



HAL
open science

Mise en place d'un modèle d'étude chez la souris de l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs pour l'évaluation de stratégies thérapeutiques

Virgile Visentin

► **To cite this version:**

Virgile Visentin. Mise en place d'un modèle d'étude chez la souris de l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs pour l'évaluation de stratégies thérapeutiques. Biologie cellulaire. 2012. dumas-01473683

HAL Id: dumas-01473683

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01473683>

Submitted on 22 Feb 2017

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.

**CONSERVATOIRE NATIONAL DES ARTS ET MÉTIERS
MIDI-PYRÉNÉES**

SCIENCES ET TECHNIQUES DU VIVANT
Option
GÉNIE BIOLOGIQUE

MÉMOIRE D'INGÉNIEUR

**Mise en place d'un modèle d'étude chez la souris
de l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs
pour l'évaluation de stratégies thérapeutiques**

Présenté par **Virgile VISENTIN**

Soutenu le 27 janvier 2012

Président du jury : **Professeur P. POCHART** (CNAM Paris)
Professeur des Universités

Membres du jury : **Docteur C. KNAUF** (CNAM Toulouse)
MCF Université Paul Sabatier, Toulouse (I2MR - INSERM U858)

Docteur V. BOURLIER
MCF Université Paul Sabatier, Toulouse (I2MR - INSERM U858)

Professeur I. CASTAN-LAURELL
Professeur Université Paul Sabatier, Toulouse (I2MR - INSERM U858)

Responsable hiérarchique :

Docteur F. DOL
Responsable du service « *in vivo* Biology », Toulouse (E2C - Sanofi)

Résumé

L'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI) définit l'occlusion brutale ou chronique des artères qui assurent la vascularisation des membres inférieurs. L'interruption du flux sanguin, principalement favorisée par l'installation de l'athérosclérose, entraîne la dégénérescence des muscles qui aboutit pour les cas les plus sévères à l'amputation de la jambe. Aucun traitement n'est à ce jour reconnu. Les recherches s'orientent vers la stimulation des processus de néovascularisation via l'administration de facteurs de croissance comme le fibroblast growth factor (FGF) ou la greffe de cellules progénitrices endothéliales (EPCs). Les études cliniques démontrent la faisabilité et l'innocuité de ces deux approches. Néanmoins l'amélioration encourageante des paramètres cliniques reste à être confirmée sur un nombre de patients plus important et mérite d'être stabilisée dans le temps. Ainsi, pour être prédictif de l'efficacité thérapeutique chez l'Homme, la recherche expérimentale se doit de développer des modèles précliniques qui soient les plus pertinents de la pathologie humaine. C'est dans cette perspective que nous avons mis en place un modèle murin d'AOMI chez les souris Balb/c nude en vue d'évaluer dans un premier temps de façon distincte le bénéfice thérapeutique de la stimulation du système FGF et de l'administration d'EPCs avant d'envisager par la suite l'association de ces deux approches. La ligation de l'artère fémorale permet la mise en place d'un modèle qui présente une revascularisation fonctionnelle avec un niveau de reperfusion post-ischémique modérée qui autorise la mise en évidence de son amélioration dans le cadre d'une approche thérapeutique qui vise à stimuler la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Comme chez l'Homme, la néovascularisation produite est dépendante des processus physiologiques d'angiogenèse, d'artériogenèse et de vasculogenèse. De plus, la dégénérescence et le changement de statut métabolique des muscles qui caractérisent le modèle sont également observés dans le cadre de la pathologie humaine. Nous avons montré que l'activation du fibroblast growth factor receptor-4 (FGFR-4) par un agoniste chimique, le SAR X, protège des atteintes nécrotiques de la patte et stimule une reperfusion post-ischémique stable dans le temps. Néanmoins, l'administration d'EPCs, seules ou via l'utilisation de matrices protéiques, ne montre pas de bénéfice thérapeutique sur notre modèle. Les conditions expérimentales restent à être optimisées avant d'envisager d'associer ce concept de thérapie cellulaire à un prétraitement et/ou un co-traitement avec le SAR X. Il semble cependant important de s'attacher à recréer une ischémie chronique pour évaluer le bénéfice de nouvelles stratégies thérapeutiques dans un cadre plus pertinent de la pathologie humaine.

Remerciements

Je souhaite tout d'abord exprimer mes remerciements aux membres du jury. Je remercie Philippe Pochart pour avoir accepté d'en être le président, et Claude Knauf pour son encadrement pendant mon cursus CNAM. Mes remerciements vont également à Isabelle Castan-Laurell et Virginie Bourlier pour le temps qu'elles ont accordé à la lecture de ce mémoire et l'intérêt qu'elles ont porté à mon travail.

Je remercie Jean-Marc Herbert et Françoise Bono pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer mon stage au sein du service E2C (*Early to Candidate*). Merci Françoise pour ta disponibilité et tes précieux conseils.

J'adresse mes sincères remerciements à Frédérique Dol pour avoir dirigé ce projet. Elle m'a permis de consacrer le temps nécessaire à sa réalisation et m'a laissé une grande liberté dans la gestion de mon travail. Nos discussions ont été pour moi très constructives. Merci pour ton aide et tes encouragements.

Je remercie tout particulièrement Caroline Pendaries pour son appui scientifique tout au long de ce stage, pour son soutien moral et pour avoir participé à la relecture du manuscrit. Merci KRO...

Je remercie l'ensemble du service DSAR (*Disposition Safety and Animal Research*), et plus particulièrement le service *Early Bioanalysis group (Drug Disposition, Montpellier)* et l'équipe toulousaine du service ARW (*Animal Research Welfare*) pour le soin apporté aux animaux.

Merci à Laurent Andrieu pour son expertise lors des analyses statistiques.

Enfin, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Catherine, Gaëlle, Gigi, Florence, Laurence, Marie, Christophe, David, Joël, et tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail. Un grand merci pour votre aide et vos nombreux conseils.

Table des matières

Résumé	1
Remerciements	2
Table des matières	3
Liste des abréviations	7
Liste des figures et tableaux	8
Introduction	10
1- <u>L'artériopathie oblitérante des membres inférieurs</u>	10
1-1 Epidémiologie	10
1-2 Diagnostic clinique	11
1-3 Alternatives thérapeutiques actuelles	13
2- <u>Stimulation thérapeutique de la croissance vasculaire</u>	14
2-1 Néovascularisation physiologique	14
2-1-1 <u>Initiation de la revascularisation</u>	14
2-1-2 <u>L'angiogenèse</u>	15
2-1-3 <u>L'artériogenèse</u>	17
2-2 Potentiel thérapeutique du FGF	18
2-2-1 <u>Ligands et récepteurs</u>	18
2-2-2 <u>Effets biologiques du système FGF-FGFR</u>	20
2-2-2-1 Dégradation de la matrice extracellulaire	20
2-2-2-2 Prolifération et migration des cellules endothéliales	20
2-2-2-3 Bénéfice anti-apoptotique	20
2-2-2-4 Régulation croisée avec le VEGF	21
2-2-3 <u>Voies de signalisations intracellulaires</u>	21
2-3 Potentiel thérapeutique des EPCs	22
2-3-1 <u>La vasculogenèse</u>	22
2-3-2 <u>Caractérisation phénotypique</u>	24

2-4 Recherches cliniques	25
2-4-1 <u>Facteurs de croissance</u>	25
2-4-2 <u>Thérapie cellulaire avec les EPCs</u>	27
3- <u>Modèles expérimentaux d'AOMI</u>	29
3-1 Sélection de la souche murine	29
3-2 Induction chirurgicale de l'ischémie	30
3-3 Critères d'évaluation de la régénération vasculaire post-ischémique	31
3-3-1 <u>Symptômes physiques</u>	31
3-3-2 <u>Estimation de la néovascularisation</u>	31
3-3-3-1 Suivi de la reperfusion de la patte ischémisée	31
3-3-3-2 Immunohistochimie	32
3-3-3-3 Imagerie du petit animal	32
3-3-3-4 Marqueurs de la néovascularisation	33
4- <u>Projet de recherche</u>	33
Matériels et Méthodes	35
1- <u>Animaux</u>	35
1-1 Hébergement et manipulation	35
1-2 Induction chirurgicale de l'ischémie	35
2- <u>Elaboration du projet de recherche</u>	37
2-1 Mise en place d'un modèle d'AOMI chez la souris nude	37
2-1-1 <u>Protocoles expérimentaux</u>	37
2-1-2 <u>Suivi de la reperfusion post-ischémique par imagerie Doppler</u>	37
2-1-3 <u>Estimation de la survie de la patte ischémisée</u>	38
2-1-4 <u>Dosages plasmatiques et musculaires</u>	38
2-1-5 <u>Histologie</u>	39
2-1-5-1 Immunohistochimie et hybridation <i>in situ</i>	39
2-1-5-2 Colorations structurales	40
2-1-6 <u>Numération sanguine</u>	40
2-1-7 <u>Injection <i>in vivo</i> d'isolectine fluorescente</u>	40
2-1-8 <u>Caractérisation phénotypique des PB-MNCs</u>	40
2-1-8-1 Coloration au May Grünwald Giemsa	41
2-1-8-2 Incorporation du LDL acétylé et fixation de l'isolectine	41

2-2 Evaluation du bénéfice thérapeutique de la stimulation de la voie FGF	42
2-2-1 <u>Protocoles expérimentaux</u>	42
2-2-2 <u>Paramètres évalués pendant l'étude</u>	42
2-3 Evaluation du bénéfice thérapeutique de la greffe d'EPCs	43
2-3-1 <u>Protocoles expérimentaux</u>	43
2-3-2 <u>Biologie moléculaire</u>	43
2-3-3 <u>Paramètres évalués pendant l'étude</u>	44
3- <u>Analyses statistiques</u>	44
Résultats	46
<i>Partie 1 : Mise en place d'un modèle d'AOMI chez la souris nude</i>	<i>46</i>
1- <u>Sélection du fond génétique</u>	46
1-1 Reperfusion post-ischémique	46
1-2 Survie de la patte ischémique	47
2- <u>Modèle d'AOMI développé chez la souris Balb/c nude</u>	48
2-1 Reperfusion post-ischémique	49
2-2 Analyse macroscopique	50
2-2-1 <u>Evolution pondérale et survie de la patte ischémique</u>	50
2-2-2 <u>Poids des muscles de la patte</u>	50
2-3 Analyse microscopique	52
2-4 Modifications environnementales	54
2-4-1 <u>Métabolisme énergétique</u>	54
2-4-2 <u>Composante inflammatoire</u>	55
2-4-2-1 Inflammation systémique	55
2-4-2-2 Inflammation musculaire	56
2-5 Activité angiogénique	57
2-6 Fonctionnalité de la revascularisation	58
2-7 Mise en évidence de la vasculogénèse chez la souris	60
2-7-1 <u>Identification des EPCs chez les souris Balb/c nude</u>	60
2-7-2 <u>Souris NSG humanisées</u>	62

<i>Partie 2 : Evaluation du bénéfice thérapeutique de la stimulation de la voie FGF</i>	63
1- <u>Etude de biodisponibilité du SAR X</u>	64
2- <u>Evaluation du SAR X</u>	65
2-1 Analyse macroscopique	65
2-1-1 <u>Evolution pondérale</u>	65
2-1-2 <u>Survie de la patte ischémique</u>	66
2-2 Analyse fonctionnelle	66
2-2-1 <u>Reperfusion post-ischémique</u>	66
2-2-2 <u>Activité angiogénique</u>	67
2-2-3 <u>Fonctionnalité de la revascularisation</u>	68
<i>Partie 3 : Evaluation du bénéfice thérapeutique de la greffe d'EPCs</i>	70
1- <u>Comparaison phénotypique des EPCs et des HUVECs</u>	70
2- <u>Sélection de la voie d'administration</u>	71
2-1 Reperfusion post-ischémique	71
2-2 Analyse macroscopique	72
2-3 Analyse microscopique	72
3- <u>Injection locale avec l'utilisation de matrices protéiques</u>	73
3-1 Matrigel®	73
3-1-1 <u>Reperfusion post-ischémique</u>	74
3-1-2 <u>Analyse macroscopique</u>	74
3-1-3 <u>Analyse microscopique</u>	75
3-1-3-1 Visualisation de la structure des muscles	75
3-1-3-2 Détection des cellules injectées	75
3-2 Acide hyaluronique	77
3-2-1 <u>Reperfusion post-ischémique</u>	77
3-2-2 <u>Analyse macroscopique</u>	78
3-2-3 <u>Analyse microscopique</u>	79
Discussion et perspectives	80
Conclusion	93
Annexes	95
Références bibliographiques	104

Liste des abréviations

α -SMA : α -smooth muscle actin	GMPc : guanosine monophosphate cyclique
Ac I ou II : anticorps primaire ou de détection	HA : hyaluronic acid
Ac-LDL : LDL acétylé	HGF : hepatocyte growth factor
ADN : acide désoxyribonucléique	HIF-1 α : hypoxia-inducible factor-1 α
ADNc : ADN complémentaire	HSPGs : heparan sulfate proteoglycans
ANCOVA : analysis of covariance	HUVECs : human umbilical vein endothelial cells
Ang-1/2 : angiopoïétine-1/2	i.m : intramusculaire
ANOVA : ANalysis Of VAriance	i.v : intraveineuse
AOMI : artériopathie oblitérante des membres inférieurs	IgD/IgG : immunoglobuline D ou G
ApoE : apolipoprotein E	IHC : immunohistochimie
ARNm : acide ribonucléique messenger	IL-6 : interleukin-6
ATP : adénosine-5'-triphosphate	IPS : index de pression systolique
AUC : area under curve	ISH : hybridation <i>in situ</i>
BM-MNCs : bone marrow mononuclear cells	LDL : low density lipoprotein
BSA : bovine serum albumin	MAPK : mitogen-activated protein kinase
CD : cluster of differentiation	MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1
CEPAL : Comité d'Ethique Pour les Animaux de Laboratoire	MGG : May Grünwald Giemsa
CMLs : cellules musculaires lisses	MMPs : matrix metalloproteinases
CRP : C reactive protein	MNCs : mononuclear cells
CXCR4 : CXC chemokine receptor 4	myf-5 : myogenic factor-5
DAB : diaminobenzidine	MyoD : myogenic differentiation
Dil : 1,1'-dioctadecyl-3,3',3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate	NO : nitric oxide
DO : densité optique	NSG : NOD/SCID/IL2R γ ^{-/-}
EBM-2 : endothelial cell basal medium-2	PIGF : placental growth factor
EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid,	PARP : Poly ADP-ribose polymerase
EGF : epidermal growth factor	PB-MNC : peripheral blood mononuclear cells
EGM-2 : endothelial cell growth medium-2	PBS : phosphate buffer saline
ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay	PCR : polymerase chain reaction
ERKs : extracellular signal-regulated kinases	PDGF : platelet derived growth factor
eNOS : endothelial nitric oxide synthase	PHD : prolyl 4-hydroxylase
EPCs : endothelial progenitor cells	PI3K : phosphoinositide 3-kinase
EPO : érythropoïétine	PKB : protein kinase B
FDA : Food and Drug Administration	PKC δ : protein kinase C δ
FELASA : Federation of European Laboratory Animal Science Associations	R ³ -IGF-1 : R ³ - Insulin-like growth factor-1
FGF : fibroblast growth factor	RIPA : RadioImmunoPrecipitation Assay
FGFR : fibroblast growth factor receptor	SAR : sanofi aventis research
FITC : fluorescein isothiocyanate	s.c : sous-cutané
Flk-1 : foetal liver kinase-1	SDF-1 : stromal cell-derived factor-1
Flt-1 : FMS-like tyrosine kinase-1	SPF : specific pathogen free
FMS : gene encodes the receptor for the macrophage colony-stimulating factor	TBP : TATA box binding protein
G-CSF : granulocyte colony-stimulating factor	TcPO2 : pression transcutanée d'oxygène
GM-CSF : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	TGF- β : transforming growth factor- β
	Tie-2 : TEK tyrosine endothelial
	TNF- α : tumor necrosis factor- α
	uPA : urokinase plasminogen activator
	VEGF : vascular endothelial growth factor
	VEGFRs : vascular endothelial growth factor receptors

Liste des figures et tableaux

Introduction

Figure 1 : Diagnostic et prise en charge de l'AOMI.	13
Figure 2 : Acteurs cellulaires et moléculaires de l'angiogenèse.	16
Figure 3 : Remodelage du système vasculaire pendant le processus d'artériogenèse.	17
Figures 4 : Structures génériques du FGF (A) et de son récepteur (B).	19
Figure 5 : Voies de signalisations intracellulaires du système FGF/FGFR.	21
Figure 6 : Implication des EPCs dans la réparation tissulaire post-ischémique.	23
Figure 7 : Processus physiologiques régissant la synthèse de nouveaux vaisseaux sanguins.	25
Tableau 1 : Administration clinique de facteurs de croissance dans le cadre de l'AOMI.	26
Tableau 2 : Administration clinique de BM-MNC et de PB-MNC dans le cadre de l'AOMI.	27
Figure 8 : Organisation du réseau vasculaire de la face interne de la cuisse chez la souris.	31
Figure 9 : Suivi par tomographie 3D de la néovascularisation post-ischémique chez la souris.	32

Matériels et Méthodes

Figures 1 : a- Illustration schématique du réseau fémoral superficiel de la souris. b- Procédures chirurgicales d'induction de l'ischémie.	36
Figures 2 : Laser Doppler MoorLDI2-HR™. a-Logiciel d'acquisition des données. b-Logiciel de quantification.	38

Résultats

Partie 1 : Mise en place d'un modèle d'AOMI chez la souris nude

Sélection du fond génétique : comparaison des souches C57Bl6 et Balb/c

Figure 1 : Suivi de la reperfusion distale post-ischémique par imagerie Doppler.	47
Figure 2 : Estimation de la survie de la patte ischémisée.	47

Caractérisation du modèle d'AOMI chez les souris Balb/c nude

Figures 3 : Suivi de la reperfusion distale post-ischémique par imagerie Doppler. a- Cartographie infrarouge. b- Cinétique de reperfusion.	49
Figure 4 : Estimation de la survie de la patte ischémisée.	50
Figures 5 : a- Poids des muscles de la cuisse. b- Poids des muscles du mollet.	51
Figure 6 : Structure des muscles de la cuisse et du mollet après 14 jours d'ischémie.	52
Figure 7 : Histologie structurale des muscles du mollet.	53
Figure 8 : Suivi des taux plasmatiques d'acide lactique.	54
Figure 9 : Suivi du nombre de globules blancs circulants.	55
Figure 10 : Suivi des taux plasmatiques de MCP-1.	56
Figures 11 : a- Suivi de la quantité de F4-80 musculaire (cuisse). b- Localisation de la protéine F4-80 au niveau des muscles de la cuisse (J3 post-ischémie).	57
Figures 12 : a- Suivi de la quantité de CD105 musculaire (cuisse). b- Localisation de la protéine CD105 au niveau des muscles de la cuisse (J3 post-ischémie).	58
Figure 13 : Revascularisation post-ischémique fonctionnelle des muscles de la cuisse et du mollet.	59
Figure 14 : Identification morphologique des PB-MNCs adhérentes après 7 jours de culture.	61
Figure 15 : Imagerie fluorescente des PB-MNCs adhérentes après 7 jours de culture.	61
Figure 16 : Implication de la vasculogenèse dans la régénération vasculaire post-ischémique des souris NSG humanisées.	62

Partie 2 : Evaluation du bénéfice thérapeutique de la stimulation de la voie FGF

Tableau 1 : Pharmacocinétique tissulaire du SAR X (1 mg/kg) après son injection intramusculaire (cuisse).	64
Figure 17 : Evolution pondérale post-ischémique.	65
Figure 18 : Estimation de la survie de la patte ischémisée.	66
Figure 19 : Suivi de la reperfusion distale post-ischémique par imagerie Doppler.	67
Figure 20 : Quantité de CD105 musculaire après 28 jours d'ischémie (cuisse).	67
Figure 21 : Suivi de la reperfusion distale post-ischémique par imagerie Doppler. Etude de stabilité de la néovascularisation.	69

Partie 3 : Evaluation du bénéfice thérapeutique de la greffe d'EPCs

Tableau 2 : Profil d'expression des ARNm des récepteurs au VEGF et au FGF pour les EPCs et les HUVECs.	70
Figure 22 : Suivi de la reperfusion distale post-ischémique par imagerie Doppler. Comparaison des voies d'administration i.v et i.m des EPCs et des HUVECs.	72
Figure 23 : Suivi de la reperfusion distale post-ischémique par imagerie Doppler. Administration locale des EPCs et des HUVECs avec du Matrigel®.	74
Figure 24 : Histologie structurale des muscles de la cuisse (J14 post-ischémie). Administration i.m d'EPCs et d'HUVECs avec du Matrigel®.	75
Figures 25 : Détection des EPCs humaines (a) et des HUVECs (b) administrées avec du Matrigel® au niveau des muscles de la cuisse (14 jours post-ischémie). ISH ALU.	76
Figure 26 : Suivi de la reperfusion distale post-ischémique par imagerie Doppler. Administration locale des EPCs avec de l'acide hyaluronique.	78
Figure 27 : Estimation de la survie de la patte ischémisée. Administration locale des EPCs avec de l'acide hyaluronique.	79

Discussion et perspectives

Figures 1 : Analyse immunohistochimique de nouveaux vaisseaux sanguins (muscle du mollet).	84
Figure 2 : Mise en évidence des EPCs isolées à partir de MNCs issues de sang humain.	85
Figures 3 : a- Localisation musculaire des cellules satellites. b- Contrôle de l'évolution phénotypique des cellules satellites.	88

Annexes

Figure 1 : Génération des souris NOD/SCID/IL2R $\gamma^{-/-}$ humanisées.	95
Figure 2 : Structure imagée du SAR X.	96

Introduction

Les pathologies vasculaires ischémiques sont provoquées par l'obstruction brutale ou chronique du système vasculaire artériel. Trois territoires anatomiques sont principalement exposés : le cerveau, le cœur et les membres inférieurs (artériopathie oblitérante des membres inférieurs, AOMI). L'interruption du flux sanguin entraîne la dégénérescence des tissus situés en aval de l'occlusion. L'importance physiologique des organes exposés fait des pathologies vasculaires la première cause de mortalité dans les pays développés ou en voie de développement. Il n'existe pas à ce jour de traitement pour lutter contre les pathologies vasculaires ischémiques. Les recherches actives autour du concept d'angiogenèse thérapeutique présagent de l'intérêt de promouvoir la synthèse naturelle de nouveaux vaisseaux sanguins pour rétablir la vascularisation des territoires en souffrance. Parmi les différentes perspectives thérapeutiques, deux approches ont particulièrement retenu notre attention. La première d'entre elles, prévoit de stimuler la régénération du réseau artériel en administrant aux patients des facteurs de croissances vasculaires pour favoriser la néovascularisation. La seconde approche qui a suscité notre intérêt est tournée vers la perspective d'une médecine régénérative qui utiliserait le potentiel thérapeutique des cellules souches. En effet, les résultats prometteurs obtenus lors de la greffe de cellules souches pour restaurer la fonctionnalité d'un tissu lésé nous laissent présager de la pertinence de la thérapie cellulaire pour promouvoir la régénération vasculaire. Néanmoins, la revue des recherches actuelles réalisée dans le cadre de mon mémoire bibliographique montre une efficacité modérée de ces approches qui pourrait être améliorée en envisageant leur combinaison. Nous décrivons dans le cadre de ce mémoire, la mise en place d'un modèle pharmacologique murin d'AOMI développé pour évaluer le bénéfice de ces deux voies thérapeutiques, utilisées seules ou en association, vis à vis de l'ischémie des membres inférieurs.

