcted myocardium through its repopulation by new cells able to restore function of scar areas. Six years after the first human application of this novel approach, it is timely appropriate to review the results of the first randomised trials in the three major indications, i.e., acute myocardial infarction, heart failure, and refractory angina. It should be recognized that the results are mixed, with benefits ranging from absent to transient and, at most, marginal. However, lessons drawn from this first wave of clinical series and the experimental data that have been concomitantly collected are multiple and highly informative. They indicate that adult stem cells, whether muscular or bone marrow-derived, fail to generate new cardiomyocytes. They suggest that the potential benefits of cardiac cell therapy are thus mediated by alternate mechanisms such as limitation of left ventricular remodelling or paracrine activation of signalling pathways involved in angiogenesis. They highlight the fact that the therapeutic benefits of grafted cells will not be fully exploited until issues of cell transfer and postengraftment survival have not been adequately addressed. These observations thus allow us to better fine-tune upcoming research, which should specifically concentrate on the development of cells featuring a true regeneration potential. In this setting, the greatest promises are currently held by embryonic stem cells. **To cite this article: P. Menasché, C. R. Biologies 330 (2007).**

Adresse e-mail : philippe.menasche@hop.egp.ap-hop-paris.fr.

1631-0691/\$ – see front matter © 2007 Publié par Elsevier Masson SAS pour l'Académie des sciences.

doi:10.1016/j.crv.2007.05.004

© 2007 Publié par Elsevier Masson SAS pour l'Académie des sciences.

Mots-clés : Thérapie cellulaire ; Insuffisance cardiaque ; Infarctus du myocarde ; Myoblastes ; Moelle sanguine ; Cellules souches embryonnaires

Keywords : Cell therapy ; Heart failure ; Myocardial infarction ; Myoblasts ; Bone marrow ; Embryonic stem cells

1. État des lieux

À ce jour, la thérapie cellulaire en cardiologie a utilisé des myoblastes squelettiques et des cellules médullaires et elle a concerné trois pathologies distinctes : l'insuffisance cardiaque chronique, l'infarctus du myocarde au stade aigu et l'angor réfractaire.

Dans le cas de l'insuffisance cardiaque chronique, la plupart des essais ont utilisé des myoblastes squelettiques autologues expandus en culture, puis réinjectés directement dans la cicatrice d'infarctus et à sa périphérie au cours d'interventions de pontage aorto-coronaire (la zone greffée étant ou non revascularisée). À ce jour, quatre essais chirurgicaux, totalisant 56 patients, ont été publiés [1–4]. Leurs résultats établissent la faisabilité de la technique et globalement sa tolérance, sous réserve d'un risque d'arythmies ventriculaires, dont il reste difficile d'affirmer qu'il est spécifiquement lié à l'implantation des myoblastes, compte tenu de la fréquence des troubles du rythme dans l'insuffisance cardiaque.

Toutefois, la petite taille de ces études de phase I, l'absence de groupes de contrôle et le caractère confondant des revascularisations associées rendent impossible toute conclusion valide quant à l'efficacité de ces greffes de myoblastes. C'est la raison pour laquelle a été entreprise une étude multicentrique, randomisée, contrôlée en double aveugle (MAGIC), dont les inclusions ont été terminées après qu'eurent été traités 97 patients. Le critère principal de jugement dans cet essai est l'amélioration de la fonction ventriculaire gauche régionale et globale, évaluée par échocardiographie au sixième mois après l'intervention ; les résultats sont en cours d'analyse. L'administration de myoblastes par cathéter n'a fait l'objet que de trois essais, utilisant pour deux d'entre eux la voie endoventriculaire gauche [5,6] et, pour le troisième, la voie transveineuse par le sinus coronaire [7]. Les conclusions que l'on peut en tirer sont très limitées et se résument, en fait, à la démonstration de la faisabilité technique de ces procédures.

Dans le cas de l'infarctus du myocarde au stade aigu, les cellules utilisées ont été celles de la moelle osseuse. Tous ces patients ont été dans un premier temps revascularisés de façon conventionnelle par angioplastie et mise en place d'une endoprothèse. Puis une biopsie de la crête iliaque a été pratiquée et, après centrifugation, les cellules mononuclées ont été réinjectées dans l'ar-