1- L'artériopathie oblitérante des membres inférieurs

1-1 Epidémiologie

L'AOMI se traduit par le rétrécissement ou l'occlusion des artères principales ou secondaires qui assurent l'irrigation des membres inférieurs. En France, 800 000 patients âgés de plus de 60 ans, et plus particulièrement les hommes, sont aujourd'hui pris en charge pour une AOMI et on estime à deux millions le nombre de personnes potentiellement atteintes par cette pathologie vasculaire qui reste longtemps silencieuse.

Le mode de vie des pays industrialisés prédispose leur population à la principale cause de l'occlusion du système artériel : l'athérosclérose. Cette affection qui évolue lentement avec l'âge est notamment favorisée par le tabagisme, l'inactivité physique et des pathologies telles que l'hyperlipidémie, le diabète ou l'hypertension artérielle. L'athérosclérose se développe suivant différentes phases régies par l'inflammation et l'accumulation lipidique¹. Dans sa phase précoce, on observe un dépôt de lipides (stries lipidiques) sur la paroi interne des artères de gros et moyen calibre. Ces lésions évoluent pour former une plaque inflammatoire qui s'enrichit de cristaux de cholestérol, de LDL oxydés, de cellules immunitaires spumeuses et de cellules musculaires en prolifération. Ce noyau instable s'entoure d'une chape fibreuse de tissu conjonctif, qui peut éventuellement se calcifier et rendre l'artère rigide. Une étape cruciale de l'installation de ces lésions est l'infiltration de monocytes dans l'espace sous endothélial de l'artère où ils vont se différencier en macrophages et entretenir localement une inflammation chronique via la sécrétion de nombreuses cytokines et chimiokines qui sont responsables du développement, puis de la fragilisation de la plaque d'athérome. Les forces hémodynamiques qui s'exercent sur les parois artérielles sont susceptibles de décrocher en partie cette plaque, et le fragment migrant peut obstruer une artère de plus petit diamètre. Les risques d'occlusion sont également augmentés par le rétrécissement de la lumière du vaisseau sanguin qui favorise l'adhésion et l'agrégation de plaquettes sanguines qui initient la formation d'un thrombus qui ralentit, puis bloque la circulation sanguine. Chez un individu sain les épisodes ischémiques resteraient transitoires, une néovascularisation physiologique se mettrait en place pour assurer la reperfusion des tissus en souffrance. Mais les facteurs de risques qui favorisent l'installation de l'athérosclérose sont décrits pour engendrer la déficience des processus physiologiques qui permettent la synthèse de nouveaux vaisseaux sanguins. Notons que l'AOMI peut également avoir une cause non athéromateuse : la thromboangéite oblitérante (maladie de Buerger)². L'inflammation occlusive et segmentaire des artères et des veines de petit et moyen calibre aboutit à une thrombose des vaisseaux atteints. L'étiologie de cette pathologie est inconnue, mais le rôle du tabac paraît prépondérant dans le déclenchement et l'évolution de la maladie.

1-2 Diagnostic clinique

Les manifestations cliniques de l'AOMI sont variables, son diagnostic passe par l'évaluation des facteurs de risque (questionnaire) et un examen clinique bilatéral³. La palpation des pouls et l'auscultation des artères des membres inférieurs à la recherche d'un souffle artériel sont les premiers examens permettant de déceler une anomalie circulatoire lorsque le patient se plaint d'une gêne pendant la marche ou au repos. Le déficit de perfusion de la jambe est associé

à une souffrance musculaire qui se traduit par une atrophie et une dégénérescence du tissu. La mesure de la pression transcutanée d'oxygène (TcPO₂) permet de quantifier le manque d'oxygénation de la peau qui est prédictif de l'apparition d'ulcérations et de nécroses.

Le diagnostic de l'AOMI est confirmé par la détermination du flux sanguin par imagerie Doppler et par la mesure de l'index de pression systolique à la cheville (IPS). Ce dernier paramètre qui représente le rapport entre la pression artérielle systolique à la cheville et la pression artérielle systolique brachiale traduit une AOMI lorsqu'il est inférieur à 0,9. Lorsque l'IPS est supérieur à 1,3 les artères sont considérées comme incompressibles, signe de rigidité artérielle. Une angiographie est prescrite comme examen complémentaire pour faire un bilan plus précis grâce à la visualisation du réseau artériel par imagerie rayons X.

Selon la classification de Leriche et Fontaine, le diagnostic de l'AOMI distingue 4 stades :

- Stade I : absence de symptomatologie fonctionnelle, mais abolition d'un ou plusieurs poulx qui traduisent l'oblitération d'un ou plusieurs troncs artériels.

- Stade II : ischémie musculaire qui se manifeste par une claudication intermittente, c'est-à-dire une douleur ou une faiblesse musculaire lors de la marche et qui impose l'arrêt de l'effort. On établit 3 niveaux de sévérité qui prennent en compte le périmètre de marche : stade IIa (supérieur à 500 m), stade IIb (entre 100 et 500 m), et stade IIc (inférieur à 100 m).

- Stade III : ischémie tissulaire permanente caractérisée par des douleurs de décubitus (position allongée). Ces douleurs sont distales, elles débutent par les orteils avant de s'étendre à l'ensemble du pied. Elles apparaissent après un temps variable de décubitus, d'autant plus court que l'insuffisance artérielle est sévère.

- Stade IV : ischémie évoluée avec troubles trophiques qui peut se traduire si rien n'est fait par des ulcérations et/ou des gangrènes de tout ou partie de la zone mal irriguée. Les nécroses (mort tissulaire) touchent progressivement les orteils, le pied puis la jambe.

Cette classification est complétée par la notion d'ischémie critique lorsque les troubles trophiques sont installés depuis plus de 15 jours et sont associés à une chute des pressions systoliques au dessous de 50 mmHg à la cheville ou de 30 mmHg au niveau des orteils. Les patients diagnostiqués à ce stade sont dans une situation à haut risque d'amputation du membre, et pour les cas les plus sévères, le pronostic vital peut se trouver engagé.

1-3 Alternatives thérapeutiques actuelles

La prise en charge de l'AOMI est différente selon les patients, elle est fonction des facteurs de risque, des symptômes et du stade de la pathologie (Figure 1). La médecine ne propose néanmoins pas de traitement curatif pour l'AOMI - à l'exception des molécules de la classe des vasodilatateurs périphériques, mais la preuve thérapeutique de leur efficacité est à ce jour remise en question - La prise en charge de l'AOMI passe en premier lieu par la correction des facteurs de risques liés à l'installation de l'athérosclérose et au déficit de revascularisation. Le patient doit changer ses habitudes comportementales (arrêt du tabac, modification du régime alimentaire, augmentation de l'activité physique...) et prendre quotidiennement un traitement visant à réduire les facteurs de risques pathologiques : antidiabétiques, hypocholestérolémiants, hypotenseurs ou encore antiagrégants plaquettaires.

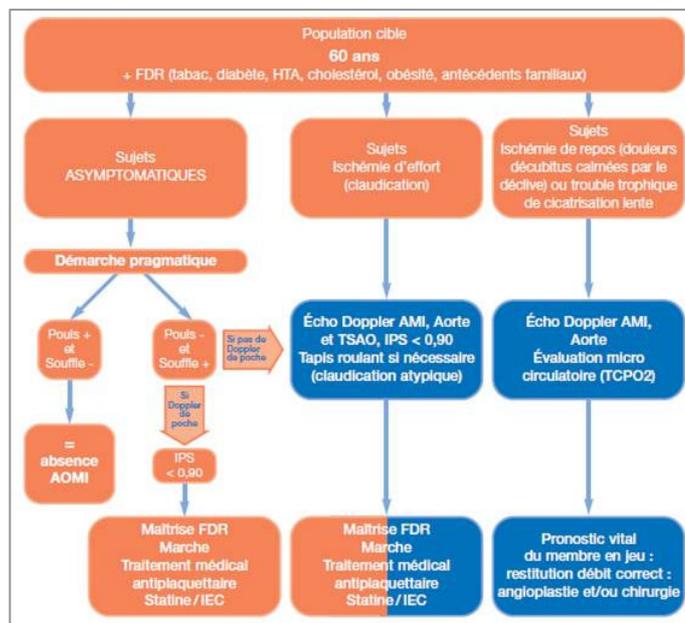


Figure 1 : Diagnostic et prise en charge de l'AOMI.
Campagne pour la prévention « Des pas pour la vie ».

Si l'AOMI est diagnostiquée au stade de l'ischémie critique, la correction des facteurs de risque décrite précédemment n'est pas suffisante, il est nécessaire de compléter la prise en charge par l'administration d'anticoagulants et par la gestion de la douleur. Lorsque l'ischémie est aiguë, une intervention sur le(s) site(s) d'occlusion(s) est réalisable : lyse du thrombus par perfusion locale d'agents fibrinolytiques, angioplastie par passage de ballonnet, pose de stents ou pontage artériel. Mais dans le cas d'une ischémie chronique, la disparité des occlusions et leur difficile accessibilité anatomique (vaisseaux sanguins de petits diamètres) ne permettent pas d'action chirurgicale, la prévalence des amputations augmente dramatiquement.

Rétablir la revascularisation pathologiquement déficiente en stimulant la synthèse de nouveaux vaisseaux sanguins pourrait être une stratégie garante d'espoir pour les patients atteints d'une AOMI. Dans cette perspective, mon service explore deux voies complémentaires :

- *promouvoir l'efficacité des facteurs de croissance impliqués dans les mécanismes de vascularisation, et plus particulièrement celle du FGF (fibroblast growth factor),*
- *promouvoir le recrutement sur le site d'ischémie de cellules progénitrices endothéliales (EPCs : endothelial progenitor cells), cellules précurseurs des cellules vasculaires.*

2- Stimulation thérapeutique de la croissance vasculaire

Le système vasculaire est le premier système organique qui se met en place pendant l'embryogenèse. A l'âge adulte son développement reste un évènement peu fréquent. Le taux de division cellulaire dans les épithéliums vasculaires est très faible, les cellules endothéliales connaissent un état de quiescence qui peut durer plusieurs années. Il existe néanmoins une néovascularisation naturelle qui se met en place lors de la cicatrisation tissulaire, les cycles de croissance des cheveux, ou encore pendant la maturation de la muqueuse utérine. En condition physiologique la croissance vasculaire est principalement sous contrôle hormonal, mais dans le cadre de l'ischémie la néovascularisation est initiée par les modifications environnementales consécutives à l'obstruction du réseau vasculaire artérielle.

2-1 Néovascularisation physiologique

2-1-1 Initiation de la revascularisation

La néovascularisation post-ischémique est initiée par trois phénomènes principaux : l'augmentation des forces de cisaillement au niveau du point d'oblitération, l'inflammation et l'hypoxie des tissus environnants qui est due à la diminution de l'apport sanguin en oxygène. Ces modifications environnementales engendrent la synthèse des facteurs biologiques impliqués dans la régulation du développement vasculaire.

- Les forces de cisaillement exercent un double effet sur les vaisseaux et les plaquettes : elles facilitent l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium ainsi que leur agrégation (activité sécrétoire locale pro-vasculaire), et elles augmentent la sécrétion de facteurs endothéliaux vasoactifs comme le monoxyde d'azote (agent vasodilatateur).

- La privation en oxygène et en nutriments va entraîner une inflammation systémique accentuée par une inflammation locale causée par l'augmentation des forces de cisaillement. Monocytes, lymphocytes, plaquettes sont attirés sur le site inflammatoire par des agents chimiotactiques tels que la chimiokine MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) produite par les cellules endothéliales ou les macrophages. Suite à leur mobilisation, les cellules inflammatoires produisent à leur tour des facteurs solubles qui vont stimuler la mobilisation, la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses (CMLs). Parmi ces facteurs sécrétés, on retrouve des facteurs de croissance, des enzymes protéolytiques et des médiateurs de l'inflammation.

- La privation graduelle en oxygène mène les tissus environnants à l'hypoxie. La régulation de la néovascularisation par l'hypoxie passe par la stabilisation du facteur de transcription HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α). En conditions physiologiques, c'est-à-dire en normoxie, la PHD (prolyl 4-hydroxylase) se lie à l'oxygène et hydroxyle des résidus proline du facteur de transcription HIF-1 α . Une fois hydroxylé, HIF-1 α s'associe avec le produit du gène von Hippel-Lindau pour être rapidement dégradé dans le protéasome. En absence d'oxygène, l'hydroxylation de HIF-1 α par la PHD est inhibée. Ne pouvant pas être dégradé, HIF-1 α s'accumule dans le cytoplasme et migre vers le noyau où il va induire la transcription de gènes codant pour la synthèse (suivant le gradient d'hypoxie) de protéines impliquées dans la croissance vasculaire, dont notamment des facteurs de croissance et de leurs récepteurs, des facteurs hématopoïétiques et de l'angiopoïétine-2 (Ang-2).

2-1-2 L'angiogenèse

L'angiogenèse décrit l'augmentation de la densité du réseau vasculaire grâce à la croissance par bourgeonnement des vaisseaux sanguins préexistants (Figure 2).

Initiée par l'inflammation et l'hypoxie⁴, l'angiogenèse débute par une phase de vasodilatation et de perméabilisation de la structure vasculaire principalement dépendante de l'activité biologique du VEGF (vascular endothelial growth factor) et de l'Ang-2. La dégradation de la lame basale par des enzymes protéolytiques (MMPs : matrix metalloproteinases, héparinases, protéases) et le remaniement des protéines d'adhésion matricielles favorise la migration et la prolifération des cellules endothéliales locales qui s'organisent sous forme de tubules pour former la lumière du nouveau vaisseau sanguin. Ce phénomène est principalement sous le contrôle du VEGF, du PlGF (placenta growth factor) et du FGF-2. Cependant peu de choses sont connues sur les signaux qui guident les cellules endothéliales pour s'organiser en trois dimensions. Des analogies de

développement et de localisation anatomique entre le système vasculaire et le système nerveux laissent entrevoir une implication des acteurs de la guidance neuronale comme les neuropilines, les éphrines ou encore la nétrine.

A ce stade de l'angiogenèse le vaisseau sanguin en formation est fragile. Le PDGF (platelet derived growth factor) sécrété par les cellules endothéliales permet le recrutement de CMLs et de péricytes environnants qui s'organisent autour du capillaire. L'angiopoïétine-1 (Ang-1) sécrétée par les cellules murales stabilise la structure en croissance en liant sur son récepteur endothélial Tie-2. Cette interaction est consolidée par le TGF- β (transforming growth factor- β), qui de plus, joue un rôle prépondérant dans la maturation du capillaire en inhibant la prolifération et la migration des cellules endothéliales et en stimulant la production de matrice extracellulaire. La régulation de la croissance vasculaire passe également par la déstabilisation des vaisseaux non fonctionnels. Lorsque l'Ang-2 exerce son effet vasodilatatoire sur la structure vasculaire en absence de VEGF (contrairement à la phase initiale de perméabilisation cellulaire), la déstabilisation du vaisseau ne conduit pas à la pousse vasculaire, l'Ang-2 devient dans ces conditions un facteur de régression vasculaire.

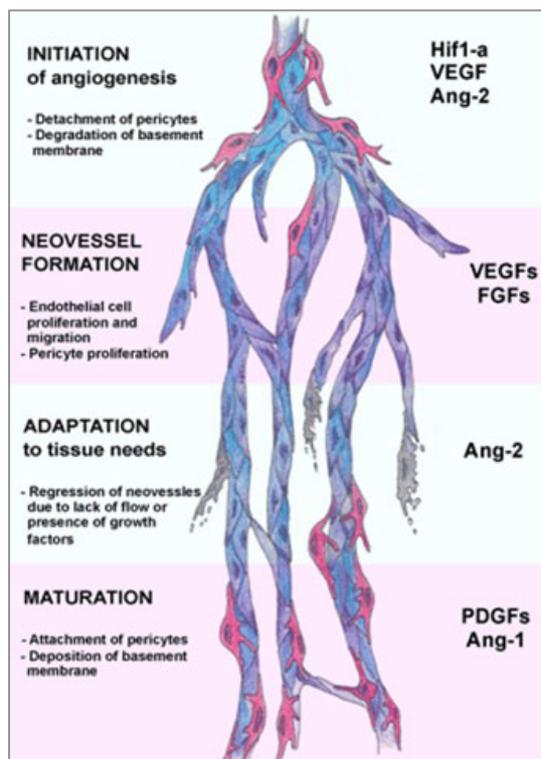


Figure 2 : Acteurs cellulaires et moléculaires de l'angiogenèse. Markkanen et al. 2005⁵.

L'angiogenèse est initiée en réponse à l'hypoxie par la stabilisation du facteur de transcription HIF-1 α . Le développement de la structure vasculaire implique dans un premier temps une phase de relaxation au cours de laquelle le VEGF et l'Ang-2 assurent la dégradation de la membrane basale et le détachement des péricytes. Puis, les cellules endothéliales activées par l'hypoxie prolifèrent et migrent pour s'organiser en tubules sous l'action des VEGFs et des FGFs (notons la prolifération conjointe des péricytes environnants). Les nouveaux vaisseaux non fonctionnels dégèrent sous l'action de l'Ang-2 qui en absence de VEGF exerce une action déstabilisatrice sur la structure vasculaire. Le processus d'angiogenèse s'achève par la maturation des capillaires fonctionnels. Au cours de cette ultime étape principalement régie par les PDGFs et l'Ang-1, la lumière endothéliale nouvellement formée est stabilisée par le recouvrement de péricytes et la formation de la lame basale.

Ang-1/2 : angiopoïétine-1/2, FGFs : fibroblast growth factors, HIF-1 α : hypoxia-inducible factor-1 α , PDGFs : platelet-derived growth factors, VEGF(s) : vascular endothelial growth factor (s).

2-1-3 L'artériogénèse

L'artériogénèse permet le remodelage des artérioles préexistantes lorsque la pression hémodynamique locale augmente suite à l'occlusion d'une ou plusieurs artères principales. Ce remaniement structural a pour but d'augmenter le diamètre et donc la capacité de transport des artérioles préexistantes (Figure 3). Ce processus compensatoire qui n'est pas dépendant de l'hypoxie est initié par l'action combinée des contraintes de cisaillement et de cytokines pro-inflammatoires, dont notamment la chimiokine MCP-1 qui est décrite pour jouer un rôle essentiel pendant le remodelage du système artériel⁶. En effet, MCP-1 favorise l'entrée dans la matrice extracellulaire des monocytes qui, après activation, sécrètent des MMPs et des facteurs de croissance qui vont promouvoir le développement du réseau vasculaire.

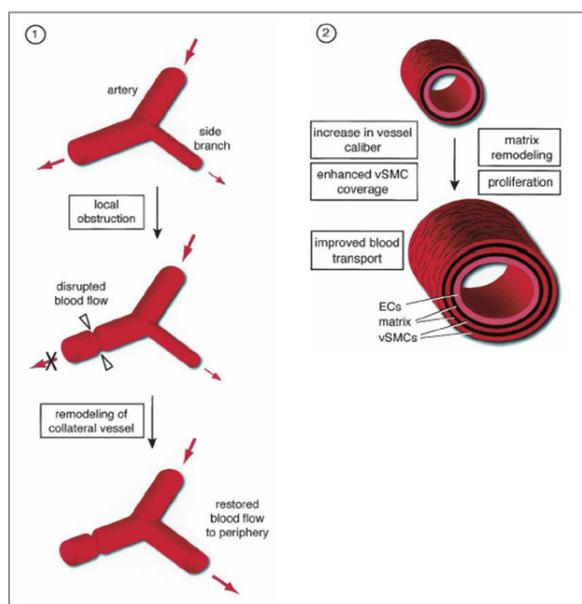


Figure 3 : Remodelage du système vasculaire pendant le processus d'artériogénèse. Modifié de Roca et al. 2007⁷.

1. Suite à l'interruption du flux sanguin au niveau d'une artère principale le sang est véhiculé par des artères collatérales qui augmentent de diamètre au cours du processus d'artériogénèse pour s'adapter aux nouvelles conditions hémodynamiques.

2. Le remodelage artériel dépendant de l'artériogénèse implique la réorganisation de la matrice extracellulaire et la prolifération des cellules structurales du vaisseau (cellules musculaires lisses et cellules endothéliales). L'augmentation de diamètre des artérioles préexistantes est suivie par la superposition de feuillets de CMLs et de matrice extracellulaire qui confèrent à la nouvelle structure vasculaire la résistance nécessaire pour supporter le nouveau flux sanguin qui s'exerce sur ses parois.

vSMCs : vascular smooth muscle cells, ECs : endothelial cells.

L'artériogénèse débute par une phase de vasodilatation vasculaire. Les cellules endothéliales activées par l'augmentation des forces de cisaillement produisent un puissant agent vasodilatateur : le monoxyde d'azote (NO). Sa synthèse s'effectue à partir de la L-arginine grâce à l'activité enzymatique de la NOS endothéliale (eNOS : endothelial nitric oxide synthase). Le NO prend part dans la régulation de l'artériogénèse en induisant la vasodilatation des vaisseaux via la voie du GMPc (guanosine monophosphate cyclique). Ce nucléotide qui sert de second messenger pour de nombreuses fonctions cellulaires est particulièrement impliqué dans le mécanisme de relaxation des CMLs (notons que le NO intervient également lors de la phase de vasodilatation vasculaire qui initie le processus d'angiogénèse). La vasodilatation du vaisseau sanguin s'accompagne de la prolifération des cellules endothéliales et des CMLs qui est stimulée par le VEGF, le FGF et le TGF- β . Ces facteurs de croissance vasculaire sont séquestrés dans la

matrice extracellulaire ou sont produits par les cellules endothéliales activées et les cellules immunocompétentes. Parallèlement à la phase de prolifération, l'activité protéolytique des monocytes forme un espace dans la matrice extracellulaire pour que les cellules puissent migrer et proliférer. Ainsi, la digestion de la lame élastique interne permet la libération et la migration des CMLs depuis la média vers l'espace subendothélial, créant ainsi une couche néointimale épaisse typique d'une structure artérielle. Les forces de cisaillement régulent la différenciation artério-veineuse essentielle à la spécialisation fonctionnelle et structurale du vaisseau. Elles augmentent l'expression endothéliale de molécules spécifiques du phénotype artériel et diminuent les marqueurs veineux⁸. Le processus d'artériogénèse s'achève probablement lorsque les forces de cisaillement diminuent sous une valeur minimale suite à l'élargissement des vaisseaux. L'artériogénèse intervient également au moment du remodelage final des artères néoformées pendant les processus d'angiogénèse et de vasculogénèse (mécanisme de néovascularisation que nous détaillerons par la suite) pour adapter leur diamètre aux forces de pression hémodynamiques qui s'exercent sur leur paroi.