tère précédemment ouverte, dans des délais qui varient globalement de trois à huit jours après l'infarctus. Il s'agit donc d'injections de moelle non purifiée. Si toutes les études de phase I ont rapporté des résultats très positifs en termes d'amélioration de la fonction ventriculaire gauche, de la perfusion myocardique et de la viabilité métabolique, les résultats des premières études randomisées et contrôlées conduisent à nuancer quelque peu cet enthousiasme. À ce jour, quatre études de ce type ont été rapportées [8–11]. Elles totalisent 426 patients. Sur la base du critère principal de jugement (amélioration de la fraction d'éjection du ventricule gauche), trois d'entre elles sont négatives. Le seul essai positif rapporte une amélioration de la fraction d'éjection de 2,5%, pourcentage dont on peut discuter la signification clinique. Ces études ont cependant eu l'intérêt de dégager déjà quelques facteurs pronostiques ; c'est ainsi qu'une administration des cellules différée au delà du cinquième jour après l'infarctus, une altération marquée de la fonction ventriculaire gauche initiale et l'absence de micro-obstruction vasculaire semblent augmenter les chances d'obtenir un résultat positif. En revanche, à ce jour, aucun effet dose n'a pu clairement être mis en évidence, et le résultat fonctionnel semble dépendre davantage de la fonctionnalité des cellules que de leur nombre absolu [12]. Enfin, la tolérance à ces injections intracoronaires de cellules médullaires paraît excellente tant à court qu'à moyen terme (le recul le plus long est de 18 mois).

En marge de ces injections de moelle non fractionnée, deux autres approches ont été testées : l'une a consisté en une mobilisation des cellules souches médullaires par l'administration de G-CSF. Là encore, en dépit des espoirs qu'avaient pu susciter quelques études de phase I n'incluant qu'un petit nombre de patients, deux des trois essais randomisés publiés à ce jour [13–15] sont négatifs sur le critère principal de jugement (amélioration de la fonction ventriculaire gauche), le bénéfice observé dans l'étude positive portant essentiellement sur une diminution du remodelage ventriculaire. La seconde approche a testé une administration intracoronaire directe de progéniteurs CD133 sélectionnés par cytophèrese [16] : si cette étude a montré, chez les 21 patients inclus, une amélioration encourageante de la fraction d'éjection associée à une diminution des

défauts de perfusion, elle a toutefois été arrêtée, en raison d'un pourcentage inquiétant de lésions coronaires nouvelles, sous forme non seulement de re-sténose au site d'implantation de l'endoprothèse, mais également de nouveaux rétrécissements filiformes plus en aval. Enfin, une étude visant à évaluer les effets d'une injection intraveineuse de cellules mésenchymateuses allogéniques vient de se terminer aux États-Unis, mais les résultats n'en sont pas encore connus.

Dans le cas de l'angor réfractaire, on citera principalement l'étude randomisée PROTECT-CAD, récemment rapportée (American College of Cardiology, 2006) et qui a consisté en des injections par voie endoventriculaire gauche (et sous contrôle d'une cartographie électromagnétique) de cellules mononuclées chez 28 patients présentant un angor rebelle, ne pouvant plus relever des traitements de revascularisation conventionnels. Cette étude est positive sur la base d'un critère principal de jugement (épreuves d'effort), dont on peut discuter la robustesse. Un autre essai utilisant des injections endoventriculaires gauches de progéniteurs CD34+ est actuellement mené aux États-Unis chez des patients angineux du même type.

Trois conclusions principales ressortent de ces essais.

- (1) Leur faisabilité est bien établie, qu'il s'agisse des techniques d'expansion des myoblastes ou de la purification des progéniteurs hématopoïétiques de la moelle. Ces techniques apparaissent également globalement bien tolérées, sous réserve du risque d'arythmies ventriculaires, associé aux greffes de myoblastes. L'analyse des résultats de l'essai MAGIC, qui a comporté l'implantation d'un défibrillateur chez tous les patients, devrait permettre, par la lecture des tracés électrocardiographiques, de mieux préciser la relation de causalité éventuelle entre l'implantation des cellules musculaires et la survenue de ces troubles du rythme.
- (2) En matière d'efficacité, on retrouve le contraste habituel entre des essais de phase I, en général très enthousiastes, et des essais de phase II, dont les résultats sont beaucoup plus mitigés. Comme on l'a vu, la plupart des études contrôlées sont en effet négatives ; lorsqu'elles sont positives, le bénéfice est souvent modeste. Les nombreuses études en cours (dont l'une, multicentrique, en France, portant sur les injections intracoronaires de cellules médullaires au cours de l'infarctus du myocarde) devraient contribuer à clarifier le bénéfice réel apporté par ces greffes cellulaires et à préciser également les facteurs prédictifs d'un résultat favorable.
- (3) Le mécanisme du bénéfice éventuel reste largement spéculatif et plusieurs hypothèses sont actuellement évoquées.

2. Hypothèses mécanistiques

L'hypothèse qui prévaut actuellement est d'abord celle d'une limitation du remodelage ventriculaire gauche consécutive à l'infarctus, facteur d'insuffisance cardiaque à plus ou moins long terme. Cet effet a été observé avec pratiquement tous les types cellulaires testés sur des modèles de cardiopathie ischémique ou dilatée. Il procède sans doute d'une forme de contention par les amas de cellules greffées qui, en épaississant la paroi infarctée, contribuent à limiter la dilatation ventriculaire, bien que l'on ne puisse pas exclure, à côté de ce phénomène mécanique, un effet paracrine sur la matrice extracellulaire permettant d'en améliorer l'élasticité [17].

Le second mécanisme fait précisément intervenir une sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines par les cellules greffées [18]. L'amélioration des symptômes parkinsoniens par greffe de neurones dopaminergiques ou le sevrage de l'insuline chez certains diabétiques ayant reçu des îlots de Langerhans témoigne clairement de la capacité des cellules à exercer un bénéfice thérapeutique au travers de la libération d'un principe pharmacologiquement actif. Dans le cas du cœur, ce phénomène a principalement été documenté pour les cellules dérivées de la moelle, qui produisent une large gamme de médiateurs impliqués dans la survie cellulaire (Akt) [19], l'angiogenèse (VEGF) [20] et « l'adressage » des cellules circulantes vers les zones ischémiques (SDF-1) [21]. L'activation de ces voies de signalisation explique sans doute les effets angiogéniques des cellules médullaires greffées. D'autres cibles que les vaisseaux sont également envisageables, telles la matrice extracellulaire, dont le remodelage pourrait être ainsi favorablement modifié, ou les cellules souches cardiaques, dont les facteurs solubles libérés par le greffon activeraient la mobilisation. Cette dernière hypothèse reste cependant à vérifier. Globalement, toutefois, les caractéristiques des milieux conditionnés récupérés après culture cellulaire [22] crédibilisent fortement cette hypothèse paracrine qui, sur la base des travaux de génomique et protéomique que nous avons conduits en collaboration avec l'université de Pampelune (Pr. Felipe Prosper), semble aussi s'appliquer aux myoblastes squelettiques.

Le troisième mécanisme possible serait une véritable régénération du myocarde, c'est-à-dire la formation, à partir des cellules greffées, de cardiomyocytes capables de se coupler, sur le plan électromécanique,

avec ceux du receveur, pour aboutir à un syncytium fonctionnel. Force est de reconnaître qu'à ce jour, cet objectif n'a pu être atteint, ni avec les myoblastes squelettiques [23], ni avec les cellules de la moelle [24]. Les phénomènes de transdifférenciation qui ont été décrits avec enthousiasme apparaissent au mieux exceptionnels (en en tout cas incapables d'expliquer un gain fonctionnel) et, la plupart du temps, dus, soit à des artefacts en rapport avec la fluorescence, soit à des fusions avec les cellules-hôtes, conduisant à des structures hybrides naturellement porteuses des marqueurs de surface des cellules cardiaques natives, mais interprétées à tort comme des cellules du donneur ayant acquis un phénotype cardiaque [25,26].

3. Problèmes à régler

Trois d'entre eux méritent d'être détaillés, en raison de leurs fortes implications pratiques.

3.1. La rétention intracardiaque des cellules

Que les injections se fassent par voie épiscoparique, sous contrôle de la vue, au cours d'une intervention de chirurgie cardiaque, ou par cathéter, elles ne permettent qu'à une petite fraction des cellules de rester présentes dans le cœur. L'administration de cellules mâles à des rates a bien montré que le chromosome Y pouvait être identifié dans de multiples organes, traduisant ainsi une dissémination systémique majeure [27]. De même, chez le porc, ce n'est que 3% des cellules mésenchymateuses injectées par voie intracoronarique que l'on retrouve dans le cœur (chiffre très proche de celui rapporté dans une étude clinique), et ce pourcentage est encore réduit de moitié lorsque l'administration se fait par la voie endoventriculaire gauche [28]. Il y a donc un besoin réel d'améliorer les techniques d'injection par des systèmes permettant des transferts cellulaires précis, reproductibles et efficaces ou, peut-être, de développer des alternatives à l'injection, telles ces feuilles biocompatibles ensemencées par les cellules et qui se posent simplement à la surface du cœur [29]. Ces améliorations ne pourront venir que d'une étroite collaboration entre les biologistes et les industriels impliqués dans les dispositifs médicaux. Il est également important, dans une perspective sécuritaire, de mieux préciser le devenir des cellules ayant migré dans des localisations ectopiques.

3.2. La survie des cellules

L'efficacité thérapeutique potentielle des greffes cellulaires est encore obérée par le fait que, parmi celles

qui ont pu être retenues dans le tissu cardiaque cible, la majorité (jusqu'à 90%) meurent dans les jours qui suivent les injections [30]. Cette mort cellulaire est un phénomène multifactoriel, dans lequel interviennent la réponse inflammatoire aux injections elles-mêmes, l'apoptose, l'ischémie consécutive à la faible vascularisation des zones infarctées fibreuses greffées et la perte des rapports normaux des cellules avec la matrice extracellulaire.