2-2 Potentiel thérapeutique du FGF

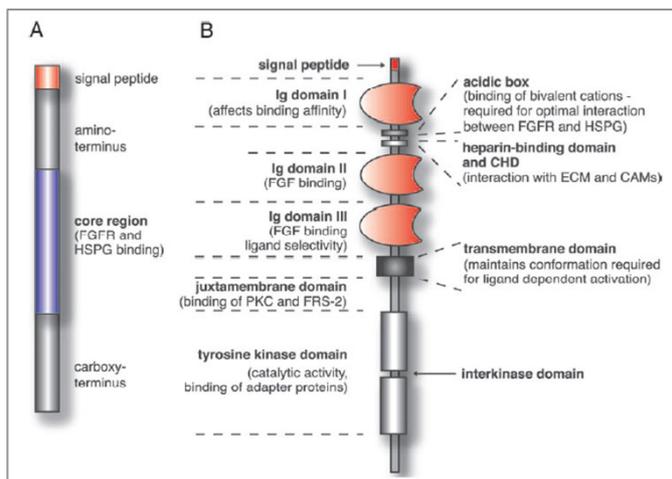
Les facteurs de croissance sont des acteurs majeurs de la néovascularisation, ils régissent de nombreuses étapes de l'angiogénèse et de l'artériogénèse. Certains de ces facteurs, comme le VEGF, sont relativement spécifiques des cellules endothéliales, alors que des facteurs comme le FGF sont également actifs sur les cellules impliquées dans la stabilisation de la structure vasculaire, et notamment les CMLs. Ainsi, l'administration thérapeutique de FGF pourrait permettre de stimuler une croissance vasculaire mûre et fonctionnelle qui garantirait la pérennité de la revascularisation.

2-2-1 Ligands et récepteurs

La large famille des FGFs comprend 23 polypeptides identifiés qui montrent 30 à 70% d'homologie dans leur séquence en acides aminés. Ils sont composés d'une extrémité carboxy-terminale, d'un tronc commun de 140 acides aminés qui contient les domaines de liaison au récepteur et aux HSPGs (heparan sulfate proteoglycans), et d'une extrémité amino-terminale qui porte la séquence signal (Figure 4A). Le FGF-1 (FGF acide) et le FGF-2 (FGF basique) sont les membres les plus impliqués dans les mécanismes de néovascularisation. Le FGF-2 présente une forte affinité pour les HSPGs grâce à deux domaines de liaison à l'héparine. Le complexe FGF-2/HSPGs sert de réservoir pour le FGF-2 qui est libéré lors de la dégradation matricielle associée aux processus de croissance vasculaire. Le complexe FGF-2/HSPGs protège également le FGF-2

de la dégradation enzymatique des altérations structurales provoquées par l'acidification du milieu extracellulaire.

Les FGFs exercent leur activité biologique en reconnaissant leurs récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase : les FGFRs. On dénombre quatre récepteurs aux FGFs : le FGFR-1, le FGFR-2, le FGFR-3 et le FGFR-4. Les FGFRs sont composés de deux ou trois domaines immunoglobuline extracellulaires (IgD I), IgD II et IgD III, éventuellement d'une région acide entre IgD I et IgD II, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase (Figure 4B). Chez l'homme, les FGFRs présentent une importante homologie (60 à 80%) au niveau des domaines IgD II et IgD III contenant le site de liaison aux ligands. Les FGFRs sont codés par des gènes distincts, l'épissage de leur l'ARNm génère des isoformes qui diffèrent de part la nature de leur domaine IgD III : IgD IIIa, IgD IIIb ou IgD IIIc. La portion du gène codant pour le domaine IgD IIIa étant invariante, les différents types de FGFRs se distinguent par l'épissage des portions du gène codant pour les domaines IgD IIIb ou IgD IIIc. Ainsi, on dénombre chez l'Homme les récepteurs FGFR-1b, FGFR-1c, FGFR-2b, FGFR-2c, FGFR-3b, FGFR-3c et FGFR-4c. Les différentes isoformes diffèrent également par leur nombre de domaines IgD extracellulaires. En effet, si le récepteur présente 3 domaines IgD (I, II et III) il est dit de forme α , alors que s'il présente 2 domaines IgD (II et III) le récepteur est considéré comme étant de forme β . Notons que seuls les FGFRs de forme α peuvent être internalisés.



Figures 4 : Structures génériques du FGF (A) et de son récepteur (B). Böttcher *et al.* 2005⁹.

A. La protéine FGF est constituée d'une séquence signal et d'une région centrale contenant les sites de liaison à son récepteur et aux HSPGs.

B. Le récepteur au FGF est constitué de trois domaines IgD extracellulaires, d'une région acide, de domaines de liaison à l'héparine et aux molécules d'adhésion cellulaires, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase.

CAM : cell adhesion molecule, CHD : CAM homology domain, ECM : extracellular matrix, FGF : fibroblast growth factor, FGFR : fibroblast growth factor receptor, FRS2 : fibroblast growth factor receptor substrate 2, HSPG : heparan sulphate proteoglycans, PKC : protein kinase C.

2-2-2 Effets biologiques du système FGF-FGFR

2-2-2-1 Dégradation de la matrice extracellulaire

Les FGFs régulent la déstructuration vasculaire qui initie les processus d'angiogenèse et d'artériogenèse en augmentant la production d'enzymes impliquées dans la dégradation matricielle comme l'uPA (urokinase plasminogen activator) et les MMPs¹⁰. Il module de plus l'expression endothéliale du récepteur à l'uPA, permettant ainsi d'augmenter la protéolyse matricielle et de diriger la pousse vasculaire en orientant la migration des cellules endothéliales.

2-2-2-2 Prolifération et migration des cellules endothéliales

Initialement connu pour exercer une activité mitogène vis-à-vis des fibroblastes et des cellules musculaires lisses, la présence des récepteurs au FGF de type 1 et 4 à la surface des cellules endothéliales dénote de l'implication des FGFs pendant l'angiogenèse. Selon les travaux de l'équipe du docteur Nourse en 2007, l'interaction du FGF-2 avec le FGFR-1 et le FGFR-4 favoriserait la prolifération des cellules endothéliales en culture (HUVECs), alors que leur migration serait préférentiellement dépendante de la reconnaissance du FGFR-4¹¹. Cependant des données internes au laboratoire, sur cellules HUVECs en culture et sur un modèle d'implant sous-cutané chez la souris, montrent que le FGFR-4 serait surtout impliqué dans la formation des tubules endothéliaux et que l'activité proliférative des cellules endothéliales est liée à l'activation du FGFR-1 (non publié). Notons que l'expression du FGFR-1 est décrite pour être augmentée au niveau des CMLs pendant l'artériogenèse pour répondre à la stimulation paracrine des monocytes qui sécrètent localement du FGF¹². Il apparaît de façon intéressante que le FGF stimule la prolifération et la différenciation des types cellulaires nécessaires à la formation de vaisseaux sanguins mûres (cellules endothéliales et musculaires) alors que les facteurs pro-angiogéniques conduisent principalement à la formation de capillaires ou participent exclusivement à la stabilisation des vaisseaux néoformés.

2-2-2-3 Bénéfice anti-apoptotique

Le potentiel pro-angiogénique du FGF n'est pas exclusivement médié par la stimulation de la croissance vasculaire puisqu'il protège aussi les cellules endothéliales de l'apoptose¹³. La prévention de la mort cellulaire associée aux épisodes ischémiques limiterait les dommages tissulaires et augmenterait l'efficacité de la revascularisation.

2-2-2-4 Régulation croisée avec le VEGF

Le FGF stimule la néovascularisation par un effet direct sur les cellules endothéliales, mais aussi en induisant la production de VEGF¹⁴. Décrit comme le plus puissant facteur de croissance des cellules endothéliales, le VEGF est omniprésent dans la régulation de la néovascularisation et apparaît comme essentiel au développement vasculaire¹⁵. La famille du VEGF comprend six membres : le VEGF-A, le VEGF-B, le VEGF-C, le VEGF-D, le VEGF-E et le PlGF. La forme la plus étudiée et la plus impliquée dans la régulation de la néovascularisation est le VEGF-A, auquel on fait souvent référence en parlant du VEGF. Les différences de poids moléculaire du VEGF (32 à 46 kDa) dénotent de la présence de différentes isoformes. Les plus représentées sont le VEGF₁₂₁, le VEGF₁₆₅, le VEGF₁₈₉ et le VEGF₂₀₆. Les effets biologiques attribués au VEGF sont médiés par ses récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase présents à la surface des cellules endothéliales : les VEGFRs (vascular endothelial growth factor receptors). Le VEGFR-1 (Flt-1) et le VEGFR-2 (Flk-1 ou KDR chez l'Homme) sont les deux formes impliquées dans la régulation de la néovascularisation¹⁶.

2-2-3 Voies de signalisations intracellulaires

La fixation du FGF sur son récepteur est favorisée par son interaction avec les HSPGs membranaires. La dimérisation du récepteur induit la phosphorylation des résidus tyrosines intracellulaires qui conditionnent l'activation de voies de transduction du signal : la voie Ras/ERKs pour la prolifération et la différenciation cellulaire, la voie de la phospholipase C pour la morphologie et la migration, et la voie de la PI3K/PKB pour la survie (Figure 5).

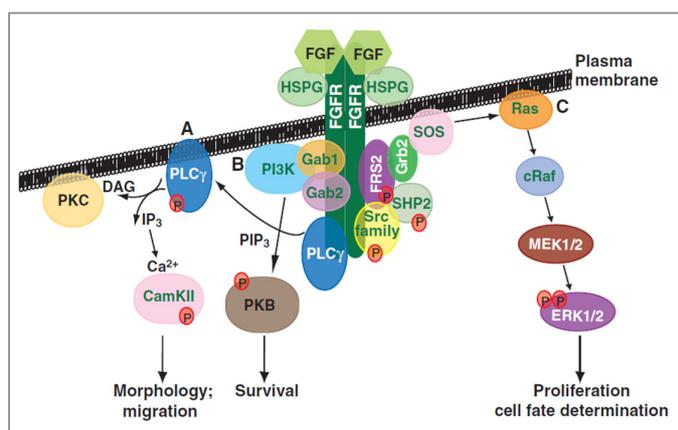


Figure 5 : Voies de signalisations intracellulaires du système FGF/FGFR. Dorey et al.2010¹⁷.

La fixation du FGF sur son récepteur entraîne la phosphorylation en cascade de protéines impliquées dans l'activation des voies de signalisation mitogènes : morphologie et migration via la PKC (A), protection contre l'apoptose via la PI3K/PKB (B), prolifération et différenciation via RAS/ERKs (C).

CamKII : calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, DAG : diacylglycerol, ERK : extracellular-signal related kinase, FGF : fibroblast growth factor, FGFR : fibroblast growth factor receptor, FRS2 : fibroblast growth factor receptor substrate 2, Gab : Grb2-associated protein, Grb2 : growth factor receptor-bound protein 2, HSPG : heparan sulphate proteoglycan, IP3 : inositol (1,4,5)-trisphosphate, MEK : mitogen-activated protein kinase kinase, PI3K : phosphoinositide 3-kinase, PIP3 : phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate, PKB : protein kinase B, PKC : protein kinase C, PLCγ : phospholipase C, cRaf : v-raf-leukemia viral oncogene homologue 1, Ras : rat sarcoma, SHP2 : SH2 domain-containing tyrosine phosphatase 2, SOS : son of sevenless, Src : sarcoma proto-oncogene tyrosine kinase.

Parallèlement à ces voies de régulation, le FGF peut également être importé vers le noyau pour intervenir dans la régulation génique de la cellule. La participation des récepteurs FGFRs est essentielle à l'endocytose du FGF. Néanmoins, l'internalisation du complexe FGF-FGFR reste

indépendante de la phosphorylation du récepteur par son ligand¹⁸, mais elle nécessite tout de même la phosphorylation d'acides aminés du domaine C-terminal cytosolique du récepteur. L'internalisation du FGF, qui implique la protéine chaperonne Hsp90, est ainsi dépendante de l'activité de la PI3K et la p38 MAPK. Une fois dans le cytosol, le FGF migre vers le noyau pour exercer son activité mitogène au niveau de l'ADN. Le FGF est ensuite phosphorylé par la PKC δ nucléaire (protéine kinase qui transite entre le cytosol et le noyau et qui est activée par la stimulation du système FGF). La phosphorylation du FGF provoque son export vers le cytosol où il est déphosphorylé et dégradé.

2-3 Potentiel thérapeutique des EPCs

Les recherches en médecine régénérative prévoient la greffe de cellules souches dans le but de restaurer les fonctions d'un tissu ou d'un organe lorsqu'elles sont altérées par un accident, une pathologie ou le vieillissement. En effet, les capacités d'auto-renouvellement (multiplication à l'identique) et de différenciation (spécialisation en un type cellulaire donné) des cellules souches en font un outil de choix pour tenter de promouvoir la régénération tissulaire. L'origine des cellules souches utilisées pose néanmoins des problèmes d'éthique car leur origine était majoritairement embryonnaire. C'est la raison pour laquelle les cellules souches adultes disséminées sous forme de niches au sein de l'organisme comme la moelle osseuse, le sang, le cordon ombilical ou le tissu adipeux sont de plus en plus étudiées. L'intérêt porté aux cellules souches pendant la néovascularisation a débuté à la fin des années 90, lorsque les docteurs Asahara et Isner ont identifié dans le sang humain des cellules progénitrices endothéliales (EPCs) capables de se différencier en cellules endothéliales, de former des nouveaux capillaires et d'initier la revascularisation sur des modèles animaux d'ischémie¹⁹. Ces progéniteurs circulants qui voient leur nombre augmenter suite à une ischémie aiguë ou dans le cadre de la reperfusion post-ischémique cardiaque chez l'Homme²⁰ sont impliqués dans la néovascularisation via leur recrutement depuis la moelle osseuse vers le site de pousse vasculaire pendant un processus physiologique qui a longtemps été associé à la vie embryonnaire : la vasculogénèse.

2-3-1 La vasculogénèse

La vasculogénèse assure la synthèse *de novo* de nouveaux vaisseaux sanguins via la mobilisation de cellules souches issues de la moelle osseuse. Son initiation est dépendante de l'inflammation et de l'hypoxie²¹. L'augmentation des concentrations circulantes et tissulaires en facteurs de croissances (VEGF, PlGF et FGF-2) induit le recrutement et la migration depuis la

moelle osseuse d'un précurseur cellulaire très précoce, l'angioblaste, qui prolifère et se différencie en EPC. Cette cellule souche est à l'origine des lignées vasculaires (cellules endothéliales et CMLs) et de la lignée hématopoïétique (cellules sanguines).

Les EPCs migrent vers le tissu ischémié ("homing") selon le gradient de facteurs chimio-attractants produits en réponse à l'hypoxie. Leur mobilisation dépendante du VEGF est initiée par l'interaction de ce facteur de croissance avec le VEGFR-1 (vascular endothelial growth factor receptor-1) présent à la surface des EPCs²². En plus des facteurs de croissance cités précédemment, la mobilisation des EPCs est influencée par des facteurs hématopoïétiques comme l'EPO (l'érythropoïétine), le GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), le G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) et SDF-1 (stromal cell-derived factor-1). Ce dernier facteur sécrété par les plaquettes mobilisées sur le site d'ischémie contribue au recrutement des EPCs via son interaction avec leur récepteur membranaire CXCR4²³. Les EPCs adhèrent à la paroi vasculaire par l'intermédiaire de protéines d'adhésion comme la VE-cadhérine et les E et P-sélectines. Elles peuvent participer à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins ou exercer une activité trophique pour les cellules environnantes (Figure 6).

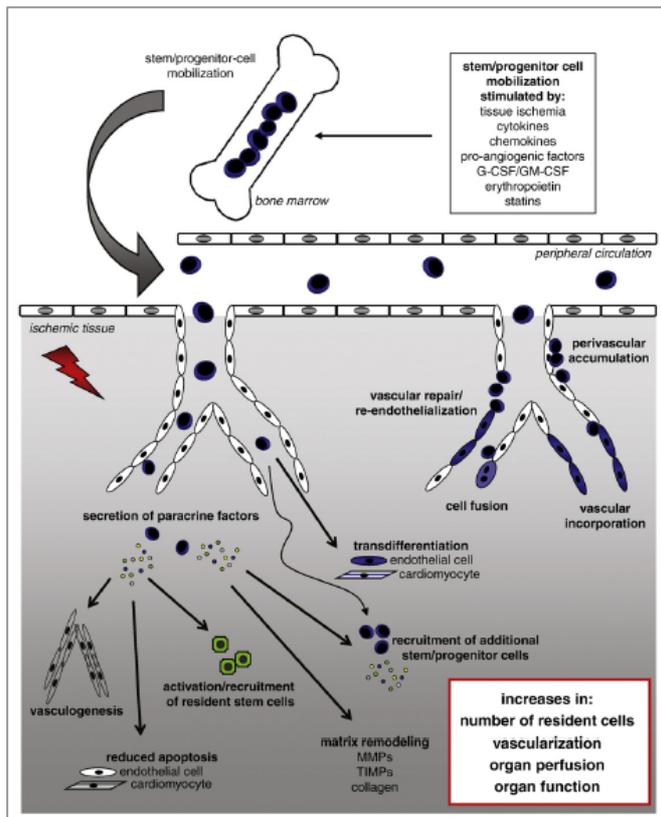


Figure 6 : Implication des EPCs dans la réparation tissulaire post-ischémique. Tongers et al. 2010²⁴.

Les EPCs sont mobilisées depuis la moelle osseuse en réponse à des stimuli physiologiques ou pathologiques tels que l'ischémie. Attirées sur le site de lésion tissulaire, elles sécrètent de multiples facteurs qui entretiennent leur mobilisation et favorisent le développement vasculaire. Les EPCs ont également la capacité d'intégrer à la paroi vasculaire pour en réparer les dommages ou promouvoir la croissance vasculaire. Les EPCs pourraient de plus se transdifférencier en cellules spécifiques du tissu lésé (cardiomyocytes par exemple).

G-CSF : Granulocyte colony-stimulating factor, GM-CSF : Granulocyte macrophage colony-stimulating factor, MMPs : Matrix metalloproteinases, TIMPs : Tissue inhibitor of metalloproteinases.

2-3-2 Caractérisation phénotypique

Comme la plupart des cellules souches adultes, les EPCs sont retrouvées au sein de niches au niveau de la moelle osseuse, du sang périphérique, du sang de cordon, ou encore du tissu adipeux. La signature phénotypique des EPCs n'est pas clairement définie dans la littérature et diverge selon les auteurs. Elles sont classiquement caractérisées par l'expression d'au moins deux marqueurs de cellules souches ou progénitrices hématopoïétiques (CD133, CD117, CD34) et d'un marqueur de cellules endothéliales mûres (VEGFR-2, CD31, Tie-2). L'expression du FGFR-1 à la surface des EPCs exprimant le marqueur de surface CD34 dénote de l'implication du FGF dans la vasculogénèse²⁵. L'isolement à partir de sang humain de deux populations d'EPCs qui diffèrent de part leur phénotype, leur durée de vie, et leur capacité proliférative pourrait expliquer leur dualité d'action (intégration et activité sécrétoire) pendant la vasculogénèse²⁶. On distingue les EPCs dites précoces, qui ont une durée de vie d'environ quatre semaines, possèdent des caractéristiques de cellules inflammatoires : elles participent à la néovascularisation via la sécrétion de facteurs solubles pro-angiogéniques qui entretiennent leur recrutement et inhibent la mort cellulaire, favorisant ainsi la régénération des tissus environnants. Les EPCs tardives, qui elles sont viables jusqu'à douze semaines, expriment des marqueurs caractéristiques des cellules endothéliales. Elles se distinguent des EPCs précoces par leur potentiel de différenciation et d'incorporation aux capillaires néoformés.

L'angiogénèse, la vasculogénèse et l'artériogénèse sont des processus physiologiques distincts qui coopèrent pour promouvoir la synthèse de nouveaux vaisseaux sanguins (Figure 7). La place prépondérante occupée par les facteurs de croissance, et notamment le FGF, pendant les processus de néovascularisation motive les recherches cliniques à les utiliser pour promouvoir la revascularisation des membres inférieurs dans le cadre du traitement de l'AOMI. Une autre approche thérapeutique, axée quant à elle sur la thérapie cellulaire, envisage d'utiliser le potentiel vasculogénique des EPCs. En effet, la capacité de mobilisation des EPCs sur le site d'ischémie permet d'assurer une source de cellules vasculaires (rôle d'intégration) et un moyen de délivrance locale de facteurs de croissances endogènes (rôle sécrétoire). Néanmoins, les régulations croisées de la néovascularisation laissent penser que l'efficacité thérapeutique de ces deux concepts, au demeurant complémentaires, pourrait passer par leur association.

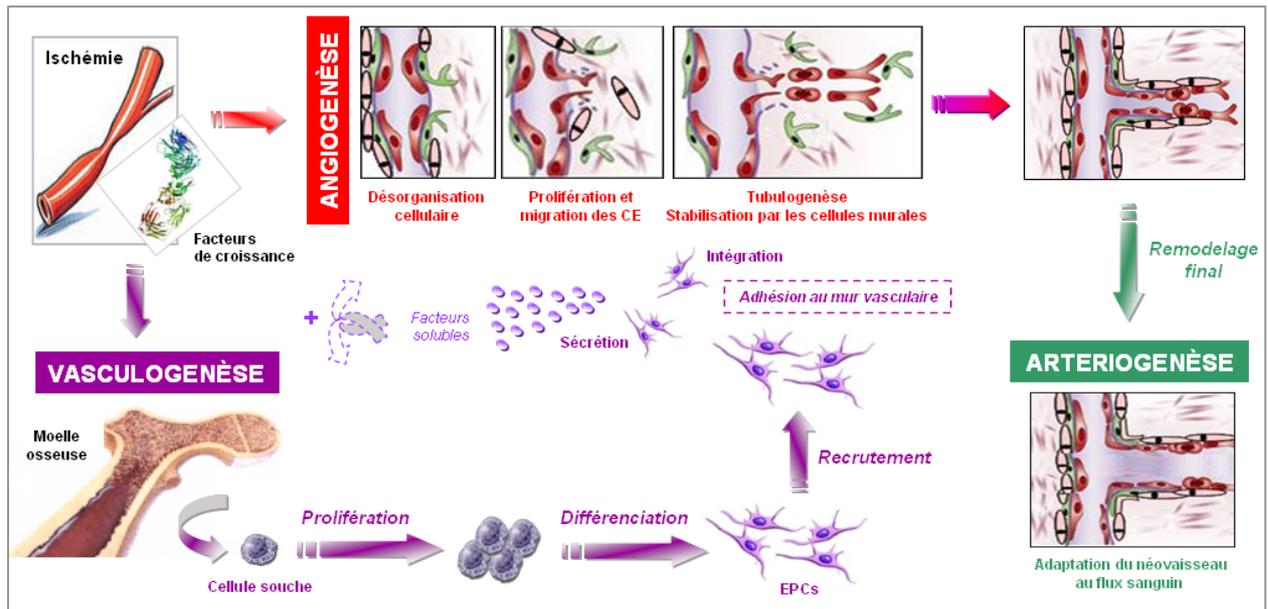


Figure 7 : Processus physiologiques régissant la synthèse de nouveaux vaisseaux sanguins. Origine personnelle.