Sur le plan pratique, ces deux derniers facteurs sont importants, car ils offrent une prise réelle à des interventions thérapeutiques ciblées. Ainsi, la vascularisation du greffon peut-elle être améliorée par de multiples stratégies fondées sur des procédés purement mécaniques (pontage coronarique ou angioplastie), la thérapie génique (administration de cellules génétiquement modifiées de façon à surexprimer des facteurs de croissance angiogénique ou co-injection directe desdits facteurs) [31,32], ou même la thérapie cellulaire (cotransplantation de cellules médullaires à fort potentiel angiogénique) [33]. La reconstitution d'une matrice extracellulaire apportant aux cellules transplantées un microenvironnement tridimensionnel physiologique est un autre objectif important pour optimiser la survie du greffon. La colle de fibrine, les solutions de collagène et, plus récemment, des nanopéptides qui s'auto-assemblent *in vivo* sont quelques-unes des stratégies qui ont été testées, et la liste n'est certainement pas exhaustive [34]. On soulignera toutefois l'intérêt suscité par ces fibres nanopéptidiques, qui peuvent être chargées par des facteurs de croissance, dont la libération prolongée dans le temps pourrait optimiser la trophicité du greffon et de son environnement cellulaire et vasculaire immédiat [35]. La thérapie cellulaire rejoint ici l'ingénierie tissulaire. Il apparaît donc que, pour améliorer l'efficacité thérapeutique des greffes cellulaires, il convient d'élargir le paradigme de la thérapie « cellulaire », en ne raisonnant plus uniquement en termes de cellules, mais en y incluant un support vasculaire et matriciel. Naturellement, l'évaluation objective de ces différentes stratégies d'optimisation de la survie des cellules transplantées nécessite le développement parallèle de techniques d'imagerie permettant un suivi itératif et non invasif du greffon. Sur ce plan, des perspectives prometteuses semblent ouvertes par le marquage des cellules à l'aide de particules ferriques, dont la traçabilité *in vivo* est ensuite assurée par résonance magnétique [36].

3.3. La fonctionnalité des cellules

Comme nous l'avons dit plus haut, la limite majeure des cellules somatiques adultes utilisées en cli-

nique à ce jour est leur incapacité à donner naissance à de véritables cardiomyocytes pouvant se coupler électriquement et mécaniquement avec ceux du receveur. Il s'agit pourtant là d'un pré-requis évident pour que le greffon se contracte de façon synchrone avec le cœur natif et contribue à en améliorer la fonction. De façon non surprenante, seules les greffes de cellules cardiaques fœtales, qui expriment naturellement les protéines de jonction (connexine 43, notamment) ont permis d'observer une telle synchronisation [37]. Les difficultés liées à l'utilisation des cellules fœtales incitent donc à rechercher d'autres types cellulaires ayant une vraie potentialité de différenciation cardiomyogénique. On peut, schématiquement, les classer en trois catégories.

La première regroupe des précurseurs potentiels résidant dans des tissus extracardiaques (muscle squelettique, moelle sanguine, graisse, sang de cordon) et susceptibles, en fonction de conditions de culture bien déterminées, de se différencier en cardiomyocytes [38–41]. À ce jour, leurs effets ont principalement été étudiés chez le petit animal et cette évolution phénotypique reste donc à confirmer sur des modèles cliniquement plus pertinents. La seconde catégorie de cellules est constituée par les cellules souches cardiaques [42]. De découverte récente, elles posent le problème de leur phénotype exact (plusieurs marqueurs de surface ont à ce jour été décrits), de leur persistance chez l'adulte, notamment porteur d'une cardiopathie ischémique, de leur accessibilité réelle par une biopsie endomyocardique et de leur capacité à se multiplier en culture sans perte de leur potentiel de différenciation. C'est dire que, si l'étude de ces cellules sera certainement riche d'enseignements en matière de biologie du développement cardiaque, leur utilisation thérapeutique paraît encore problématique. Enfin, la troisième catégorie de cellules est représentée par les cellules souches embryonnaires. Sans méconnaître les problèmes éthiques qu'elles posent, force est de reconnaître qu'à ce jour, elles seules ont fait la preuve de leur capacité à se différencier en cardiomyocytes, récapitulant *in vitro* les caractéristiques morphologiques, électrophysiologiques et fonctionnelles des cellules cardiaques [43]. Ces observations ont été confirmées sur des modèles d'infarctus chez les petits et les gros animaux [44], et la capacité d'intégration fonctionnelle de ce type de greffon a notamment été illustrée par la restauration d'une activité électrique après création d'un bloc auriculo-ventriculaire complet chez le porc et injection de cellules souches embryonnaires dans la paroi du ventricule gauche, le foyer de greffe se comportant alors comme un *pacemaker* ectopique [45]. Le pré-requis à l'utilisation de ces cel-