Face à l'obstruction du système artériel, des mécanismes compensatoires se mettent en place pour assurer la revascularisation des territoires ischémiés. Au cours de l'angiogenèse, les cellules endothéliales et les cellules murales présentes in situ assurent le bourgeonnement du système vasculaire préexistant. Les cellules endothéliales prolifèrent, se différencient et s'organisent sous forme de tubules endothéliaux avant que la nouvelle structure en croissance soit stabilisée par les cellules murales. Parallèlement, la vasculogenèse décrit la synthèse de nouveaux capillaires à partir de cellules souches mobilisées depuis la moelle osseuse. Après leur prolifération et leur différenciation en EPCs, elles adhèrent à la paroi vasculaire pour intégrer le vaisseau natif (en tant que cellules endothéliales matures) ou exercer une activité sécrétoire locale. Enfin, le remodelage final des vaisseaux néoformés est réalisé pendant un processus assimilé à l'artériogenèse, processus au cours duquel le diamètre artériel est adapté au flux sanguin.

EPCs : endothelial progenitor cells.

2-4 Recherches cliniques

Les résultats prometteurs obtenus lors de l'administration de facteurs de croissance et d'EPCs sur des modèles précliniques d'ischémie des membres inférieurs²⁷⁻²⁹ ont motivé leur évaluation au cours d'essais chez des patients atteints d'une AOMI. L'administration locale (simple ou répétée) par voie intramusculaire ou intra-artérielle est préférée à la voie systémique car elle permet de s'affranchir des putatifs effets délétères associés à une thérapie visant à stimuler la néovascularisation.

2-4-1 Facteurs de croissance

Une revue de la littérature résumée dans le tableau 1³⁰⁻⁴³ renseigne sur l'utilisation des facteurs de croissance au cours de protocoles cliniques chez des patients atteints d'une AOMI. La courte demi-vie des facteurs de croissance recombinants a rapidement orienté la recherche clinique vers une délivrance contrôlée grâce la technologie du transfert de gène. Cette approche qui présente une relative spécificité de site permet d'allonger la période d'action des facteurs de croissance et les protège de leur éventuelle dégradation systémique. Le transgène codant pour la

protéine d'intérêt est délivré par l'intermédiaire d'un plasmide ou d'un vecteur viral (virus inactivé). Une fois incorporé dans l'ADN de la cellule hôte, le transgène stimule la production locale et continue de facteurs de croissance. L'administration est soit réalisée grâce à un ballonnet préalablement recouvert qui est canulé au niveau d'une artère, soit par injections intramusculaires multiples.

	Etude	Phase	Pathologie	Effectif	Voie	Durée du suivi	Délivrance	Améliorations (p<0,05)	Physiopathologies renseignées (%)
FGF-2	Lazarous et al.2000 (30)	I	CI	19	ia	24 sem	PR	Perfusion mollet	D (25%), HL (50%), HT(60%)
FGF-1	Comerota et al.2002 (31)	I	Isch C	51	im	24 sem	P	IPS, TcPO2, DR, U	D (40%), HL (50%), HT (60%)
VEGF₁₆₅	Mäkinen et al.2002 (32)	II	Isch C CI	54	ia	12 sem	P AdV	IPS, SA, DR, DMSD, U	D (25%), HL(30%), HT (70%)
FGF-2	Lederman et al.2002 (33)	II	CI	190	ia	12 sem	PR	TMSD	D (30%), HL (75%), HT (75%)
VEGF₁₂₁	Rajagopalan et al.2002 (34)	I	CI	18	im	51 sem	AdV	Aucune	D (30%), HL (55%)
VEGF₁₂₁	Mohler et al.2003 (35)	I	Isch C	15	im	51 sem	AdV	Aucune	D (40%), HL (40%)
VEGF₁₂₁	Rajagopalan et al.2003 (36)	II	CI	105	im	26 sem	AdV	Aucune	D (30%), HL (30%), HT (85%)
VEGF₁₆₅	Shyu et al.2003 (37)	I	Isch C	21	im	26 sem	P	IPS, SA	D (50%)
FGF-4	Matyas et al.2005 (38)	I/II	Isch C	13	im	12 sem	P	Aucune	D (30%), HL (25%), HT (75%)
VEGF₁₆₅	Kusumanto et al.2006 (39)	II	Isch C	54	im	14 sem	P	IPS, U, QV	D (100%), HL(30%), HT (60%)
HGF	Powell et al.2008 (40)	I/II	Isch C	104	im	24 sem	P	Aucune	D (55%)
FGF-1	Nikol et al.2008 (41)	II	Isch C	125	im	25 sem	P	Nombre et degré des amputations	D (45%), HL (50%), HT (70%)
HGF	Morishita et al.2011 (42)	I/II	Isch C	17	im	8 sem	P	IPS, DR, DMSD, U	D (55%), HL (40%), HT (70%)
FGF-1	Belch et al.2011 (43)	III	Isch C	525	im	24 sem	P	Aucune	D (50%), HL (60%), HT (80%)
SDF-1α	Juventas Therapeutics	II	Isch C	48	im	Autorisation de la Food and Drug Administration en 2009, en cours d'investigation			

Tableau 1 : Administration clinique de facteurs de croissance dans le cadre de l'AOMI. Etudes de plus de 10 patients.

AdV : adénovirus, CI : claudications intermittentes, D : diabète, DMSD : distance de marche sans douleur, DR : douleur au repos, FGF : fibroblast growth factor, HGF : hepatocyte growth factor, HL : hyperlipidémie, HT : hypertension artérielle, ia : intra-artérielle, im : intramusculaire, IPS : index de pression systolique, Isch C : ischémie critique, P : plasmide, PR : protéine recombinante, QV : qualité de vie, SA : score angiogénique, SDF-1 α : stromal cell-derived factor-1 α , sem : semaine, TcPO2 : pression transcutanée d'oxygène, TMSD : temps de marche sans douleur, U : ulcérations, VEGF : vascular endothelial growth factor.

L'administration de facteurs de croissance (VEGF, FGF ou HGF) recombinants ou produits *in situ* par transfert de gène a montré sa faisabilité et son innocuité. Néanmoins leurs bénéfices thérapeutiques restent modérés. L'efficacité des facteurs de croissance est difficile à prévoir car elle dépend de la dégradation systémique, du pouvoir infectieux du vecteur, et du contrôle de la production pour éviter la saturation du système. Une étude récemment acceptée par la *Food and Drug Administration* prévoyant l'administration d'un plasmide (JVS-100) qui code pour la chemokine SDF-1 α montre l'intérêt que porte la recherche clinique à promouvoir la

néovascularisation en stimulant le processus de vasculogénèse. Ainsi, la mobilisation d'EPCs sur le site d'ischémie pourrait favoriser la production locale de facteurs de croissances endogènes.

2-4-2 Thérapie cellulaire avec les EPCs

L'administration clinique de cellules souches adultes est réalisée dans un contexte autologue. Les cellules du patient sont prélevées puis réinjectées pour éviter les risques de rejet de greffe. Cependant les quantités d'EPCs circulantes (moins de 0,01%) ou médullaires sont infimes. Leur utilisation thérapeutique nécessite donc des étapes de tri et d'amplification en culture qui sont longues (prolifération *in vivo* limitée), lourdes techniquement, et qui peuvent de plus être la source de modification génique des cellules. Les études cliniques se tournent vers une population cellulaire plus large, les cellules mononuclées (MNCs) exprimant au moins le marqueur de surface CD34 qui reste prédictif du phénotype EPC⁴⁴. Les MNCs issues de la moelle osseuse (BM-MNC) et du sang périphérique (PB-MNC) sont les plus utilisées pendant les essais cliniques (Tableau 2⁴⁵⁻⁵⁸).

	Etude	Phase	Pathologie	Effectif	Voie	Durée du suivi	CD34+/jambe (x10 ⁷ ± SD)	Améliorations (p<0,05)	Physiopathologies renseignées (%)
BM-MNC	Tateishi-Yuyama et al.2002 (45)	I /II	Isch C	47	im	24 sem	3,7 ± 1,8	IPS, TcPO2, SA, DR, TMSD	D (70%), HL (40%), HT (70%)
BM-MNC	Miyamoto et al.2004 (46)	-	Isch C	12	im	4 sem	MNC non triées 400 ± 110	Perfusion mollet, DR, TMSD	D (30%)
BM-MNC	Durdu et al.2006 (47)	-	Isch C	28	im	24 sem	5,3 ± 3,6	IPS, DR, TMSD, QV	D (10%), HT (10%)
BM-MNC	Hernandez et al.2007 (48)	-	Isch C	12	im	24 sem	8,1 ± 6,0	IPS, SO2 veineuse, DMSD	D (75%), HT (65%)
BM-MNC	Bartsch et al.2007 (49)	I	Isch C	25	ia + im	56 sem	8,3 ± 3,4	IPS, SO2 artérielle, DR, TMSD	D (40%), HL (95%), HT (100%)
BM-MNC	Saito et al.2007 (50)	-	Isch C	14	im	24 sem	MNC non triées 420 ± 400	DR	D (20%), HL (30%), HT (7%)
BM-MNC	Huang et al.2007 (51)	-	Isch C	74	im	12 sem	2,7 ± 2,3	IPS, perfusion jambe, TcPO2, DR, DMSD, U, T	D (65%), HL (40%), HT (60%)
BM-MNC	Matoba et al.2008 (52)	II	Isch C	115	im	154 sem	Non renseigné	DR, DMSD, U	D (50%), HL (15%), HT (60%)
BM-MNC	Walter et al.2011 (53)	II	Isch C	40	ia	36 sem	0,9 ± 0,6	DR, U	D (50%), HL (75%), HT (70%)
PB-MNC *	Huang et al.2005 (54)	-	Isch C	28	im	12 sem	1,2 ± 0,1	IPS, perfusion jambe, SA, DR, DMSD, U, Protection amputation	D (100%)
PB-MNC *	Yang et al.2006 (55)	-	Isch C	152	im	12 sem	5,3 ± 0,8	DR, T	D (60%), HL (95%), HT (80%)
PB-MNC *	Kawamura et al.2006 (56)	-	Isch C	92	im	6 sem	4,2 ± 3,5	Aucune	D (70%)
PB-MNC	Tateno et al.2006 (57)	-	Isch C	29	im	52 sem	0,3 ± 0,1	DR, DMSD	D (55%), HL (55%), HT (45%)
PB-MNC *	Huang et al.2007 (51)	-	Isch C	76	im	12 sem	23,0 ± 14,8	IPS, perfusion jambe, TcPO2 DR, DMSD, U, T	D (65%), HL (40%), HT (65%)
PB-MNC *	Kawamoto et al.2009 (58)	I /II	Isch C	17	im	12 sem	0,01 / 0,05 / 0,1 par kg	IPS orteil, TcPO2, DM, DR, DMSD, U	D (35%), HL (10%), HT (30%)

Tableau 2 : Administration clinique de BM-MNC et de PB-MNC dans le cadre de l'AOMI. Etudes de plus de 10 patients. BM-MNC : bone marrow mononuclear cells, D : diabète, DM : distance de marche, DMSD : distance de marche sans douleur, DR : douleur au repos, HL : hyperlipidémie, HT : hypertension artérielle, ia : intra-artérielle, im : intramusculaire, IPS : index de pression systolique, Isch C : ischémie critique, PB-MNC : peripheral blood mononuclear cells, QV : qualité de vie, SA : score angiogénique, sem : semaine, SO₂ : saturation en oxygène, T : thermographie, TcPO₂ : pression transcutanée d'oxygène, TMSD : temps de marche sans douleur, U : ulcérations. (* : Recrutement périphérique stimulé par pré-traitement des patients avec du G-CSF).

Les MNCs CD34⁺ sont cependant moins représentées dans le sang que dans la moelle osseuse⁴⁴, ainsi pour augmenter le rendement de prélèvement des PB-MNC l'utilisation clinique de ces dernières est le plus souvent associée à un pré-traitement des patients avec un facteur chimoattractant comme le G-CSF qui favorise leur mobilisation depuis la moelle dans le sang. Les résultats des études cliniques utilisant les cellules mononuclées CD34⁺ circulantes ou médullaires mettent en avant la faisabilité et l'innocuité de cette approche. Chez certains patients l'amélioration du degré des nécroses et des ulcérations est remarquable, mais l'efficacité thérapeutique reste cependant hétérogène selon les individus. L'utilisation des MNCs doit tenir compte du nombre de cellules administrées, de leur phénotype, ou encore à leur technique de séparation par rapport à la population sanguine (automates de séparation ou gradient de densité).

Les effets encourageants observés lors de l'utilisation des facteurs de croissance et des EPCs sont néanmoins pondérés par leur manque de reproductibilité en termes d'efficacité thérapeutique. Hormis les variations expérimentales dues à la nature de l'approche thérapeutique, il semble important de prendre en compte la divergence des paramètres inhérents aux essais cliniques :

- critères de récupération pris en compte et durée du suivi clinique.
- constitution des groupes expérimentaux déséquilibrés : peu de patients sont inclus dans les groupes contrôles, grades d'ischémie variables selon les études et au sein des mêmes études.
- enrôlement de patients ayant des profils physiopathologiques et des antécédents médicaux différents. Malgré généralement l'arrêt des traitements médicamenteux pendant les phases d'étude clinique, les réponses biologiques chez les patients traités pour des physiopathologies associées (diabète, dyslipidémie, hypertension) peuvent être influencées par la nature du traitement. Par exemple, les statines prescrites pour corriger l'hypercholestérolémie sont décrites pour augmenter l'angiogenèse et les capacités vasculogéniques des EPCs^{59,60}.
- faible nombre de patients enrôlés : les candidats sont peu nombreux car les études thérapeutiques concernent en priorité les patients à des stades ultimes de la maladie. De plus, les critères d'exclusion sont sévères à cause des effets délétères que pourraient engendrer une thérapie visant à stimuler la néovascularisation. En effet, tout comme dans le cas de l'administration de facteurs de croissance, l'utilisation de la thérapie cellulaire pourrait être susceptible de favoriser le développement de tumeurs latentes ou d'aggraver des pathologies caractérisées par une vascularisation excessive comme la rétinopathie diabétique et la dégénérescence maculaire. Cependant, aucune étude ne reporte à ce jour de tels effets adverses.

Des études à plus grande échelle doivent être envisagées pour valider la reproductibilité et la stabilité dans le temps des améliorations cliniques observées chez les patients souffrant d'AOMI. Comme on pouvait l'attendre, l'évaluation distincte de l'administration de facteurs de croissance et de la thérapie cellulaire utilisant les EPCs montre un bénéfice thérapeutique modéré. Ainsi, les futurs essais cliniques pourraient faire l'objet de l'optimisation des stratégies déjà envisagées : co-administrations de facteurs de croissance et d'EPCs ou prétraitement des EPCs pour augmenter leur potentiel vasculogénique.

3- Modèles expérimentaux d'AOMI

Les modèles d'AOMI sont documentés chez de nombreuses espèces : porc, chien, lapin, hamster, rat ou souris. Ils sont considérés comme des modèles précliniques de référence pour étudier la pathologie ischémique des membres inférieurs. L'ischémie du membre inférieur est pratiquée par obstruction d'une artère principale et/ou de son réseau collatéral. Les animaux de grande taille permettent une bonne identification du réseau artériel et de ses vaisseaux collatéraux. Les sites de mesure de la reperfusion post-ischémique sont plus variés et plus facilement accessibles. La vascularisation naturelle des différentes espèces conditionne le choix de l'espèce d'étude. Le nombre de vaisseaux collatéraux à isoler pour induire l'ischémie chez le chien ou le rat rend plus difficile la mise en place d'un modèle d'AOMI. La densité et la localisation anatomique du réseau collatéral chez le lapin, le cochon et la souris ressemble à celui de l'Homme. Un modèle d'AOMI développé chez ces espèces semble ainsi plus prédictif de la pathologie humaine. La mise au point de modèles d'AOMI chez la souris bénéficie de plus de l'apport de la transgénèse et d'outils génétiques novateurs qui sont un soutien de choix pour l'étude des régulations des processus de néovascularisation et la génération de souches relevant de la physiopathologie humaine. De plus, le phénotype immunodéprimé de certaines souches autorise la réalisation d'approches de thérapie cellulaires qui prévoient la greffe de cellules humaines. L'utilisation de la souris pour développer un modèle d'AOMI permet la transposition de critères de récupération mesurés chez l'Homme. En effet, les progrès réalisés par les technologies d'imagerie chez le petit animal permettent de renseigner sur des paramètres fonctionnels (imagerie Doppler, imagerie RX) qui sont évalués au cours des essais cliniques.

3-1 Sélection de la souche murine

L'évaluation du bénéfice de la stimulation de la néovascularisation par administration de facteurs pro-angiogéniques est évaluée chez des souris au phénotype sauvage (Balb/c, C57Bl6, FVB, OF1...) ou présentant un retard de reperfusion post-ischémique attribué à des processus de

néovascularisation déficients : hypercholestérolémie⁶¹, diabète²⁸ ou vieillissement⁶². Parmi les modèles physiopathologiques les plus utilisés on trouve les souris ApoE^{-/-} ou LDLR^{-/-} (dyslipidémie) et les souris db/db ou ob/ob (diabète de type II). Les dérégulations métaboliques peuvent également être induites par une alimentation modifiée riche en lipides (dyslipidémie et/ou diabète de type II) ou par l'injection de streptozotocine (diabète de type I). Notons que le sexe des animaux influence également la reperfusion post-ischémique, en effet, chez la souris C57Bl6, les femelles présentent un retard de revascularisation⁶³.

3-2 Induction chirurgicale de l'ischémie

Initialement décrite chez les animaux de grande taille, la diminution du flux sanguin chez les modèles d'AOMI était réalisée par la "technique du tourniquet" (principe du garrot). Mais les effets adverses vis-à-vis des muscles et des nerfs ont orienté les expérimentateurs vers l'utilisation de la chirurgie pour induire une ischémie spécifique du territoire vasculaire. La patte inférieure de la souris est isolée du reste de la circulation sanguine par l'interruption du flux sanguin au niveau de l'artère fémorale superficielle. L'induction chirurgicale de l'ischémie est rapide et peu invasive (intégrité des fibres musculaires et du nerf fémoral) pour limiter les conséquences inflammatoires et préserver la capacité motrice de la patte. Les modèles murins d'AOMI mettent en œuvre une ischémie unilatérale car les modèles d'ischémie bilatérale sont considérés comme trop sévères et montrent une importante mortalité des animaux. Selon les modèles l'induction de l'ischémie diffère de part la nature et la localisation anatomique de l'obstruction⁶⁴.

L'interruption du flux sanguin fémoral peut être réalisée par électrocoagulation ou ligature de l'artère : région des iliaques, juste après le ligament inguinal, ou au niveau de la bifurcation des artères saphène et poplitée (Figure 8). La technique chirurgicale qui reste la plus décrite pour limiter le nombre de vaisseaux collatéraux fonctionnels consiste à isoler l'artère fémorale de la circulation systémique en retirant une portion de l'artère entre le ligament inguinal et la bifurcation des artères saphène et poplitée après avoir cautérisé l'ensemble du réseau collatéral se trouvant entre les deux extrémités de la zone excisée⁶⁵. Notons que certains protocoles prévoient de s'affranchir du retour veineux en ligaturant ou en excisant à la fois l'artère et la veine fémorale.

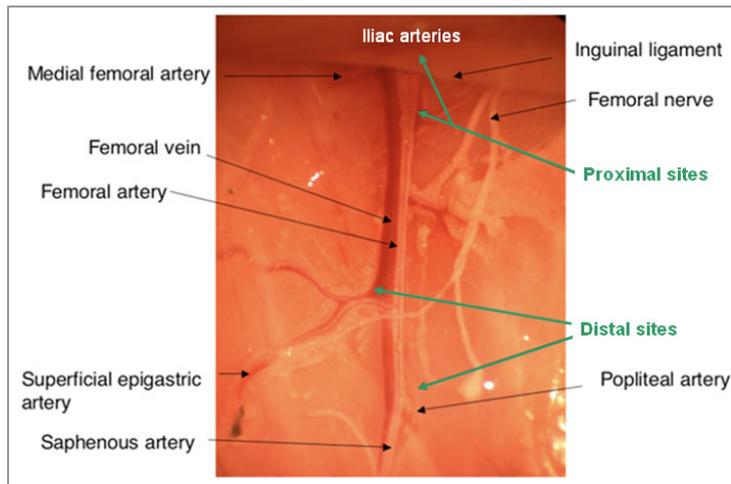


Figure 8 : Organisation du réseau vasculaire de la face interne de la cuisse chez la souris. Vascularisation superficielle. Modifié de Cooke et al.2009⁶⁶.

3-3 Critères d'évaluation de la régénération vasculaire post-ischémique

3-3-1 Symptômes physiques

L'état général de la patte est estimé par la détermination de la prévalence des ulcérations et des nécroses consécutives à l'ischémie. Les lésions sont quantifiées et hiérarchisées (score de nécrose) selon leur sévérité et leur localisation anatomique : ongles, doigts, pied, patte. Le stade ultime de cet index est l'auto-amputation de la patte. Pour respecter le code sur l'éthique de l'expérimentation animale il est important de mettre en œuvre un modèle d'AOMI présentant des scores de nécroses modérés. La récupération des capacités motrices est évaluée par la mesure de la distance de marche ou par la détermination de la surface d'appui au sol. La récupération sensorielle est quant à elle mesurée en contrôlant le réflexe inné face à la chaleur ou à la piqûre.

3-3-2 Estimation de la néovascularisation

3-3-3-1 Suivi de la reperfusion de la patte ischémisée

Le suivi post-ischémique est réalisé par imagerie Doppler en mesurant le flux sanguin au niveau du pied, de la patte entière, ou d'un muscle d'intérêt (cuisse ou mollet). L'induction unilatérale de l'ischémie permet d'exprimer les résultats sous forme d'un ratio de perfusion entre la patte ischémisée et la patte contrôle (ratio I/C) qui permet de s'affranchir des variations environnementales pendant la mesure (température ambiante, luminosité) et interindividuelles (l'animal est son propre contrôle). La durée du suivi dans le temps et la stabilité du flux mesuré renseignent sur la pérennité de la néovascularisation. Lors de l'excision de l'artère fémorale chez la souris C57Bl6, la reperfusion de la patte atteint un plateau 28 jours post-ischémie et reste stable au moins jusqu'au 35^{ème} jour⁶⁵.

3-3-3-2 Immunohistochimie

L'augmentation de la taille et de la densité des artères est un critère majeur de néovascularisation associée à la reperfusion post-ischémique. Les cellules endothéliales sont quantifiées par immunohistochimie (IHC) ou hybridation *in situ* (ISH) sur coupes histologiques de muscle grâce au marquage de protéines de surface spécifiques comme CD31 par exemple⁶⁵. Les co-marquages avec des protéines impliquées dans la stabilisation des vaisseaux telles que l' α -SMA (α -smooth muscle actin) ou le récepteur Tie-2 permettent de renseigner sur la maturation et la pérennité de la nouvelle structure⁶⁷. La quantification doit cependant tenir compte de l'atrophie musculaire consécutive à l'ischémie, les résultats sont donc exprimés par unité de surface ou par nombre de fibres musculaires. Les techniques d'IHC et d'ISH permettent également d'apprécier les régulations de protéines impliquées dans la régulation de la néovascularisation comme les facteurs de croissance et leurs récepteurs ou des marqueurs d'hypoxie musculaire comme le facteur de transcription HIF-1 α .

3-3-3-3 Imagerie du petit animal

L'utilisation des techniques d'imagerie par rayons X comme la tomographie 3D⁶⁸ ou l'angiographie renseigne sur la fonctionnalité de la néovascularisation. L'agent de contraste radio-opaque préalablement injecté qui ne diffuse que dans les zones irriguées permet de visualiser les zones et les caractéristiques de la néovascularisation (Figure 9). L'analyse prend en considération le nombre et le diamètre des vaisseaux, le nombre de connectivités ou encore l'espace inter-vaisseaux. Les conditions de détection sont optimisées pour visualiser le maximum d'informations sur le réseau artériel et particulièrement les vaisseaux de petite taille : administration systémique d'antiagrégants plaquettaires / anticoagulants / vasodilatateur, fixation de la structure vasculaire, nature et densité de l'agent de contraste, injection continue à pression physiologique. Notons que la proximité de l'injection de l'agent de contraste par rapport à la zone d'analyse garantit une meilleure qualité d'image qui facilite la quantification.

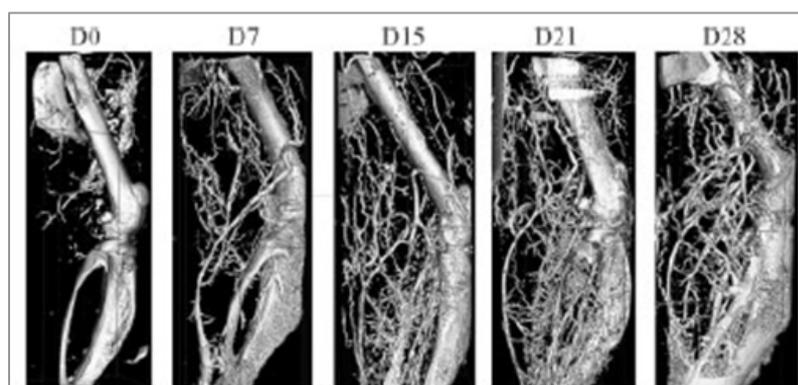


Figure 9 : Suivi par tomographie 3D de la néovascularisation post-ischémique chez la souris. Oses *et al.* 2009⁶⁸.

Souris C57Bl6, 10-12 semaines. L'ischémie est induite par l'excision d'une portion de l'artère fémorale.

DO : jour d'induction de l'ischémie / D7, D15, D21, D28 : 7, 15, 21 et 28 jours post-ischémie.

3-3-3-4 Marqueurs de la néovascularisation

La détermination des concentrations tissulaires et circulantes des acteurs biologiques impliqués dans la régulation du développement vasculaire (facteurs de croissances, cytokines...) renseigne sur la régénération vasculaire. Les taux de protéines et/ou d'ARNm tissulaires sont mesurées sur des homogénats de muscle grâce à des techniques comme le "western blotting" ou la PCR (polymerase chain reaction). Les acteurs cellulaires circulants (sang périphérique) de la néovascularisation, comme les EPCs, sont identifiés et quantifiés par cytométrie en flux par la détection de marqueurs protéiques de surface spécifiques, ou après mise en culture via leur capacité à incorporer le LDL acétylé et à fixer sur leur membrane plasmique l'isolectine⁶⁹.

Les différentes techniques chirurgicales d'induction de l'ischémie et l'influence croisée de l'âge, du sexe, du fond génétique et du profil physiopathologique des animaux compliquent l'interprétation des données bibliographiques et la comparaison des différents modèles d'AOMI. Néanmoins cette diversité expérimentale autorise la mise en place de modèles optimisés par rapport aux objectifs thérapeutiques envisagés.

4- Projet de recherche

L'objectif de ce stage de recherche a été la mise en place d'un modèle murin d'AOMI en vue d'évaluer le bénéfice thérapeutique de la stimulation des processus de néovascularisation vis-à-vis de la régénération vasculaire et musculaire de la patte ischémisée. Une première approche a consisté en l'activation du système FGF par un agoniste de synthèse : le SAR X. La deuxième approche (thérapie cellulaire) s'est focalisée sur l'administration d'EPCs pour stimuler le processus de vasculogenèse via leur capacité à être mobilisées sur le site d'ischémie pour intégrer la structure vasculaire en croissance et pour augmenter la synthèse locale de facteurs de croissance endogènes. Ces deux concepts thérapeutiques sont évalués dans un premier temps de façon indépendante avant d'envisager plus tard leur association.

Partie 1 : Mise en place d'un modèle d'AOMI chez la souris nude.

L'approche en thérapie cellulaire que nous voulons évaluer prévoit l'utilisation d'EPCs d'origine humaine. Ainsi, nous avons mis en place notre modèle d'AOMI chez une souche immunodéprimée pour éviter le rejet des cellules. Nous avons donc choisi d'utiliser des souris nude. Une étude préliminaire nous a tout d'abord permis de comparer deux fonds génétiques courant pour cette souche (C57Bl6 et Balb/c) avec l'objectif de sélectionner les souris qui présentent le retard de reperfusion le plus important tout en ayant une incidence et une sévérité

des nécroses de la patte éthiquement acceptables. Nous avons caractérisé par la suite notre modèle d'AOMI chez la souche nude retenue en focalisant notre étude sur des temps précoces pour cerner au mieux les régulations consécutives à l'ischémie. Outre la survie de la patte ischémiée et la reperfusion distale, nous avons suivi les modifications environnementales associées à l'ischémie telles que l'inflammation et régénération musculaire. En complément, la fonctionnalité des nouveaux vaisseaux sanguins a été vérifiée au niveau des muscles de la cuisse et du mollet. Enfin, nous avons mis en évidence la participation du processus de vasculogénèse pendant la régénération vasculaire chez la souris. Pour cette dernière perspective, en plus des souris Balb/c nude, nous avons utilisé des souris NOD/SCID/IL2R $\gamma^{-/-}$ (NSG) qui possèdent une moelle osseuse constituée de cellules souches hématopoïétiques d'origine humaine : les souris NSG humanisées (NSGh) (Annexe 1⁷⁰).

Partie 2 : Evaluation du bénéfice thérapeutique de la stimulation de la voie FGF.

Afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de l'administration d'un agoniste des récepteurs au FGF sur notre modèle murin d'AOMI nous avons exploré l'efficacité d'une molécule issue de la synthèse chimique Sanofi-Aventis : le SAR X (Annexe 2). Cet analogue du FGF présente une forte affinité pour le FGFR-4 et une faible reconnaissance du FGFR-1. Pour se rapprocher des conditions d'évaluation cliniques nous avons administré le SAR X par voie intramusculaire. Une étude préliminaire de pharmacocinétique nous a renseignés sur la distribution et la durée de vie du produit *in vivo* pour nous permettre d'établir un schéma de traitement optimisé.

Partie 3 : Evaluation du bénéfice thérapeutique de la greffe d'EPCs.

Nous avons cherché au travers de cette étude à mettre en évidence la faisabilité et le bénéfice de l'administration d'EPCs vis-à-vis de la récupération post-ischémique de notre modèle d'AOMI. L'utilisation des EPCs présente un objectif double : vérifier leur incorporation sur le site de croissance vasculaire et profiter de leur capacité sécrétoire pour exercer une activité trophique pour les cellules environnantes. Nous avons choisi d'utiliser des EPCs commerciales d'origine humaine car la faible quantité des EPCs murines que nous pourrions prélever chez l'animal nécessiterait des étapes d'amplification en culture longues et source de dérive phénotypiques. De plus, la détection spécifique des cellules humaines par hybridation *in situ* nous permet de localiser avec précision les EPCs dans les tissus murins.

Matériels et Méthodes

1- Animaux

1-1 Hébergement et manipulation

Les souris C57Bl/6J (C57Bl6), Balb/cByj (Balb/c), Balb/cJ-nude (Balb/c nude) et NOD/SCID/IL2R $\gamma^{-/-}$ (NSG) utilisées pour nos expérimentations sont des souris mâles fournies par l'élevage *Charles River Laboratories*. Les souris NSG humanisées (NSGh) sont produites en collaboration avec la société *Oncodesign*. Les animaux sont hébergés dans une animalerie conventionnée avec libre accès à l'eau de boisson et à la nourriture avec des cycles 12h jour/12h nuit (7h00 - 19h00). Les souris C57Bl6 et Balb/c sont hébergées et manipulées en zone SPF (specific pathogen free) respectant la liste d'exclusion des agents pathogènes recommandée par la FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) (Annexe 3). Les souris Balb/c nude et NSG, qui sont des souches immunodéprimées, demandent des conditions sanitaires plus strictes. Ainsi, l'acclimatation, l'hébergement et les expérimentations sont réalisées dans une zone à accès limité qui présente un niveau de confinement plus important (combinaison dédiée, port de masque, de charlotte, de gants et de sur-chaussures). L'aliment, l'eau de boisson, la litière sont irradiés. La température est comprise entre 20 et 24°C pour une hygrométrie de 55%. L'air des hébergements est renouvelé en raison de 18 cycles par heure.

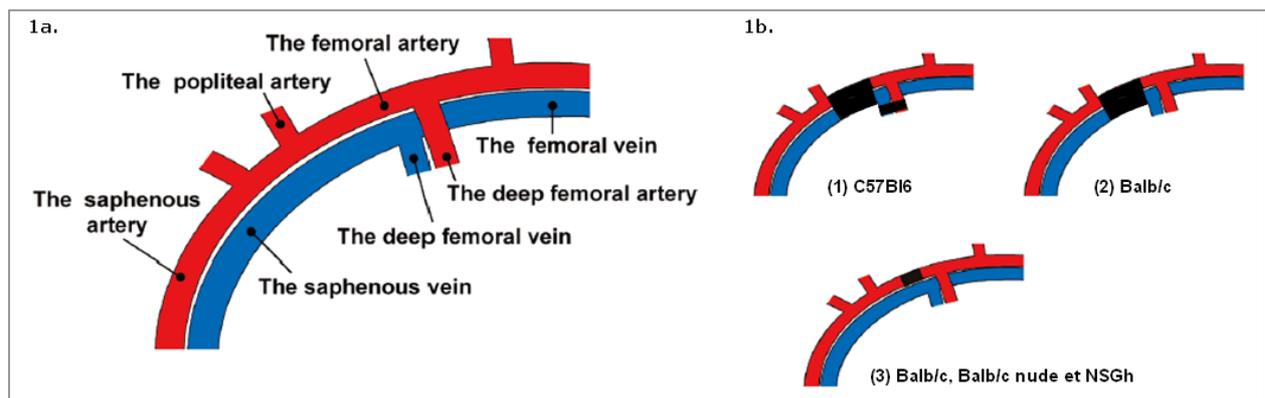
Lors de leur manipulation, les souris sont anesthésiées par injection intra-péritonéale (10 mL/kg) de 100 mg/kg de kétamine (Imalgène® 1000, *Merial*) et de 20 mg/kg de xylazine (Rompun® 2%, *Bayer Health Care*). En fin d'étude, les souris sont sacrifiées sous anesthésie par dislocation cervicale pour le prélèvement des tissus d'intérêt.

1-2- Induction chirurgicale de l'ischémie

Comme tous les protocoles expérimentaux mis en place chez Sanofi, le protocole d'AOMI développé chez la souris a été évalué par un comité interne d'éthique expérimentale qui respecte la recommandation européenne en vigueur : le CEPAL (Comité d'Ethique Pour les Animaux de Laboratoire). Une incision est pratiquée au niveau du pli inguinal de la patte gauche. Le tissu adipeux sous-cutané et la séreuse sont délicatement dissociés pour rendre accessible le réseau artériel superficiel de la face interne de la cuisse.

Excision de l'artère et de la veine fémorale. Cette chirurgie concerne les souris C57Bl6 et Balb/c. L'artère et la veine fémorale sont ligaturées juste après l'artère circonflexe profonde, au niveau du ligament, avec une soie tressée stérile 6/0 non résorbable (*Peters Surgical, ref 25001*). Une seconde ligature est posée au niveau de l'artère et de la veine fémorale juste avant la bifurcation des artères saphène et poplitée. La portion artère-veine isolée du reste de la circulation sanguine est délicatement dissociée du nerf fémoral. L'ensemble des vaisseaux collatéraux situés entre les deux ligatures sont cautérisés avant que la portion d'intérêt soit excisée. Pour les souris C57Bl6, la chirurgie est complétée par la ligature de l'artère et de la veine circonflexe profonde (Figures 1a et 1b).

Ligature de l'artère fémorale. Cette chirurgie concerne les souris Balb/c, Balb/c nude et NSGh. L'artère fémorale dissociée de la veine fémorale au niveau du ligament inguinal. Elle est ensuite ligaturée juste après sa bifurcation avec l'artère circonflexe profonde (Figures 1a et 1b).



Figures 1 : a- Illustration schématique du réseau fémoral superficiel de la souris. Artère et veine fémorale avec leurs principaux vaisseaux collatéraux. b- Procédures chirurgicales d'induction de l'ischémie. Techniques utilisées pour la mise en place de nos modèles d'AOMI chez les souris C57Bl6, Balb/c, Balb/c nude et NSGh. *Modifié de Goto et al.2006*⁶⁴.

La zone opératoire est immergée de sérum physiologique avant de refermer la plaie avec deux agrafes chirurgicales (EZ clips, *Phymep, ref 59027*). La récupération postopératoire est optimisée en plaçant les souris dans une armoire de réveil thermostatée (24°C).

2- Elaboration du projet de recherche

2-1 Mise en place d'un modèle d'AOMI chez la souris nude

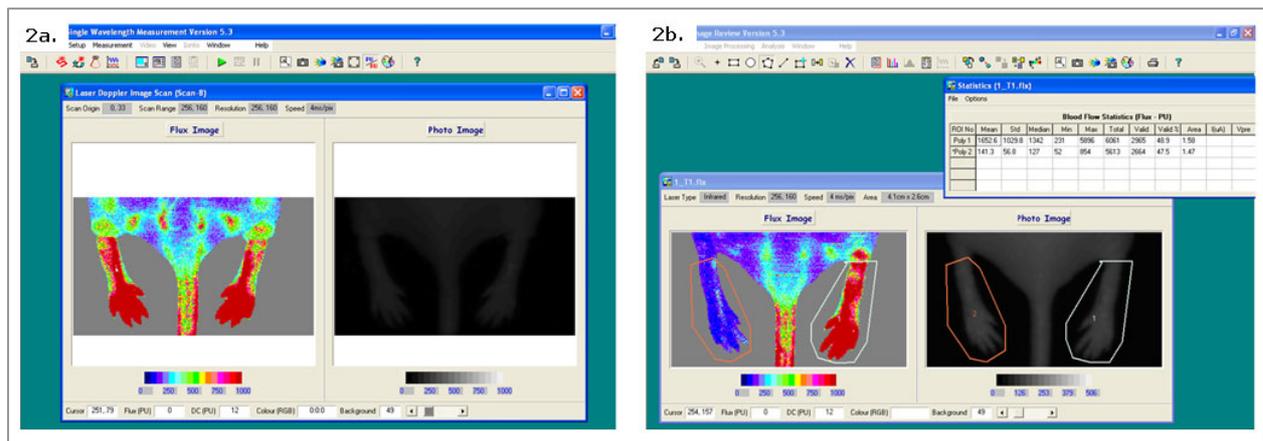
2-1-1 Protocoles expérimentaux

Sélection du fond génétique. Nous avons suivi la régénération post-ischémique pendant les 14 jours qui font suite à l'interruption du flux sanguin fémoral chez des souris C57Bl6 et Balb/c mâles de 11 semaines. L'ischémie est provoquée par l'excision d'une portion de l'artère et de la veine fémorale (C57Bl6 et Balb/c) ou par la simple ligature de l'artère fémorale (Balb/c).

Modèle d'AOMI développé chez la souris Balb/c nude. L'ischémie est induite par simple ligature de l'artère fémorale chez des souris Balb/c nude mâle de 10 à 11 semaines. Nous avons suivi la régénération post-ischémique après 1, 3, 5, 7 et 14 jours post-opération. Le protocole intègre des souris non opérées comme contrôle et des groupes sham équivalents aux temps J1 et J3. Seuls ces deux groupes sham ont été effectués à cause de la charge de travail qu'aurait demandé la réalisation de sham équivalents à l'ensemble des temps de la cinétique.

2-1-2 Suivi de la reperfusion post-ischémique par imagerie Doppler

La perfusion est mesurée avec un laser Doppler MoorLDI2-HR™ (*Moor Instruments*). Cet appareil possède un laser infrarouge de 830 nm qui autorise une bonne pénétration des tissus. Les mesures sont réalisées sur des souris anesthésiées et maintenues à 37°C. Les données sont stockées grâce au logiciel *MoorLDI software Single wavelenght measurement V5.3* sous la forme d'une photo en niveaux de gris et d'une cartographie infrarouge : les couleurs froides (bleu, violet) représentent les zones où le flux sanguin est faible, alors que les couleurs chaudes (orange, rose, rouge) dénotent d'un flux sanguin plus important (Figure 2a). La quantification du flux sanguin distal (pied) de la patte controlatérale et de la patte ischémisée est réalisée avec le logiciel d'analyse *MoorLDI software Image Review V5.3* (Figure 2b). Les quantifications obtenues en unité arbitraire de flux sont exprimées sous forme d'un ratio de perfusion I/C (rapport de perfusion entre la patte ischémisée et la patte controlatérale), puis transformées en pourcentage de perfusion (100 % étant équivalent à un ratio de perfusion I/C = 1). Une mesure est réalisée avant l'induction de l'ischémie pour vérifier l'homogénéité de perfusion entre les pattes. Une deuxième mesure est faite juste après l'opération pour valider l'acte chirurgical. La perfusion est ensuite suivie pour évaluer la récupération du flux sanguin distal au cours du temps.



Figures 2 : Laser Doppler MoorLDI2-HR™. a- Logiciel d'acquisition des données. MoorLDI software Single wavelength measurement V5.3. La tête de lecture du Doppler est placée à 15 cm de la souris, la zone d'acquisition (4,1 x 2,6 cm) est scannée avec une résolution de 256 x 256 pixels et une vitesse de balayage de 4 ms/pixel. b- Logiciel de quantification. MoorLDI software Image Review V5.3.

Patte controlatérale (1) et patte ischémique (2).

2-1-3 Estimation de la survie de la patte ischémique

Les lésions nécrotiques sont appréciées visuellement et hiérarchisées en fonction de leur sévérité selon un index de nécrose : aucune nécrose (grade 0), nécrose de un ou de plusieurs ongles (grade 1), nécrose de un ou de plusieurs doigts (grade 2), un ou plusieurs doigts nécrosés et gonflés (grade 3), auto-amputation de un ou de plusieurs doigts (grade 4), nécrose du pied (grade 5), et enfin auto-amputation du pied (grade 6). Les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes représentant les pourcentages cumulés de chaque grade.

2-1-4 Dosages plasmatiques et musculaires

Le sang est prélevé au niveau de la veine abdominale sur EDTA 50 mM (8% volume, Sigma-Aldrich, ref E7889), puis centrifugé à température ambiante pendant 10 minutes à 2000 g. Le plasma obtenu est aliquoté et conservé à -80°C. Les muscles du mollet et les muscles postérieurs de la cuisse sont prélevés et pesés. Les dosages ne sont pas réalisés sur les muscles du mollet qui sont dédiés aux études histologiques. La moitié des muscles de la cuisse est dilacérée dans 500 µL de tampon RIPA contenant des anti-phosphatases (*Cell Signaling*, ref 9806), et auquel nous rajoutons un cocktail d'anti-protéases (0,33% volume, Sigma-Aldrich, ref P8340). Le tissu est broyé dans des tubes contenant des billes de céramique (*MP Biomedicals*, ref 6913-500) grâce à 3 passages successifs dans un agitateur mécanique pendant 20 secondes avec une vitesse d'agitation de 6 mètres/seconde (Fastprep®-24, *MP Biomedicals*). Une phase de refroidissement dans la glace est respectée entre chaque cycle pour éviter la dénaturation des protéines. Les broyats de muscle sont centrifugés à 4°C pendant 10 minutes à 5000 g. La phase soluble est prélevée, aliquotée et congelée à -80°C.

Les dosages plasmatiques et musculaires sont réalisés grâce à des kits commerciaux : CBA kit (*Pierce, ref 23225*), CD105 Duoset ELISA kit (*R&D System, DY1097*), Mouse CCL2/JE/MCP-1 Quantikine ELISA Kit (*R&D System, ref MJE00*), Lactate Assay kit II (*Biovision, ref K627-100*). La détermination des quantités de F4-80 musculaires est réalisée à partir d'un système ELISA développé et validé au sein du service.

2-1-5 Histologie

Les muscles de la cuisse et du mollet sont fixés à 4°C pendant 24 heures dans un fixateur sans formol (Accustain®, *Sigma-Aldrich, ref A5472*). Les fémurs des souris NSG et NSGh sont quant à eux fixés dans l'Accustain® pendant 48 heures, puis décalcifiés pendant 3h30 (DC3, *Labonord, ref 091-28300*) avant d'être fixés à nouveau pendant 48 heures dans l'Accustain®. Ces incubations sont réalisées à 4°C. Après fixation, les différents tissus sont paraffinés (Annexe 4) et conservés à température ambiante. Les études histologiques (IHC, ISH et colorations structurales) sont faites sur des sections de tissu de 5 µm. En fin de protocole, les coupes de tissu sont déshydratées (Annexe 4) en vue d'un montage définitif avec l'automate Tissue-Tek Film (*Sakura*). Les prises de vues sont effectuées avec un microscope à haute résolution qui scanne les coupes histologiques : le Nanozoomer Digital Pathology (*Hamamatsu*).

2-1-5-1 Immunohistochimie et hybridation *in situ*

Le Discovery XT (*Ventana*) est un automate qui permet de réaliser des marquages immunohistochimiques et de l'hybridation *in situ* sur lame. Le déparaffinage des tissus est réalisé par la chaleur. Seules les concentrations et les durées d'incubation des anticorps primaires (Ac I) et des anticorps de détection (Ac II) sont données ci-dessous, les protocoles d'IHC et d'ISH sont respectivement joints en Annexes 5 et 6.

CD105 murin. Goat anti-mouse endoglin AB : 0,4 µg/mL, 60 minutes. AffiniPure Rabbit Anti-Goat IgG (H+L) : 3,6 µg/mL, 30 minutes.