lules est naturellement leur spécification préalable afin de les orienter vers une différenciation cardiomyogénique, tant pour optimiser leur fonction *in vivo* que pour prévenir la survenue d'un tératome (qui ne s'est vu que lorsque les cellules ont laissées à l'état complètement indifférencié). De surcroît, leur immunogénicité, réelle mais faible, semble compatible avec une immunosuppression modérée dans la perspective de greffes allogéniques issues de banques permettant d'apparier au mieux la lignée « donneuse » et le receveur dans le système HLA [46]. Les problèmes à résoudre (amplification, spécification, sélection) restent nombreux, mais la rapidité de la recherche dans ce domaine ne rend pas impossible que ces cellules représentent, à relativement brève échéance, celles de la seconde génération, qui permettra d'atteindre l'objectif d'une véritable repopulation du myocarde par des cardiomyocytes issus du greffon.

En conclusion, la faisabilité technique de la thérapie cellulaire cardiaque est aujourd'hui bien établie et, globalement, l'expérience clinique montre une bonne tolérance aux transferts intramyocardiques de cellules médullaires et musculaires, même si une accélération des lésions coronaires, dans le premier cas, et des troubles du rythme, dans le second, ne peuvent encore être formellement éliminés, et exigent d'être mieux caractérisés. L'efficacité, en revanche, paraît marginale, ce qui est normal compte tenu du caractère encore balbutiant de cette nouvelle approche thérapeutique ; ces résultats mitigés ne surprennent que ceux qui ont d'emblée soulevé des espoirs démesurés, dont une analyse critique des données précliniques montrait déjà l'inanité. Ces essais cliniques initiaux ont cependant été riches d'enseignements et ont permis de mieux identifier les problèmes majeurs qu'il convient désormais de résoudre : type cellulaire adapté à la pathologie traitée, choix entre produit autologue et allogénique, dose optimale, amélioration des techniques de transfert cellulaire, développement parallèle de l'imagerie pour suivre le devenir des cellules greffées et évaluer, par conséquent, les stratégies visant à promouvoir leur survie au travers, notamment, de l'apport concomitant d'un support vasculaire et matriciel. Une autre leçon majeure de cette première série d'essais cliniques, corroborée par les données expérimentales les plus récentes, est que les cellules adultes ne donnent pas naissance à de nouveaux cardiomyocytes et qu'il faut donc poursuivre la quête de cellules capables d'assurer une véritable régénération myocardique. Ces études, qui comportent des aspects très fondamentaux, ne doivent toutefois pas conduire à l'arrêt des essais cliniques dès lors qu'ils sont correctement conçus et menés ; ces essais sont en effet ir-

remplaçables, non seulement pour évaluer l'impact de ces thérapies nouvelles sur le devenir des patients, mais aussi pour identifier des problèmes spécifiques à la pathologie humaine que les modèles précliniques les plus élaborés ont pu méconnaître et qui permettent, à leur tour, de mieux cibler la recherche expérimentale. Seul ce lien permanent entre laboratoire et hôpital permettra à la thérapie cellulaire de progresser : c'est cette approche qu'il faut encourager, en se tenant à égale distance de l'enthousiasme prématuré et du découragement non justifié.