F4-80 murin. Rat anti-mouse F4-80 antigen clone BM8 : 1 µg/mL, 30 minutes. Biotin-SP-AffiniPure Donkey Anti-Rat IgG (H+L) : 18 µg/mL, 30 minutes.

CD31 humain. Mouse anti-human CD31 clone JC70 : non communiqué par le fabricant, 60 minutes. Anti-Mouse IgG1 rabbit monoclonal AB clone M1gG51-4 : 1,2 µg/mL, 30 minutes.

CD105 humain. Rabbit anti-human CD105 receptor : 5 µg/mL, 6 heures. Biotin-SP-AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) : 17 µg/mL, 30 minutes.

Sonde ALU. ALU positive control probe : 500 ng/mL, 4 minutes. Biotin-SP-conjugated IgG fraction monoclonal mouse anti-fluorescein FITC : 0,4 µg/mL, 30 minutes.

2-1-5-2 Colorations structurales

Trichrome de Masson. Protocole détaillé en Annexe 7. L'hémalum de Mayer colore les noyaux et les structures basophiles en bleu-violet. La Fushine Ponceau colore d'une part les cytoplasmes, la créatine et les fibres musculaires en rouge-rosé, et d'autre part, les hématies en rouge foncé. Le vert lumière colore les fibres conjonctives en vert.

Hématoxyline. Protocole détaillé en Annexe 7. L'hématoxyline, qui est de l'hémalum de Mayer modifié, colore les noyaux en bleu-violet. L'utilisation de Bluing Reagent® en fin de protocole permet d'accentuer le contraste de coloration.

2-1-6 Numération sanguine

Le sang qui est dédié à la numération sanguine est transféré dans des tubes coâtés avec du Tri-Kalium EDTA qui sert d'anticoagulant (Micovettes 200 K3E, *Sarstedt, ref 20-1288*). La détermination du nombre de globules blancs est réalisée avec un automate de numération sanguine à usage vétérinaire : ABCVet (*Animal Care Compagny*). Le dénombrement des différentes populations cellulaires est basé sur la taille et la granulométrie.

2-1-7 Injection *in vivo* d'isoelectine fluorescente

De l'isoelectine fluorescente (Isoelectin GS-IB4, Alexa fluor® 488- conjugated, *Molecular Probes, ref I21411*) reprise dans PBS à raison de 1 µg/µL est injectée (150 µL) dans la veine caudale de souris anesthésiées. Après 5 minutes, le réseau vasculaire est lavé avec du PBS qui est perfusé au niveau du cœur dans le ventricule gauche après avoir préalablement mise l'oreillette droite hors fonction. Le système vasculaire est fixé en perfusant une solution de PBS (2,5 mL) contenant du paraformaldéhyde 1% (*Alpha Aesar, ref 43368*) et du glutaraldéhyde 0,5% (*Fulka Chemica, ref 49630*). Les muscles de la cuisse et du mollet sont prélevés, fixés (4°C, 24 heures dans l'Accustain®) et inclus en paraffine. Les coupes de tissu (5 µm) sont déparaffinées (Annexe 4) et montées entre lames et lamelles avec un milieu qui optimise la détection et la stabilité de la fluorescence (ProLong Gold antifade reagent, *Molecular Probes, ref P36930*). Les coupes sont observées avec un microscope confocal (LSM-500, *Zeiss*) avec une longueur d'onde d'excitation de 488 nm et un filtre d'émission de 520-550 nm.

2-1-8 Caractérisation phénotypique des PB-MNCs

Les MNCs sont isolées à partir de 400 µL de sang (100 µL par souris) qui est dilué de moitié dans du PBS, puis mélangé à 800 µL d'Histopaque-1083® (*Sigma-Aldrich, ref 1083-1*).

Après centrifugation à température ambiante pendant 30 minutes à 400 g, l'interface opaque contenant les PB-MNCs est prélevée. Les cellules sont lavées dans du milieu EBM-2 complet (milieu de culture des EPCs utilisées pour notre approche en thérapie cellulaire, Annexe 8) et centrifugées à température ambiante pendant 5 minutes à 400 g. Le culot de cellules est repris dans 500 µL de milieu, puis réparti dans 2 puits d'une plaque 96 puits fond verre coatée avec de la fibronectine humaine (*Iwaki, ref 5866-096*). Le milieu de culture est changé tous les 2 jours. Un puits est prévu pour réaliser une coloration au May Grünwald Giemsa, et l'autre puits est dédié à la mesure de l'incorporation du LDL-acétylé et à la fixation membranaire de l'isolectine. Ces expériences sont réalisées sur les PB-MNCs adhérentes après 7 jours de culture.

2-1-8-1 Coloration au May Grünwald Giemsa

Les différentes étapes de la coloration sont réalisées à température ambiante. Les PB-MNCs sont mises en contact avec une solution commerciale de May Grünwald (*Sigma-Aldrich, ref GS-80*) pendant 5 minutes. Après avoir retiré le colorant, les cellules sont incubées pendant 1,5 minutes avec du PBS, puis mises en contact pendant 20 minutes avec une solution commerciale de Giemsa (*Sigma-Aldrich, ref GS-80*) qui est diluée au 1/20^{ème} avec de l'eau déionisée. L'excès de colorant est éliminé par lavage avec de l'eau déionisée. Les prises de vues sont réalisées après évaporation complète du liquide résiduel.

2-1-8-2 Incorporation du LDL acétylé et fixation de l'isolectine

Les PB-MNCs sont incubées pendant 4 heures à 37°C dans du milieu de culture (EBM-2 complet) contenant 10 µg/mL de LDL acétylé couplé à un fluorochrome : le Dil (Dil-Ac-LDL, *Biomedical Technologies Inc., ref BT-902*). Les cellules sont ensuite fixées pendant 10 minutes à 4°C avec une solution de paraformaldéhyde à 4% (*Alpha Aesar, ref 43368*), puis incubées pendant 45 minutes à température ambiante avec de l'isolectine couplée à la fluorescéine (*Vector Laboratories, ref FL-1201*) qui est diluée à raison de 20 µg/mL dans du PBS contenant de la BSA 0,1% et du Tween20 0,05%. Les PB-MNCs sont enfin incubées 10 minutes à température ambiante avec du PBS contenant un agent intercalant de l'ADN, le Hoechst 33342 à 1 µg/mL (*Invitrogen, ref H3570*). Notons que les cellules sont lavées entre chaque étape pour limiter la fluorescence non spécifique. Les prises de vues sont réalisées avec un lecteur de fluorescence en plaque : l'Opéretta (*BD Biosciences*). Pour détecter la fluorescence cytoplasmique associée au Dil-Ac-LDL nous avons utilisé un filtre d'excitation 520/550 nm et un filtre d'émission 560/630 nm. Pour détecter la fluorescence membranaire associée à l'isolectine-fluorescéine nous avons utilisé un filtre d'excitation 460/490 nm et un filtre d'émission 500/550 nm. Enfin, pour la

détection de la fluorescence nucléaire du Hoechst 33342 nous avons utilisé un filtre d'excitation 360/400 nm et un filtre d'émission 410/460 nm.

2-2 Evaluation du bénéfice thérapeutique de la stimulation de la voie FGF

2-2-1 Protocoles expérimentaux

Etude de biodisponibilité. Le SAR X (1 mg/kg) et l'idrabioparinux (anticoagulant, 300 nmol/kg) sont respectivement administrés par voie i.m (muscles postérieurs de la cuisse) et s.c (interscapulaire) deux heures après la ligature de l'artère fémorale chez des souris Balb/c de 10 semaines. L'étude est réalisée sur des souris Balb/c car cette souche, au demeurant moins onéreuse, sert de fond génétique aux souris nude que nous avons sélectionnées pour nos études. L'idrabioparinux est injecté quotidiennement pendant les 5 premiers jours de l'étude. Les muscles de la cuisse, les muscles du mollet et le plasma sont prélevés 1 heure, 24 heures, 72 heures, 96 heures et 168 heures après l'injection pour analyse par un service dédié au dosage des produits SAR dans les échantillons biologiques (Early Bioanalysis group, Drug Disposition, Montpellier DSAR Operational Center).

Evaluation du bénéfice thérapeutique du SAR X. Au cours d'un premier protocole, le SAR X est administré par voie i.m une fois par semaine aux doses de 0,3 mg/kg et de 1 mg/kg pendant les 14 jours (J0, J7 et J14) qui suivent la ligature de l'artère fémorale chez des souris Balb/c nude de 10 semaines. Un groupe expérimental de souris traitées avec le véhicule du SAR X fait office de groupe témoin. L'ensemble des souris reçoivent une injection d'idrabioparinux (300 nmol/kg, s.c) pendant 21 jours, sauf le week-end. La régénération post-ischémique est suivie pendant 28 jours. Un deuxième protocole basé sur le même schéma de traitement que précédemment, mais focalisé sur la dose de 1 mg/kg, a été réalisé pour vérifier la stabilité de la revascularisation. Ce nouveau protocole intègre, en plus des souris traitées avec le SAR X, des souris traitées avec le véhicule du SAR X et l'idrabioparinux (300 nmol/kg) qui font office de groupe témoin. Des souris non traitées sont également incluses dans l'étude.

2-2-2 Paramètres évalués pendant l'étude

La mesure du flux sanguin distal par imagerie Doppler, l'estimation de la survie de la patte ischémisée et le dosage du CD105 musculaire sont réalisés dans les mêmes conditions que celles décrites dans la partie 1 du projet (cf paragraphe 2-1, page 37).

2-3 Evaluation du bénéfice thérapeutique de la greffe d'EPCs

2-3-1 Protocoles expérimentaux

Sélection de la voie d'administration. Des EPCs ou des HUVECs (500000 cellules) reprises dans 100 μ L de PBS sont injectées dans la veine caudale, un jour après la ligature de l'artère fémorale chez des souris Balb/c nude mâle de 10 semaines. En parallèle, un million d'EPCs reprises dans 100 μ L de PBS sont injectées dans les muscles postérieurs de la cuisse (4 fois 25 μ L). Les souris témoin reçoivent une injection de PBS. Nous avons suivi pendant 14 jours (i.v) et pendant 28 jours (i.m) l'innocuité de l'administration de cellules humaines et nous avons évalué leur bénéfice thérapeutique vis-à-vis de la régénération post-ischémique.

Administration locale avec une matrice protéique. Des EPCs humaines ou des HUVECs (500000 cellules) incorporées dans 150 μ L de Matrigel® (*BD Biosciences, ref 354234*) sont injectées dans les muscles postérieurs de la cuisse (3 fois 50 μ L), un jour après la ligature de l'artère fémorale chez des souris Balb/c nude mâle de 10 semaines. Les souris témoin reçoivent une injection i.m de Matrigel® seul. Nous avons évalué pendant 14 jours l'innocuité de cette approche, et suivi le bénéfice de cette thérapie vis-à-vis de la régénération post-ischémique. Un second protocole expérimental utilise une autre matrice protéique : l'acide hyaluronique (HA). La veille de son utilisation, l'HA à 1% (*Sigma-Aldrich, ref H7630-50MG*) est hydraté pendant une nuit à 4°C dans du PBS. Un jour après la ligature de l'artère fémorale chez des souris Balb/c nude mâle de 10 semaines, un million d'EPCs humaines incorporées dans 100 μ L d'HA sont injectées dans les muscles postérieurs de la cuisse (4 fois 25 μ L). Les souris témoin reçoivent une injection de PBS seul. Nous avons évalué pendant 28 jours l'innocuité de cette nouvelle approche, et suivi son bénéfice thérapeutique vis-à-vis de la régénération post-ischémique.

Les conditions de culture des EPCs et des HUVECs sont détaillées en annexe 8.

2-3-2 Biologie moléculaire

Ces expérimentations sont réalisées par un service du département dédié à cette activité. L'extraction des ARNs totaux d'EPCs et d'HUVECs est réalisée avec le kit SV Total RNA Isolation System (*Promega, ref Z3100*). Deux millions de cellules sont lysées dans 175 μ L de tampon de lyse contenant du β -mercaptoethanol. Une étape de digestion par la DNase I est effectuée. Au final, 100 μ L d'ARN totaux sont élués. La vérification de la qualité des ARNs et leur dosage est effectuée grâce au RNA 6000 nano kit (*Agilent, ref 5067-1511*) sur l'appareil

Bioanalyser 2100 (*Agilent*). La transcription inverse des ARNm en ADNc est réalisée à partir de 2 µg d'ARN total grâce au SuperScript III First Strand Synthesis kit (*Invitrogen, ref 180800051*) en utilisant des Oligo-dT et des Random Hexamères. La réaction est faite sur un thermocycler 9700 PCR System (*Applied Biosystems*) avec la norme 9600. Les ADNc obtenus sont dilués au 4/25^{ème}. Leur quantification est faite avec le 7500 SDS Detection System (*Applied Biosystems*). Le dosage est réalisé sur 5 µL d'ADNc dilués, auxquels sont ajoutés 10 µl de TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (*Applied Biosystems, ref 4364103*). Les primers dirigés contre les séquences humaines sont ramenés à 1X (volume final de 20 µL) : FGFR-1 (*Hs00241111_m1*), FGFR-2 (*Hs00240796_m1*), FGFR-3 (*Hs00179829_m1*), FGFR-4 (*Hs00242558_m1*), VEGFR-1 (*Hs00176573_m1*), VEGFR-2 (*Hs00176676_m1*), VEGFR-3 (*Hs00176607_m1*) et le gène de ménage TBP (*Hs99999910_m1*).

2-3-3 Paramètres évalués pendant l'étude

Pour les protocoles de thérapie cellulaire, la rate et les poumons sont prélevés, pesés et fixés en vu d'études histologiques dans les mêmes conditions que les muscles (cf paragraphe 2-1-5, page 39). La mesure du flux sanguin distal par imagerie Doppler, l'estimation de la survie de la patte ischémisée, l'histologie (ISH ALU, colorations structurales) et le dosage de la quantité de CD105 musculaire sont réalisés dans les mêmes conditions que celles décrites dans la partie 1 du projet (cf paragraphe 2-1, page 37).

3- Analyses statistiques

Le logiciel utilisé pour les analyses statistiques est *EVERST@T V5.0.0*. Pour les études randomisées nous avons utilisé le logiciel *BIOST@T-RANDO V6.0.010*.

Partie 1 : Mise en place d'un modèle d'AOMI chez la souris nude.

Sélection du fond génétique. Nous avons comparé les niveaux de reperfusion en réalisant un test ANOVA 2 facteurs (temps et groupe expérimental) avec mesures répétées sur le facteur temps. Pour la comparaison de la chirurgie d'excision chez les souris C57Bl6 et Balb/c, le groupe contrôle est le groupe des souris C57Bl6. Pour la comparaison des chirurgies de ligature et d'excision chez les souris Balb/c, le groupe contrôle est le groupe des souris Balb/c opérées avec la chirurgie d'excision.

Caractérisation du modèle chez les souris Balb/c nude. Pour comparer les paramètres plasmatiques nous avons utilisé un test ANOVA 1 facteur avec des objectifs dissociés. En premier lieu nous avons vérifié l'influence du geste chirurgical sur la mesure des paramètres étudiés. On a ainsi testé les résultats obtenus chez les souris non opérées (J0) versus les sham pour voir un effet global des sham. Si on observe un effet global, on regarde la significativité de chaque groupe. Dans un deuxième temps, nous avons comparé les résultats de chaque point de la cinétique versus J0. Pour la comparaison des paramètres musculaires, nous avons vérifié que les résultats des pattes controlatérales (ou pattes droite des souris sham) ne sont pas différents de la patte droite des souris J0. Puis, nous avons réalisé un test ANOVA 1 facteur avec des objectifs dissociés. En premier lieu nous avons vérifié l'influence du geste chirurgical sur la mesure des paramètres étudiés. On a ainsi testé la patte gauche des souris J0 versus la patte gauche des souris sham pour voir un effet global des sham. Si on observe un effet global, on regarde la significativité de chaque groupe. Puis dans un deuxième temps, nous avons testé la significativité des résultats de la patte ischémisée de chaque point de la cinétique versus la patte gauche des souris J0. Si les variances ne sont pas homogènes, nous n'utilisons pas le test ANOVA (test paramétrique) mais le test de Kruskal-Wallis (test non paramétrique).

Partie 2 : Evaluation du bénéfice thérapeutique de la stimulation de la voie FGF.

Pour les deux protocoles d'évaluation du SAR X, nous avons comparé les niveaux de reperfusion en réalisant un test ANCOVA 2 facteurs (temps et groupe expérimental) avec mesures répétées sur le facteur temps. Le groupe qui sert de contrôle expérimental est le groupe des souris traitées avec le véhicule du SAR X + l'idrabiota-parinux.

Résultats

Partie 1 : Mise en place d'un modèle d'AOMI chez la souris nude.

1- Sélection du fond génétique

Nous avons choisi de développer notre modèle d'AOMI chez les souris nude car le caractère immunodéprimé de cette souche autorise la greffe de cellules humaines. Nous avons comparé la capacité de récupération post-ischémique des souris C57Bl6 et Balb/c, qui sont les fonds génétiques les plus courants pour la souche nude, afin de sélectionner la souche qui présente la reperfusion de la patte la plus retardée possible, tout en montrant une incidence et une sévérité des nécroses éthiquement acceptable. Ainsi, nous avons suivi la récupération du flux sanguin distal et la survie de la patte ischémique pendant les 14 jours qui font suite à l'interruption du flux sanguin fémoral chez des souris C57Bl6 et Balb/c mâles âgées de 11 semaines. L'ischémie est provoquée par l'excision d'une portion de l'artère et de la veine fémorale (C57Bl6 et Balb/c) ou par la simple ligature de l'artère fémorale (Balb/c).

1-1 Reperfusion post-ischémique

Le suivi de la reperfusion post-ischémique est réalisé par la mesure du flux sanguin distal par imagerie Doppler. La quantification du ratio de perfusion entre la patte ischémique (I) et la patte controlatérale (C) permet de déterminer le pourcentage de perfusion I/C des souris C57Bl6 et Balb/c pendant les 14 jours qui font suite à l'induction chirurgicale de l'ischémie par la chirurgie d'excision ou de ligature de l'artère fémorale (Figure 1). Indépendamment de leur phénotype et de la chirurgie, les souris présentent un pourcentage de perfusion I/C voisin de 100% avant l'opération (T0) qui atteint à une valeur proche de 10% après l'induction de l'ischémie (T1). Après l'excision d'une portion de l'artère et de la veine fémorale, les souris Balb/c montrent une reperfusion post-ischémique ralentie par rapport aux souris C57Bl6 : $28,8 \pm 3,2$ % contre $45,7 \pm 5,6$ % après 7 jours ($p = 0,0001$) et $54,4 \pm 3,0$ % contre $66,0 \pm 4,4$ % après 14 jours ($p = 0,0073$). La simple ligature de l'artère fémorale chez les souris Balb/c permet d'obtenir un niveau de reperfusion après 14 jours qui est équivalent à celui observé avec la technique chirurgicale d'excision : $55,9 \pm 2,6$ % contre $54,4 \pm 3,0$ %. Notons que la perfusion déterminée chez les souris Balb/c après 7 jours d'ischémie apparaît plus important dans le cas de la ligature de l'artère que lors de son excision : $44,3 \pm 3,7$ % contre $28,8 \pm 3,2$ % ($p = 0,0002$).

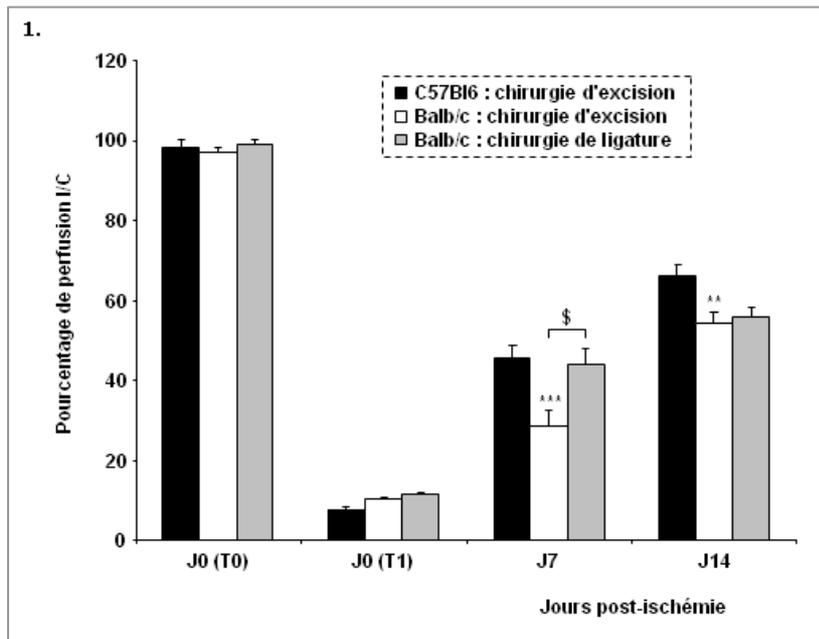


Figure 1 : Suivi de la reperfusion distale post-ischémique par imagerie Doppler. Pourcentage de reperfusion I/C \pm sem. ANOVA deux facteurs avec mesures répétées sur le facteur temps : ** : $p < 0,01$ et *** : $p < 0,001$ pour la comparaison des souris C57Bl6 et Balb/c avec la chirurgie d'excision, et \$: $p < 0,001$ pour la comparaison des chirurgies d'excision et de ligature chez les souris Balb/c. C57Bl6 chirurgie d'excision (n=14), Balb/c chirurgie d'excision (n=18), et Balb/c chirurgie de ligature (n=8).

J0 : jour de l'opération, sem : standard error of mean, T0 : mesure avant l'opération, T1 : mesure juste après l'induction de l'ischémie.

1-2 Survie de la patte ischémique

Nous avons estimé l'incidence et la sévérité des atteintes nécrotiques de la patte des souris C57Bl6 et Balb/c suite à l'interruption du flux sanguin fémoral (Figure 2). Pendant deux semaines, les nécroses sont quantifiées et classées en fonction de leur sévérité et de leur progression : aucune nécrose (grade 0), nécrose de un ou de plusieurs ongles (grade 1), nécrose de un ou de plusieurs doigts (grade 2), un ou plusieurs doigts nécrosés et gonflés (grade 3), auto-amputation de un ou de plusieurs doigts (grade 4), nécrose du pied (grade 5), et enfin auto-amputation du pied (grade 6).

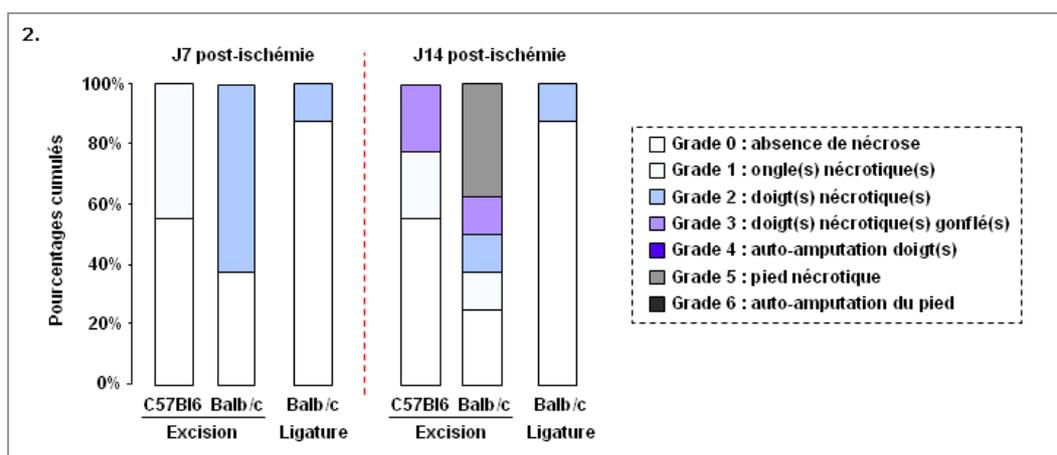


Figure 2 : Estimation de la survie de la patte ischémique. Incidence et hiérarchisation des nécroses de la patte en fonction de leur sévérité. Pourcentages cumulés de chaque grade de nécrose. Analyse descriptive. Souris C57Bl6 chirurgie d'excision (n=9), souris Balb/c chirurgie d'excision (n=8) et souris Balb/c chirurgie de ligature (n=8).

La majorité des souris C57Bl6 ne présentent pas de nécroses après la première semaine qui suit l'excision d'une portion de l'artère et de la veine fémorale. Les altérations nécrotiques observées sont de grade 1. Dans les mêmes conditions chirurgicales, l'incidence et la sévérité des nécroses sont plus importantes après une semaine d'ischémie chez les souris Balb/c qui présentent des nécroses de grade 2. La simple ligature de l'artère fémorale chez les souris Balb/c ne modifie pas la sévérité des nécroses (grade 2) mais diminue leur incidence.

Après deux semaines d'ischémie, la sévérité des atteintes nécrotiques augmente chez les souris C57Bl6 et Balb/c pour lesquelles l'ischémie a été induite par l'excision d'une portion de l'artère et de la veine fémorale. Les nécroses atteignent le grade 3 pour les souris C57Bl6 et le grade 5 pour les souris Balb/c. L'incidence et la sévérité des nécroses des souris Balb/c dont la patte est ischémisée par ligature de l'artère fémorale restent quant à elles stable par rapport à la première semaine, les altérations nécrotiques sont toujours de grade 2.

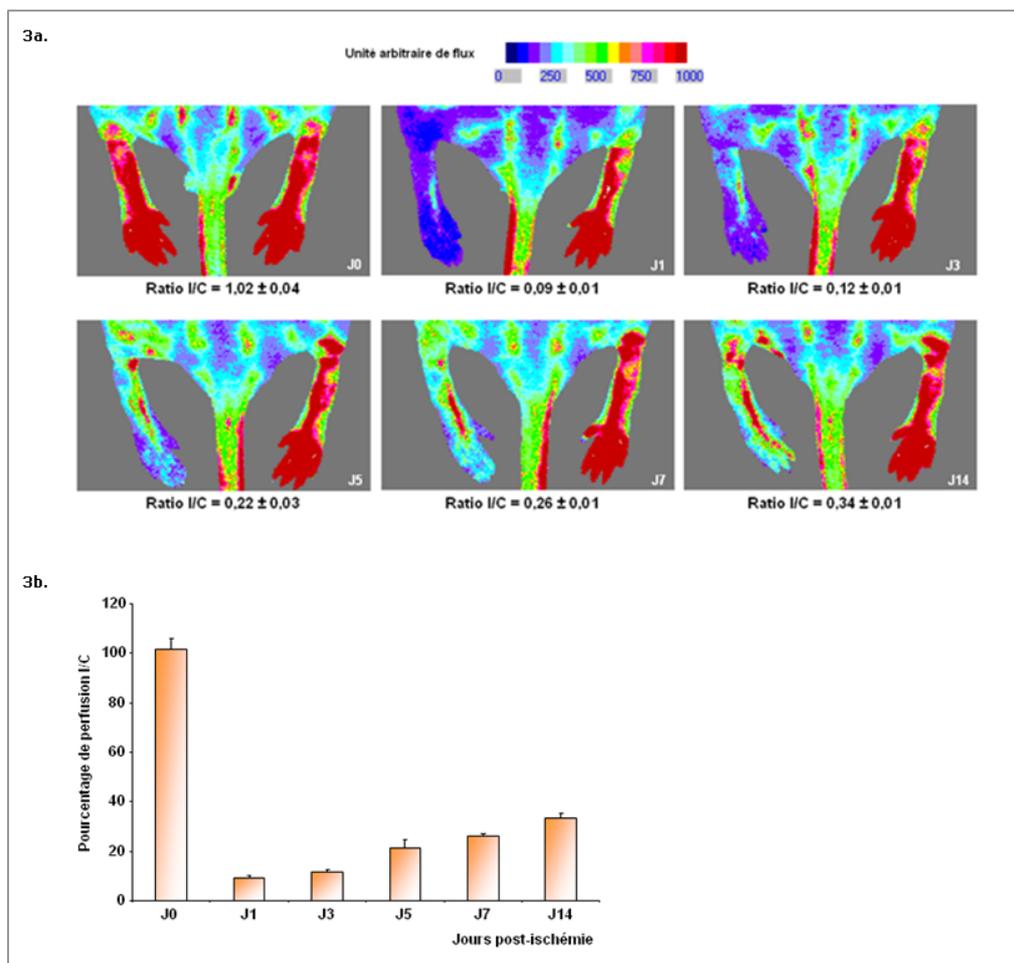
L'induction de l'ischémie par ligature de l'artère fémorale chez les souris Balb/c permet d'obtenir un modèle d'étude qui présente une reperfusion post-ischémique reproductible et modérée avec une incidence et une sévérité des nécroses éthiquement acceptable. Nous avons donc décidé d'utiliser cette technique chirurgicale pour induire l'ischémie de la patte de notre modèle d'AOMI développé chez des souris nude d'un fond génétique Balb/c.

2- Modèle d'AOMI développé chez la souris Balb/c nude

L'ischémie de la patte est induite par ligature de l'artère fémorale chez des souris Balb/c nude mâle âgées de 10 à 11 semaines. La caractérisation du modèle prévoit des groupes sham qui permettent de faire la part des réponses biologiques consécutives à l'ischémie de celles pouvant être liées au geste chirurgical (procédure chirurgicale réalisée sans ligature de l'artère fémorale). Le suivi de la reperfusion post-ischémique distale, l'estimation de la survie de la patte ischémisée et les prélèvements tissulaires (muscles de la cuisse, muscles du mollet et plasma) sont effectués pour les temps J1, J3, J5, J7 et J14 post-ischémie et pour les groupes sham équivalents aux temps J1 et J3 (SJ1 et SJ3). Seuls ces deux groupes sham ont été effectués à cause de la charge de travail qu'aurait demandé la réalisation de sham équivalents à l'ensemble des temps de la cinétique. Ils ont été choisis par connaissance d'une phase inflammatoire précoce que nous avons mis en évidence par l'augmentation des taux plasmatiques de la chimiokine MCP-1 au cours d'expérimentations préliminaires réalisées dans le cadre de la caractérisation d'un modèle d'AOMI chez la souris C57Bl6. Un groupe de souris Balb/c nude non opérées (J0) sert de contrôle pour l'ensemble des données collectées.

2-1 Reperfusion post-ischémique

La perfusion distale mesurée par imagerie Doppler avant l'opération et après la ligature de l'artère fémorale n'est pas significativement différente selon les souris opérées. L'induction chirurgicale de l'ischémie est comparable pour tous les groupes expérimentaux (non montré). La cartographie infrarouge montre que le rétablissement du flux sanguin distal est initié à partir de la partie haute de la patte pour gagner progressivement le pied, puis les extrémités des doigts (Figure 3a). La reperfusion des souris Balb/c nude reste logiquement très faible pendant les trois premiers jours qui suivent l'induction de l'ischémie ($9,5 \pm 0,7 \%$ à J1 et $11,5 \pm 1,3 \%$ à J3) atteint $21,6 \pm 3,3 \%$ le 5^{ème} jour (Figure 3b). La perfusion progresse jusqu'à $26,1 \pm 1 \%$ après 7 jours pour s'améliorer modestement en atteignant $33,7 \pm 1,4 \%$ après 14 jours. Notons que la récupération du flux sanguin distal des souris Balb/c nude est ralentie par rapport aux souris Balb/c, ces dernières présentent des pourcentages de perfusion I/C de $44,3 \pm 3,7 \%$ et de $55,9 \pm 2,6 \%$ après respectivement 7 et 14 jours d'ischémie (différence statistique non testée).



Figures 3 : Suivi de la reperfusion distale post-ischémique par imagerie Doppler. a- Cartographie infrarouge. Unité arbitraire de flux, quantification de la reperfusion sous forme d'un ratio I/C \pm sem (n=5 déterminations par groupe, sauf pour J7 n=4). b- Cinétique de reperfusion. Pourcentage de perfusion I/C \pm sem (n=5 déterminations par groupe, sauf pour J7 n=4).

I/C : perfusion patte ischémisée/perfusion patte controlatérale, J0 : souris non opérées, sem : standard error of mean.

2-2 Analyse macroscopique

2-2-1 Evolution pondérale et survie de la patte ischémique

Au début de l'étude les souris Balb/c nude ont un poids moyen de $23,0 \pm 0,2$ g. Les souris présentent une perte de poids modérée la première semaine post-ischémie qui ne dépasse pas 4% au troisième jour. Après 14 jours les souris ont récupéré leur poids initial et commencent à prendre du poids. L'incidence des altérations nécrotiques sont très faibles. Les animaux ne présentent pas de nécroses, seule une souris a été atteinte de nécroses au niveau des doigts qui a abouti à leur auto-amputation après 7 jours d'ischémie (Figure 4).

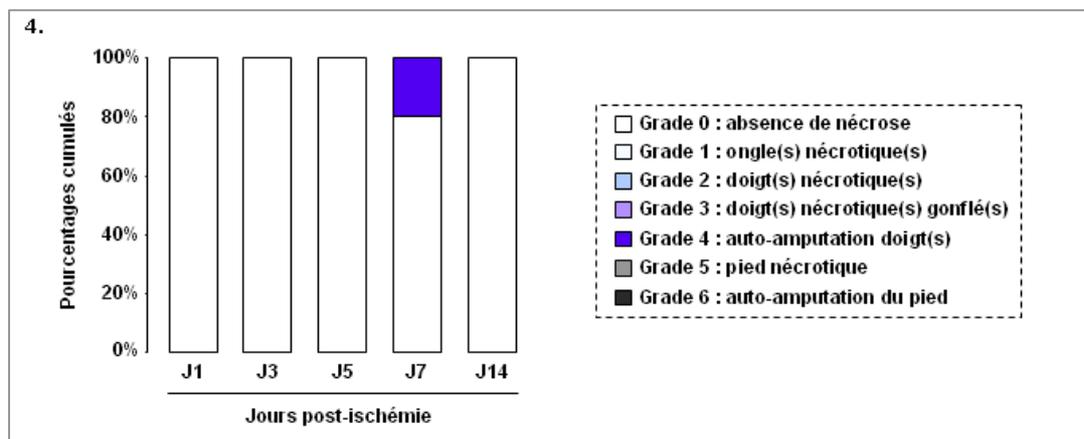


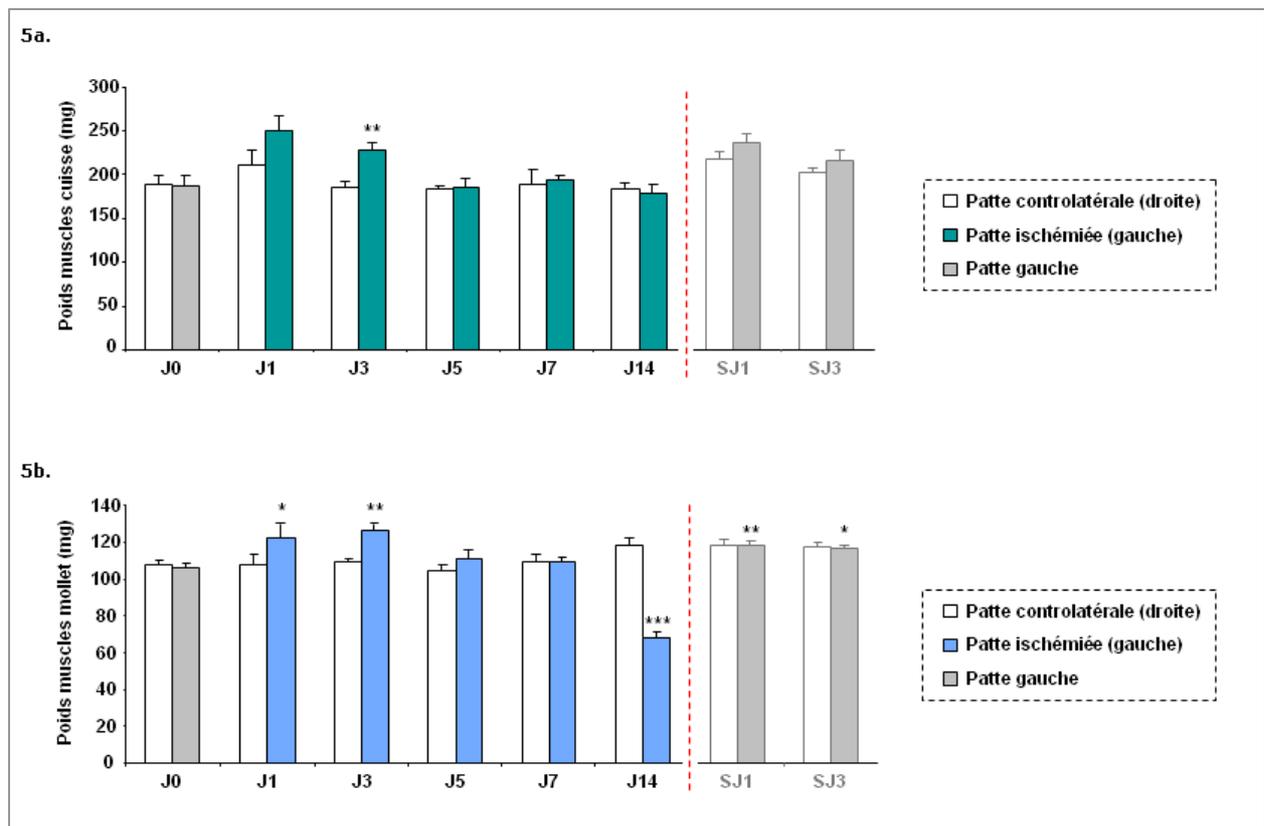
Figure 4 : Estimation de la survie de la patte ischémique. Incidence et hiérarchisation des nécroses de la patte en fonction de leur sévérité. Pourcentages cumulés de chaque grade de nécrose. Analyse descriptive. (n=5 déterminations par groupe).

On observe une altération motrice du membre inférieur suite à l'induction chirurgicale de l'ischémie. Notons que malgré la patte qui reste inerte, les souris se déplacent dans la cage et ne restent pas prostrées. Les souris récupèrent une motricité qui semble normale à partir d'une semaine, cette donnée reste néanmoins une observation visuelle qui pourrait être quantifiée en mesurant des paramètres tels que la distance de marche et la surface d'appui au sol.

2-2-2 Poids des muscles de la patte

Les conséquences de l'ischémie au niveau des muscles de la cuisse et du mollet sont mises en évidence par l'appréciation de leur aspect visuel et par la mesure de leur poids. Pendant les 5 premiers jours qui font suite à l'interruption du flux sanguin fémoral, les muscles de la cuisse et du mollet ont un aspect dur, gonflé et décoloré (phénomène moins marqué pour les muscles de la cuisse) qui laisse présager de la formation d'un œdème. Cette inflammation locale est mise en évidence par l'augmentation du poids des muscles de la patte ischémique par rapport aux muscles controlatéraux durant les 3 premiers jours (Figures 5a et 5b). Le poids des muscles

de la cuisse et du mollet des souris qui sont ischémisées depuis 3 jours sont significativement différents des souris non opérées (J0), avec respectivement $250 \pm 17,9$ mg contre $187,2 \pm 10,8$ mg ($p = 0,0034$) et $126,8 \pm 3$ mg contre $106,4 \pm 2,4$ mg ($p = 0,0085$). L'augmentation de poids qui est observée après un jour d'ischémie pour les deux localisations musculaires n'est significativement différente des souris non opérées que pour les muscles du mollet avec $122,8 \pm 7,3$ mg contre $106,4 \pm 2,4$ mg ($p = 0,0406$). Après 14 jours d'ischémie, seuls les muscles du mollet, qui restent décolorés pendant ce laps de temps, présentent une forte diminution de poids qui signe une atrophie musculaire : $68,4 \pm 2,8$ mg contre $106,4 \pm 2,4$ mg (J0) ($p < 0,0001$).



Figures 5 : a- Poids des muscles de la cuisse. b- Poids des muscles du mollet. mg \pm sem. ANOVA un facteur : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$ et *** : $p < 0,001$ pour la comparaison des muscles ischémisés versus J0 ($n=5$ déterminations par groupe, pour sham $n=3$).

J0 : souris non opérées, S : sham, sem : standard error of mean.

L'augmentation de poids des muscles ischémisés observée suite à la ligature de l'artère fémorale n'est pas dépendante du geste chirurgical. En effet, même si nous observons une différence significative entre le poids des muscles du mollet des pattes gauches pour les souris non opérées et sham ($118,7 \pm 1,8$ mg pour SJ1, $p = 0,0079$ et $116,7 \pm 1,3$ mg pour SJ3, $p = 0,0199$), le poids des muscles de la patte gauche des souris sham reste très proche de celui des muscles de la patte droite ($118 \pm 3,5$ mg pour SJ1 et $117,3 \pm 2,9$ mg pour SJ3).

L'induction de l'ischémie par ligature de l'artère fémorale est bien tolérée par les souris Balb/c nude qui présentent une bonne évolution pondérale post-opératoire, des altérations nécrotiques de la patte très modérées et une activité locomotrice qui semble normale après une semaine. L'interruption du flux sanguin fémoral a pour conséquence la formation d'un œdème musculaire qui est mis en évidence pendant les trois premiers jours (augmentation du poids avec un aspect gonflé, dur et décoloré). Après deux semaines d'ischémie, les muscles de la cuisse ne présentent pas de traumatismes macroscopiques alors que les muscles du mollet, qui sont restés décolorés, s'atrophient. Ces modifications macroscopiques restent à être explorées plus en détail grâce à l'étude de la structure musculaire.

2-3 Analyse microscopique

Les conséquences de l'ischémie au niveau musculaire sont mises en évidence par l'identification des modifications structurales observables sur des sections des muscles de la cuisse et du mollet colorées avec la technique du Trichrome de Masson montre qu'après 14 jours l'ischémie est a des conséquences plus délétères pour les muscles du mollet que pour les muscles de la cuisse : changement d'aspect général, de structure et de couleur (Figure 6).

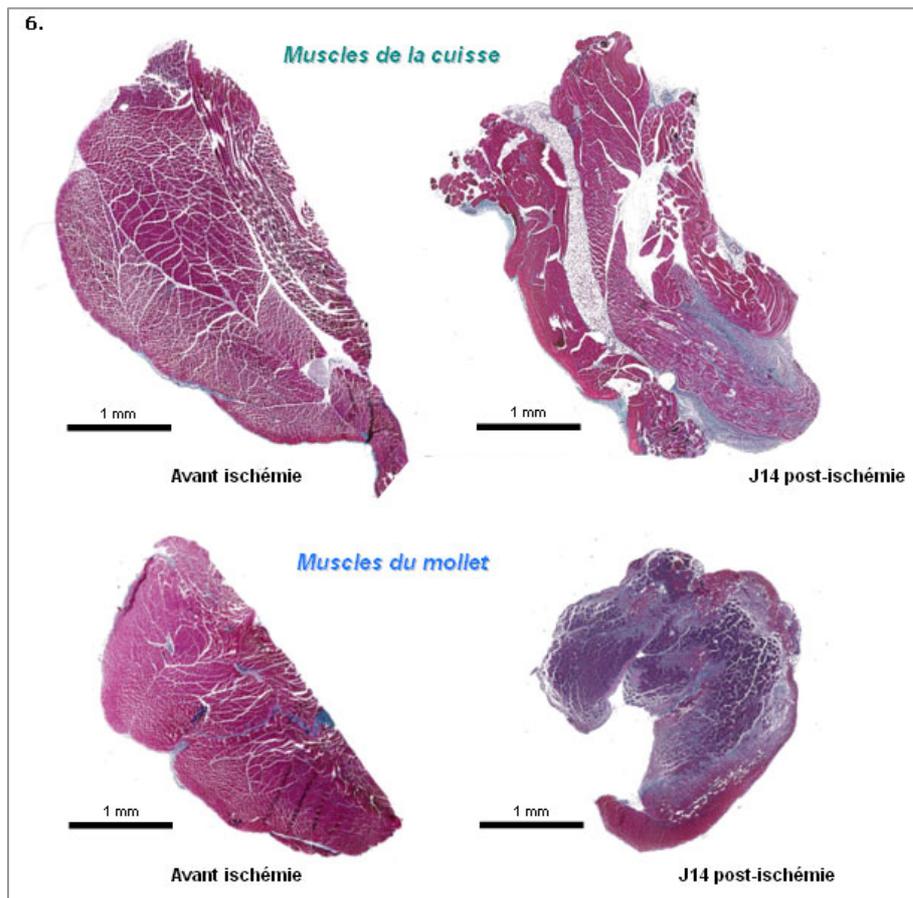


Figure 6 : Structure des muscles de la cuisse et du mollet après 14 jours d'ischémie. Coupes transversales. Coloration Trichrome de Masson.

Comme le montre l'étude structurale des muscles du mollet après la coloration Trichrome de Masson les cellules musculaires d'une souris non opérée ont une taille homogène, une forme anguleuse et un noyau excentré (Figure 7). Dès le premier jour qui suit l'induction de l'ischémie, les cellules musculaires commencent à se rétracter et à prendre une forme arrondie qui traduit l'atrophie du muscle. La coloration bleue/violette caractéristique des structures basophiles met en évidence une acidose du tissu. L'aspect des cellules musculaires (opacité et présence de stries) dénote d'un état nécrotique. Après deux semaines d'ischémie, des adipocytes infiltrent le muscle pour prendre la place des cellules nécrotiques, la synthèse de collagène augmente et les noyaux qui ont un aspect globuleux migrent au centre des cellules musculaires. La coloration hématoxyline met en évidence une présence cellulaire accrue autour des fibres musculaires après 5 jours d'ischémie qui pourrait signer de l'infiltration (et/ou de la prolifération) de cellules résidentes locales ou recrutées.