Références

- [1] A.A. Hagege, J.-P. Marolleau, J.-T. Vilquin, A. Alhéritière, S. Peyrard, D. Duboc, E. Abergel, E. Messas, E. Mousseaux, K. Schwartz, M. Desnos, P. Menasché, Skeletal myoblast transplantation in ischemic heart failure: Long-term follow-up of the first phase I cohort of patients, *Circulation* 114 (Suppl. 1) (2006) 1108–1113.
- [2] J.J. Gavira, J. Herrerros, A. Perez, M.J. Garcia-Velloso, J. Barba, F. Martin-Herrero, C. Canizo, A. Martin-Arnau, J.M. Marti-Climent, M. Hernandez, N. Lopez-Holgado, J.M. Gonzalez-Santos, C. Martin-Luengo, E. Alegria, F. Prosper, Autologous skeletal myoblast transplantation in patients with nonacute myocardial infarction: 1-year follow-up, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 131 (2006) 799–804.
- [3] N. Dib, R.E. Michler, F.D. Pagani, S. Wright, D.J. Kereiakes, R. Lengerich, P. Binkley, D. Buchele, I. Anand, C. Swingen, M.F. Di Carli, J.D. Thomas, W.A. Jaber, S.R. Opie, A. Campbell, P. McCarthy, M. Yeager, V. Dilsizian, B.P. Griffith, R. Korn, S.K. Kreuger, M. Ghazoul, W.R. MacLellan, G. Fonarow, H.J. Eisen, J. Dinsmore, E. Diethrich, Safety and feasibility of autologous myoblast transplantation in patients with ischemic cardiomyopathy: four-year follow-up, *Circulation* 112 (2005) 1748–1755.
- [4] T. Siminiak, R. Kalawski, D. Fiszer, O. Jerzykowska, J. Rzezniczak, N. Rozwadowska, M. Kurpisz, Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: Phase I clinical study with 12 months offollow-up, *Am. Heart J.* 148 (2004) 531–537.
- [5] E. Biagini, M. Valgimigli, P.C. Smits, D. Poldermans, A.F. Schinkel, V. Rizzello, E.E. Onderwater, M. Bountiukos, P.W. Serruys, Stress and tissue Doppler echocardiographic evidence of effectiveness of myoblast transplantation in patients with ischaemic heart failure, *Eur. J Heart Fail.* (2006), Feb 27.
- [6] H. Ince, M. Petzsch, T.C. Rehders, T. Chatterjee, C.A. Nienaber, Transcatheter transplantation of autologous skeletal myoblasts in postinfarction patients with severe left ventricular dysfunction, *J. Endovasc. Ther.* 11 (2004) 695–704.
- [7] T. Siminiak, R. Kalawski, D. Fiszer, O. Jerzykowska, J. Rzezniczak, N. Rozwadowska, M. Kurpisz, Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: Phase I clinical study with 12 months of follow-up, *Am. Heart J.* 148 (2004) 531–537.
- [8] S. Janssens, C. Dubois, J. Bogaert, K. Theunissen, C. Deroose, W. Desmet, M. Kalantzi, L. Herbots, P. Sinnaeve, J. Dens, J. Maertens, F. Rademakers, S. Dymarkowski, O. Gheysens, J. Van Cleemput, G. Bormans, J. Nuyts, A. Belmans, L. Mortelmans, M. Boogaerts, F. Van de Werf, Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: Double-blind, randomised controlled trial, *Lancet* 367 (2006) 113–121.
- [9] G.P. Meyer, K.C. Wollert, J. Lotz, J. Steffens, P. Lippolt, S. Fichtner, H. Hecker, A. Schaefer, L. Arseniev, B. Hertenstein, A. Ganser, H. Drexler, 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* 113 (2006) 1287–1294.
- [10] V. Schachinger, S. Erbs, A. Elsasser, W. Haberbosch, R. Hambrecht, H. Holschermann, J. Yu, R. Corti, D.G. Mathey, C.W. Hamm, T. Suselbeck, B. Assmus, T. Tonn, S. Dimmeler, A.M. Zeiher, REPAIR-AMI Investigators, Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction, *N. Engl. J. Med.* 355 (2006) 1210–1221.
- [11] K. Lunde, S. Solheim, S. Aakhus, H. Arnesen, M. Abdelnoor, T. Egeland, K. Endresen, A. Ilebakk, A. Mangschau, J.G. Fjeld, H.J. Smith, E. Taraldsrud, H.K. Groggaard, R. Bjornerheim, M. Brekke, C. Muller, E. Hopp, A. Ragnarsson, J.E. Brinckmann, K. Forfang, Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction, *N. Engl. J. Med.* 355 (2006) 1199–1209.
- [12] S. Erbs, A. Linke, V. Adams, K. Lenk, H. Thiele, K.W. Diederich, F. Emmrich, R. Kluge, K. Kendziorra, O. Sabri, G. Schuler, R. Hambrecht, Transplantation of blood-derived progenitor cells after recanalization of chronic coronary artery occlusion: first randomized and placebo-controlled study, *Circ. Res.* 97 (2005) 756–762.
- [13] R.S. Ripa, E. Jorgensen, Y. Wang, J.J. Thune, J.C. Nilsson, L. Sondergaard, H.E. Johnsen, L. Kober, P. Grande, J. Kastrup, Stem cell mobilization induced by subcutaneous granulocyte-colony stimulating factor to improve cardiac regeneration after acute ST-elevation myocardial infarction: Result of the double-blind, randomized, placebo-controlled stem cells in myocardial infarction (STEMMI) trial, *Circulation* 113 (2006) 1983–1992.
- [14] D. Zohnhofer, I. Ott, J. Mehili, K. Schomig, F. Michalk, T. Ibrahim, G. Meisetschlager, J. von Wedel, H. Bollwein, M. Seyfarth, J. Dirschinger, C. Schmitt, M. Schwaiger, A. Kastrati, A. Schomig, REVIVAL-2 Investigators, Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: A randomized controlled trial, *JAMA* 295 (2006) 1003–1010.
- [15] H. Ince, M. Petzsch, H.D. Kleine, H. Schmidt, T. Rehders, T. Korber, C. Schumichen, M. Freund, C.A. Nienaber, Preservation from left ventricular remodeling by front-integrated revascularization and stem cell liberation in evolving acute myocardial infarction by use of granulocyte-colony-stimulating factor (FIRSTLINE-AMI), *Circulation* 112 (2005) 3097–3106.
- [16] S. Mansour, M. Vanderheyden, B. De Bruyne, B. Vandekerckhove, L. Delrue, I. Van Haute, G. Heyndrickx, S. Carlier, G. Rodriguez-Granillo, W. Wijns, J. Bartunek, Intracoronary delivery of hematopoietic bone marrow stem cells and luminal loss of the infarct-related artery in patients with recent myocardial infarction, *J. Am. Coll. Cardiol.* 47 (2006) 1727–1730.
- [17] C.E. Murry, H. Reinecke, L.M. Pabon, Regeneration gaps: observations on stem cells and cardiac repair, *J. Am. Coll. Cardiol.* 47 (2006) 1777–1785.
- [18] R. Uemura, M. Xu, N. Ahmad, M. Ashraf, Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling, *Circ. Res.* 98 (2006) 1414–1421.
- [19] A.A. Mangi, N. Noiseux, D. Kong, H. He, M. Rezvani, J.S. Ingwall, V.J. Dzau, Mesenchymal stem cells modified with Akt

- prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts, *Nat. Med.* 9 (2003) 1195–1201.
- [20] Y.L. Tang, Q. Zhao, X. Qin, L. Shen, L. Cheng, J. Ge, M.I. Phillips, Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction, *Ann. Thorac. Surg.* 80 (2005) 229–236; discussion 236–237.
- [21] Y. Misao, G. Takemura, M. Arai, S. Sato, K. Suzuki, S. Miyata, K. Kosai, S. Minatoguchi, T. Fujiwara, H. Fujiwara, Bone marrow-derived myocyte-like cells and regulation of repair-related cytokines after bone marrow cell transplantation, *Cardiovasc. Res.* 69 (2006) 476–490.
- [22] M. Gnecci, H. He, O.D. Liang, L.G. Melo, F. Morello, H. Mu, N. Noiseux, L. Zhang, R.E. Pratt, J.S. Ingwall, V.J. Dzau, Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells, *Nat. Med.* 11 (2005) 367–368.
- [23] B. Leobon, I. Garcin, P. Menasché, J.-T. Vilquin, E. Audinat, S. Charpak, Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100 (2003) 7808–7811.
- [24] L. Lagostena, D. Avitabile, E. De Falco, A. Orlandi, F. Grassi, M.G. Iachininoto, G. Ragone, S. Fucile, G. Pompilio, F. Eusebi, M. Pesce, M.C. Capogrossi, Electrophysiological properties of mouse bone marrow c-kit+ cells co-cultured onto neonatal cardiac myocytes, *Cardiovasc. Res.* 66 (2005) 482–492.
- [25] C.E. Murry, M.H. Soonpaa, H. Reinecke, H. Nakajima, H.O. Nakajima, M. Rubart, K.B. Pasumarthi, J.I. Virag, S.H. Bartelmez, V. Poppa, G. Bradford, J.D. Dowell, D.A. Williams, L.J. Field, Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts, *Nature* 428 (2004) 664–668.
- [26] L.B. Balsam, A.J. Wagers, J.L. Christensen, T. Kofidis, I.L. Weissman, R.C. Robbins, Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium, *Nature* 428 (2004) 668–673.
- [27] J. Dow, B.Z. Simkhovich, L. Kedes, R.A. Kloner, Washout of transplanted cells from the heart: A potential new hurdle for cell transplantation therapy, *Cardiovasc. Res.* 67 (2005) 301–307.
- [28] T. Freyman, G. Polin, H. Osman, J. Crary, M. Lu, L. Cheng, M. Palasis, R.L. Wilensky, A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction, *Eur. Heart J.* 27 (2006) 1114–1122.
- [29] I.A. Memon, Y. Sawa, N. Fukushima, G. Matsumiya, S. Miyagawa, S. Taketani, S.K. Sakakida, H. Kondoh, A.N. Aleshin, T. Shimizu, T. Okano, H. Matsuda, Repair of impaired myocardium by means of implantation of engineered autologous myoblast sheets, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 130 (2005) 1333–1341.
- [30] A. Maurel, K. Azarnoush, L. Sabbah, N. Vignier, M. Le Lorc'h, C. Mandet, A. Bissery, I. Garcin, C. Carrion, M. Fiszman, P. Bruneval, A. Hagege, A. Carpentier, J.T. Vilquin, P. Menasché, Can cold or heat shock improve skeletal myoblast engraftment in infarcted myocardium?, *Transplantation* 80 (2005) 660–665.
- [31] T.M. Yau, G. Li, R.D. Weisel, A. Rehemian, Z.Q. Jia, D.A. Mickle, R.K. Li, Vascular endothelial growth factor transgene expression in cell-transplanted hearts, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 127 (2004) 1180–1187.
- [32] K. Azarnoush, A. Maurel, L. Sebbah, C. Carrion, A. Bissery, C. Mandet, J. Pouly, P. Bruneval, A.A. Hagege, P. Menasché, Enhancement of the functional benefits of skeletal myoblast transplantation by means of coadministration of hypoxia-inducible factor 1 alpha, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 130 (2005) 173–179.
- [33] I.A. Memon, Y. Sawa, S. Miyagawa, S. Taketani, H. Matsuda, Combined autologous cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and bone marrow cells in canine hearts for ischemic cardiomyopathy, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 130 (2005) 646–653.
- [34] M.E. Davis, J.P. Motion, D.A. Narmoneva, T. Takahashi, D. Hakuno, R.D. Kamm, S. Zhang, R.T. Lee, Injectable self-assembling peptide nanofibers create intramyocardial microenvironments for endothelial cells, *Circulation* 111 (2005) 442–450.
- [35] P.C. Hsieh, M.E. Davis, J. Gannon, C. MacGillivray, R.T. Lee, Controlled delivery of PDGF-BB for myocardial protection using injectable self-assembling peptide nanofibers, *J. Clin. Invest.* 116 (2006) 237–248.
- [36] D.J. Stuckey, C.A. Carr, E. Martin-Rendon, D.J. Tyler, C. Willmott, P.J. Cassidy, S.J. Hale, J.E. Schneider, L. Tatton, S.E. Harding, G.K. Radda, S. Watt, K. Clarke, Iron particles for non-invasive monitoring of bone marrow stromal cell engraftment into, and isolation of viable engrafted donor cells from, the heart, *Stem Cells* 24 (2006) 1968–1975.
- [37] M. Rubart, K.B. Pasumarthi, H. Nakajima, M.H. Soonpaa, H.O. Nakajima, L.J. Field, Physiological coupling of donor and host cardiomyocytes after cellular transplantation, *Circ. Res.* 92 (2003) 1217–1224.
- [38] S.O. Winitzky, T.V. Gopal, S. Hassanzadeh, H. Takahashi, D. Gryder, M.A. Rogawski, K. Takeda, Z.X. Yu, Y.H. Xu, N.D. Epstein, Adult murine skeletal muscle contains cells that can differentiate into beating cardiomyocytes in vitro, *PLoS Biol.* 3 (2005) e87.
- [39] Y.S. Yoon, A. Wecker, L. Heyd, J.S. Park, T. Tkebuchava, K. Kusano, A. Hanley, H. Scadova, G. Qin, D.H. Cha, K.L. Johnson, R. Aikawa, T. Asahara, D.W. Losordo, Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 326–338.
- [40] V. Planat-Benard, C. Ménard, M. André, M. Puceat, A. Perez, J.M. Garcia-Verdugo, L. Penicaud, L. Casteilla, Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells, *Circ. Res.* 94 (2004) 223–229.
- [41] J. Leor, E. Guetta, M.S. Feinberg, H. Galski, I. Bar, R. Holbova, L. Miller, P. Zarin, D. Castel, I.M. Barbash, A. Nagler, Human umbilical cord blood-derived CD133+ cells enhance function and repair of the infarcted myocardium, *Stem Cells* 24 (3) (2006) 772–780.
- [42] M.S. Parmacek, J.A. Epstein, Pursuing cardiac progenitors: regeneration redux, *Cell* (2005) 295–298.
- [43] D.M. Hodgson, A. Behfar, L.V. Zingman, G.C. Kane, C. Perez-Terzic, A.E. Alekseev, M. Puceat, A. Terzic, Stable benefit of embryonic stem cell therapy in myocardial infarction, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287 (2004) H471–H479.
- [44] C. Ménard, A.A. Hagege, O. Agbulut, M. Barro, M.-C. Morichetti, C. Brasselet, A. Bel, E. Messas, A. Bissery, P. Bruneval, M. Desnos, M. Puceat, P. Menasché, Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium: A preclinical study, *Lancet* 366 (2005) 1005–1012.
- [45] I. Kehat, L. Khimovich, O. Caspi, A. Gepstein, R. Shofti, G. Arbel, I. Huber, J. Satin, J. Itskovitz-Eldor, L. Gepstein, Electro-mechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells, *Nat. Biotechnol.* 22 (2004) 1282–1289.
- [46] C.J. Taylor, E.M. Bolton, S. Pocock, L.D. Sharples, R.A. Pedersen, J.A. Bradley, Banking on human embryonic stem cells: Estimating the number of donor cell lines needed for HLA matching, *Lancet* 366 (2005) 2019–2025.