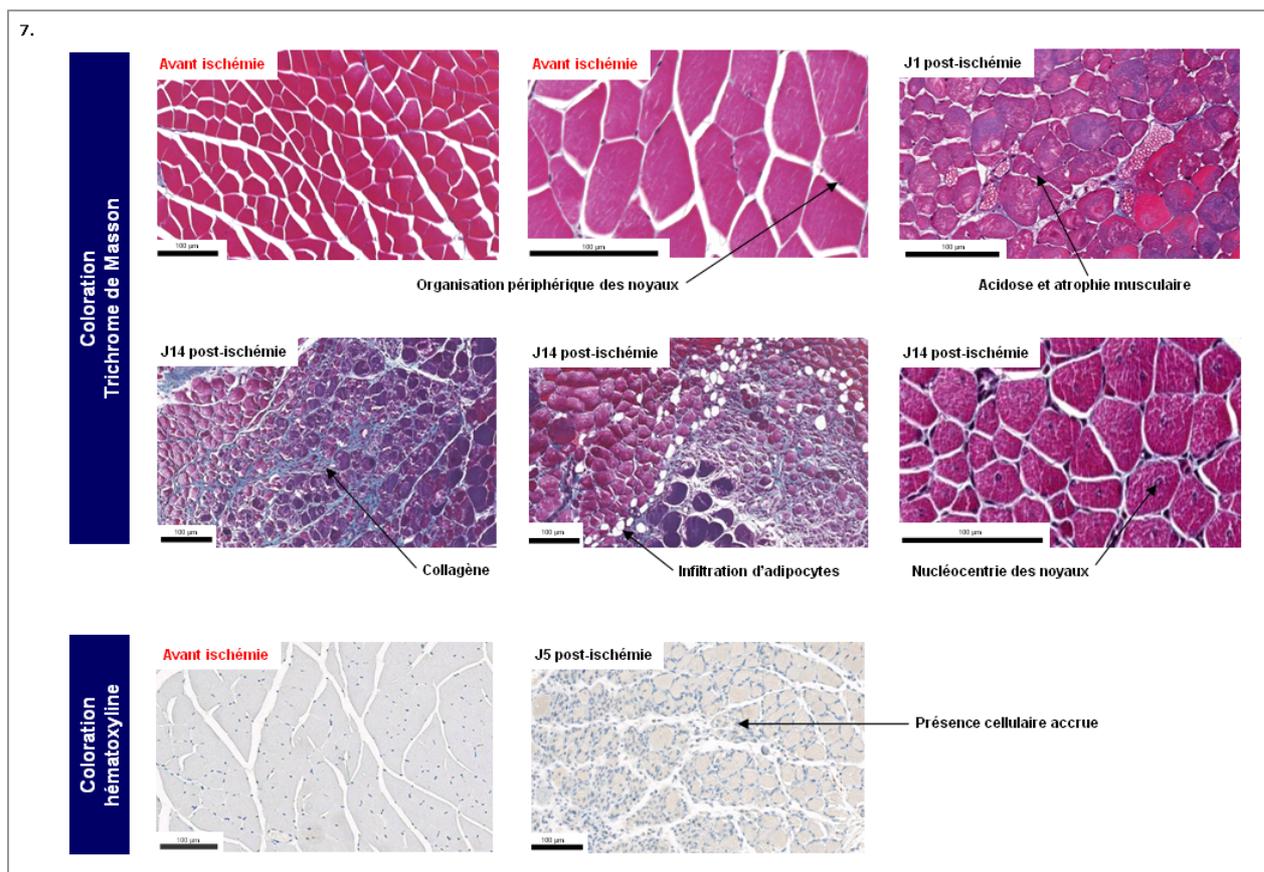


Figure 7 : Histologie structurale des muscles du mollet. Coupes transversales, colorations Trichrome de Masson et hématoxyline.

L'analyse structurale des muscles après deux semaines confirme que l'ischémie a des conséquences plus délétères pour les muscles du mollet que pour ceux de la cuisse. La dégénérescence des muscles du mollet est caractérisée par : des modifications métaboliques

(acidose), structurales (atrophie, nécroses, infiltration d'adipocytes et augmentation de la synthèse de collagène) et cellulaires (migration des noyaux au centre des cellules musculaires et présence accrue de cellules entre les fibres musculaires). Ainsi, nous avons décidé d'étudier le changement de métabolisme énergétique des muscles et le statut inflammatoire (systémique et local) qui pourraient être associées à cette dégénérescence musculaire.

2-4 Modifications environnementales

Les modifications environnementales provoquées par l'ischémie comme le changement du métabolisme énergétique des muscles et l'inflammation sont respectivement mis en évidence par le dosage des taux d'acide lactique plasmatiques et la recherche de marqueurs inflammatoires circulants et musculaires.

2-4-1 Métabolisme énergétique

Les concentrations en acide lactique augmentent dans le plasma des souris dès le premier jour post-ischémie et se maintiennent significativement élevées pendant la première semaine (Figure 8) : $1,46 \pm 0,18$ mM pour les souris non opérées (J0) contre $2,82 \pm 0,08$ mM à J1 ($p = 0,001$), $2,51 \pm 0,13$ mM à J3 ($p = 0,0092$) et $2,67 \pm 0,05$ mM à J7 ($p = 0,0029$). Cette augmentation est indépendante du geste chirurgical car la lactémie des souris sham (J1 et J3) n'est pas significativement différente de celle des souris non opérées.

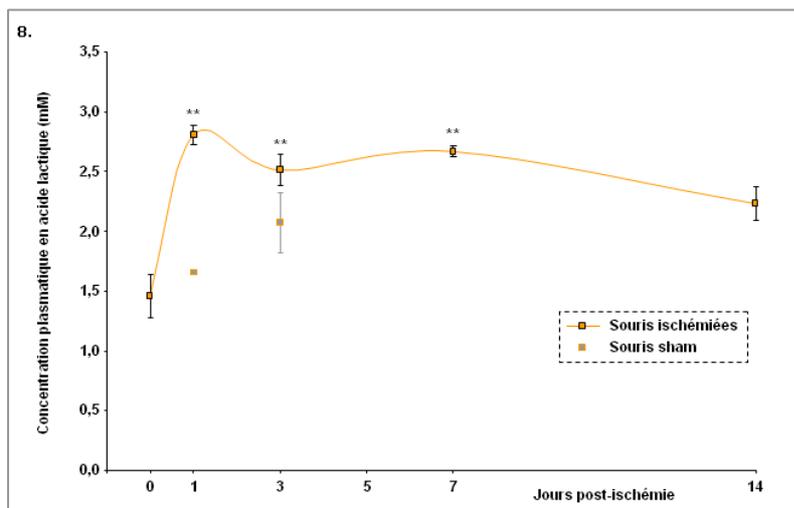


Figure 8 : Suivi des taux plasmatiques d'acide lactique. Dosage ELISA, mM \pm sem. ANOVA un facteur : ** : $p < 0,01$ pour la comparaison versus J0 (n=4 déterminations par groupe, pour sham n=3).

J0 : souris non opérées, sem : standard error of mean.

2-4-2 Composante inflammatoire

L'inflammation associée à notre modèle d'AOMI est mise en évidence au niveau systémique par la numération des cellules immunitaires circulantes et par le dosage de la protéine MCP-1 (chimiokine pro-inflammatoire). Pour évaluer l'inflammation locale nous avons déterminé la quantité de macrophages infiltrés au niveau des muscles de la cuisse via le dosage d'un marqueur protéique présent à leur surface : le récepteur F4-80. Cette glycoprotéine murine qui appartient à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires à l'EGF (epidermal growth factor, EGF-7TM) n'a pas de(s) ligand(s) clairement identifié(s) à ce jour.

2-4-2-1 Inflammation systémique

Un état inflammatoire généralisé est caractérisé par l'augmentation du nombre des globules blancs dans le sang des souris ischémiées (Figure 9). Par rapport à la numération des souris non opérées ($3,05 \pm 0,38 \times 10^3$ cellules/mm³, J0), leur nombre augmente à partir du 3^{ème} jour ($4,28 \pm 0,17 \times 10^3$ cellules/mm³, $p = 0,0204$), pour être maximal au 5^{ème} jour ($4,70 \pm 0,36 \times 10^3$ cellules/mm³, $p = 0,0038$) et perdurer jusqu'au 14^{ème} jour ($4,23 \pm 0,18 \times 10^3$ cellules/mm³ à J7, $p = 0,0267$ et $4,35 \pm 0,10$ cellules/mm³ à J14, $p = 0,0135$). La hausse du nombre de globules blancs est confirmée par la numération des lymphocytes, des monocytes et des granulocytes qui présentent un profil d'évolution similaire à la population leucocytaire totale. Le nombre de globules blancs des souris sham J1 ($3,60 \pm 0,25 \times 10^3$ cellules/mm³) et sham J3 ($4,23 \pm 0,28 \times 10^3$ cellules/mm³) est comparable aux souris ischémiées : J1 ($3,63 \pm 0,36 \times 10^3$ cellules/mm³) et J3 ($4,28 \pm 0,17 \times 10^3$ cellules/mm³). Ainsi, l'augmentation du nombre de cellules inflammatoires mise en évidence les trois premiers jours chez les souris ischémiées et chez les souris sham (J1 et J3) semble ainsi être consécutive au geste chirurgical.

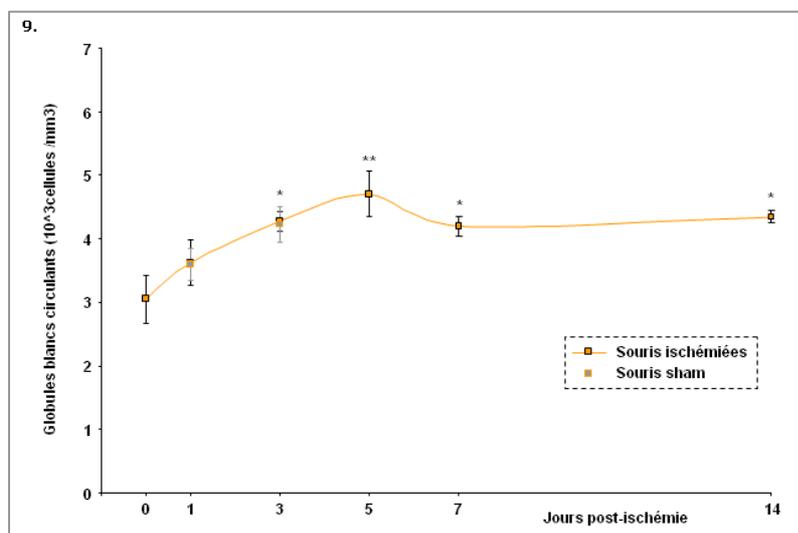


Figure 9 : Suivi du nombre de globules blancs circulants. Numération sanguine automatisée, $\times 10^3$ cellules/mm³ \pm sem. ANOVA un facteur : * : $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ pour la comparaison versus J0 (n=4 déterminations par groupe, pour sham n=3).

J0 : souris non opérées, sem : standard error of mean.

La concentration plasmatique de MCP-1 augmente dans le plasma des souris ischémisée (Figure 10). Cette hausse est significative après 3 et 7 jours d'ischémie, avec des taux respectifs de $112,7 \pm 8,9$ pg/ml ($p = 0,0038$) et de $95,1 \pm 27,4$ pg/ml ($p = 0,0303$) contre $40,4 \pm 1,5$ pg/ml pour les souris non opérées (J0). Notons une importante variabilité pour le temps J7 post-ischémie à cause d'une valeur individuelle mesurée à 173,9 pg/mL. L'augmentation de la concentration plasmatique de MCP-1 qui est observée pour les souris sham J1 ($62,0 \pm 6,6$ pg/mL, $p = 0,0096$) et qui n'est pas retrouvée pour les souris sham J3 ($45,9 \pm 3,3$ pg/mL) montre que l'opération a une influence sur la détermination J1 post-ischémie, mais que les augmentations observées après le troisième jour restent néanmoins dépendantes de la situation ischémique.

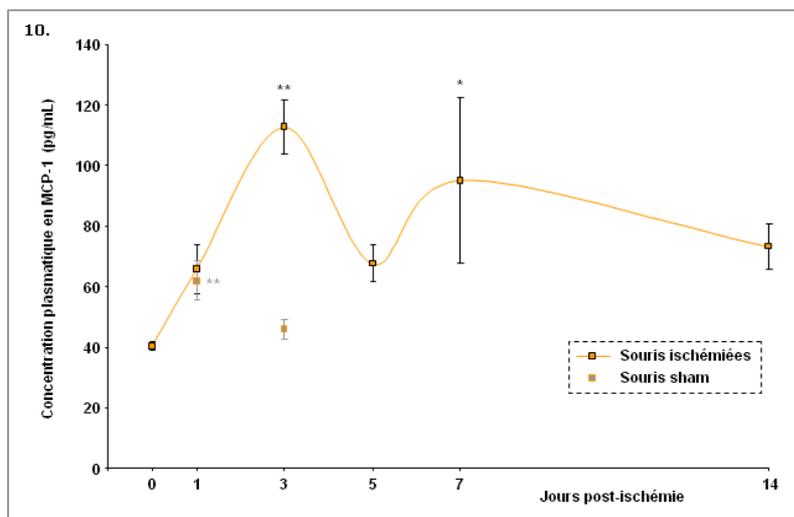


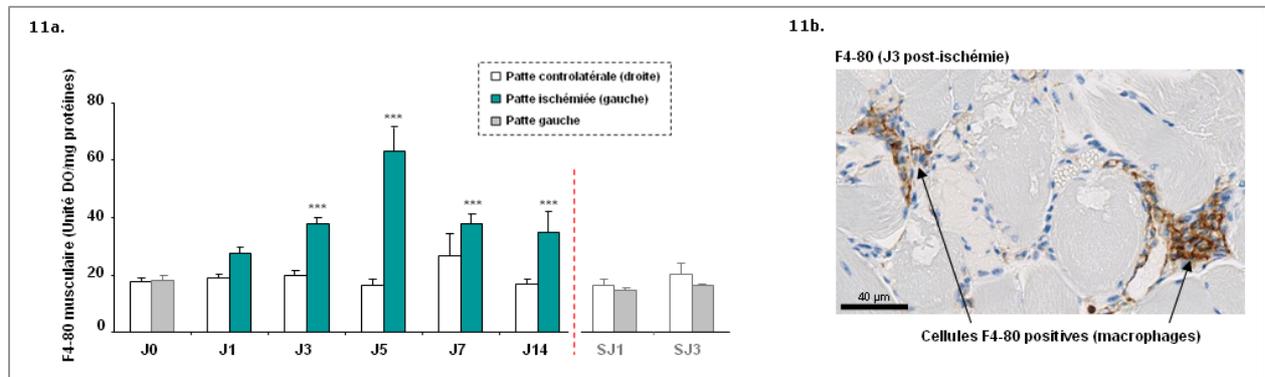
Figure 10 : Suivi des taux plasmatiques de MCP-1. Dosage ELISA, pg/mL \pm sem. ANOVA un facteur : * : $p < 0,05$ et ** : $p < 0,01$ pour la comparaison versus J0 ($n=4$ déterminations par groupe, pour sham $n=3$).

J0 : souris non opérées, sem : standard error of mean.

2-4-2-2 Inflammation musculaire

Une inflammation locale caractérisée par l'infiltration de macrophages est mise en évidence au niveau des muscles de la cuisse ischémisée. Les quantités musculaires de F4-80 (normalisées par rapport à la quantité de protéines des échantillons) augmentent par rapport aux muscles controlatéraux pendant les 14 jours qui font suite à l'interruption du flux sanguin fémoral (Figure 11a). Elles sont significativement différentes des souris non opérées ($18,2 \pm 1,7$ unité de DO/mg protéines, J0) après 3 jours ($37,5 \pm 2,3$ DO/mg protéines, $p = 0,0001$), 5 jours ($63,2 \pm 8,1$ DO/mg protéines, $p < 0,0001$), 7 jours ($38,0 \pm 3,5$ DO/mg protéines, $p = 0,0001$) et enfin 14 jours ($35,0 \pm 6,7$ DO/mg protéines, $p = 0,0008$). Le geste chirurgical n'a pas d'influence sur l'infiltration des macrophages car on n'observe pas de différence significative entre les quantités de F4-80 des muscles de la cuisse gauche des souris sham (J1 et J3) et des souris non opérées. Le marquage immunohistochimique réalisée sur des coupes de muscles de la cuisse de souris ischémisées (J3) montre que la protéine F4-80 (marquage brun) est mise en évidence au

niveau de cellules qui entourent les cellules musculaires (Figure 11b). Cette localisation confirme la mobilisation de macrophages sur le site d'ischémie, et corrobore les observations faites lors de l'analyse structurale des muscles du mollet qui mettent en évidence la présence de cellules autour des fibres musculaires pendant la dégénérescence du muscle.



Figures 11 : a- Suivi de la quantité de F4-80 musculaire (cuisse). Dosage ELISA, unité de DO/mg de protéines \pm sem. Test de Kruskal Wallis : *** : $p < 0,001$ pour la comparaison versus J0 (n=4 déterminations par groupe, pour sham n=3). b- Localisation de la protéine F4-80 au niveau des muscles de la cuisse (J3 post-ischémie). Coupes transversales, immunohistochimie avec un anticorps anti- F4-80 et contre coloration hématoxyline.

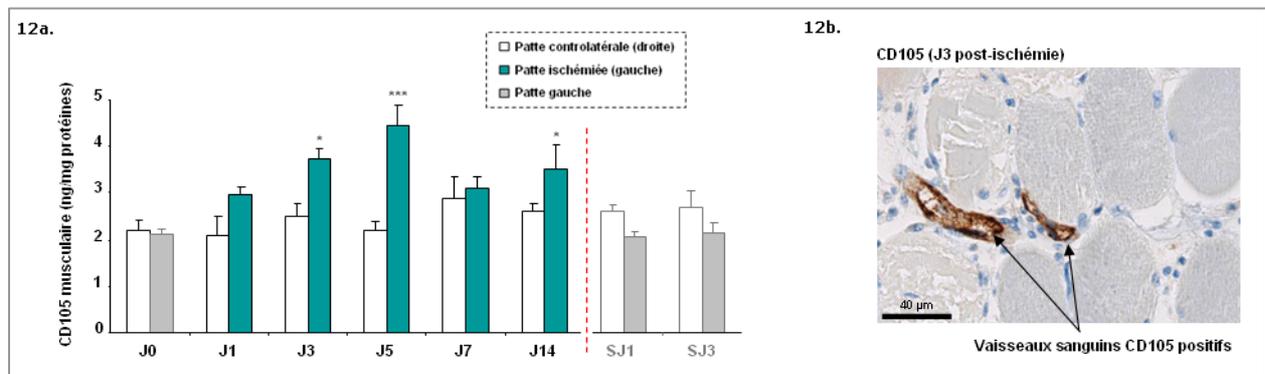
DO : densité optique, J0 : souris non opérées, S : sham, sem : standard error of mean.

L'augmentation de la lactémie des souris ischémisées met en évidence un changement de métabolisme des muscles qui en réponse à la privation en oxygène utiliseraient l'anaérobie lactique comme voie énergétique préférentielle. Ce changement du statut métabolique est de plus associé à une inflammation systémique et musculaire. Elle est caractérisée au niveau sanguin par l'augmentation du nombre de leucocytes et des taux de la chimiokine pro-inflammatoire MCP-1, et au niveau des muscles de la cuisse par l'infiltration de macrophages qui sont mobilisés autour des fibres musculaires. Les modifications environnementales consécutives à l'ischémie sont à l'origine des mécanismes compensatoires mis en jeu pour promouvoir la revascularisation, nous avons donc complété la caractérisation de notre modèle en suivant la fonctionnalité de la régénération vasculaire qui est à l'origine de la reperfusion post-ischémique observée par imagerie Doppler.

2-5 Activité angiogénique

Nous avons dosé au niveau des muscles de la cuisse la protéine CD105 (endogline) qui est une protéine membranaire fortement exprimée pendant la croissance vasculaire par les cellules endothéliales activées et qui sert de récepteur auxiliaire au TGF- β ⁷¹ (facteur de croissance qui favorise la maturation vasculaire en participant à la stabilisation des vaisseaux sanguins néoformés). La quantité de CD105 (normalisée par rapport à la quantité de protéines

totales des échantillons) augmente au niveau des muscles de la cuisse de la patte ischémisée par rapport aux muscles controlatéraux pendant les 14 jours qui font suite à l'interruption du flux sanguin fémoral (Figure 12a). Elles sont significativement différentes des souris non opérées ($2,13 \pm 0,11$ ng/mg de protéines, J0) après 3 jours ($3,73 \pm 2,15$ ng/mg de protéines, $p = 0,0112$), 5 jours ($4,44 \pm 0,46$ ng/mg de protéines, $p = 0,0004$) et 14 jours d'ischémie ($3,50 \pm 0,54$ ng/mg de protéines, $p = 0,032$). Le geste chirurgical n'a pas d'influence sur l'augmentation des taux de CD105 car on n'observe pas de différence significative entre les quantités de CD105 des muscles de la cuisse gauche des souris sham (J1 et J3) et des souris non opérées. Le marquage immunohistochimique réalisé sur des coupes de muscles de la cuisse de souris ischémisées (J3) montre que la protéine CD105 (marquage brun) a une localisation vasculaire qui confirme que les variations observées sont spécifiques de l'activation des cellules endothéliales (Figure 12b).



Figures 12 : a- Suivi de la quantité de CD105 musculaire (cuisse). Dosage ELISA, ng/mg de protéines \pm sem. ANOVA un facteur : * : $p < 0,05$; et *** : $p < 0,001$ pour la comparaison versus J0 ($n=4$ déterminations par groupe, pour sham $n=3$). b- Localisation de la protéine CD105 au niveau des muscles de la cuisse (J3 post-ischémie). Coupes transversales, immunohistochimie avec un anticorps anti-CD105 et contre coloration hématoxyline.

J0 : souris non opérées, S : sham, sem : standard error of mean

2-6 Fonctionnalité de la revascularisation

L'injection intraveineuse d'isolectine fluorescente (protéine qui se fixe à la surface des cellules endothéliales) nous permet d'apprécier la fonctionnalité de la vascularisation grâce à la visualisation en microscopie confocale de la fluorescence observée sur des sections de muscles de la cuisse et du mollet de la patte ischémisée. Nous observons ainsi que la ligature de l'artère fémorale entraîne la perte de fonctionnalité que d'une partie du réseau vasculaire des muscles de la cuisse. En effet, la détection de vaisseaux sanguins qui sont positifs pour l'isolectine (marquage fluorescent vert) dès le premier jour post-ischémie traduit une perfusion résiduelle (Figure 13). L'augmentation du nombre des vaisseaux sanguins de petite taille en fonction du temps de récupération met en évidence une néovascularisation dépendante de l'angiogenèse. La détection de vaisseaux sanguins fonctionnels de diamètre plus important après 7 et 14 jours

d'ischémie présage quant à elle d'une néovascularisation dépendante de l'artériogénèse. Contrairement aux muscles de la cuisse, les vaisseaux sanguins des muscles du mollet ne sont plus fonctionnels après l'interruption du flux sanguin fémoral. L'irrigation des muscles par des vaisseaux de petit calibre ne commence à être observée qu'après une semaine d'ischémie. Après 14 jours, la revascularisation fonctionnelle des muscles du mollet est moins importante que celle des muscles de la cuisse.

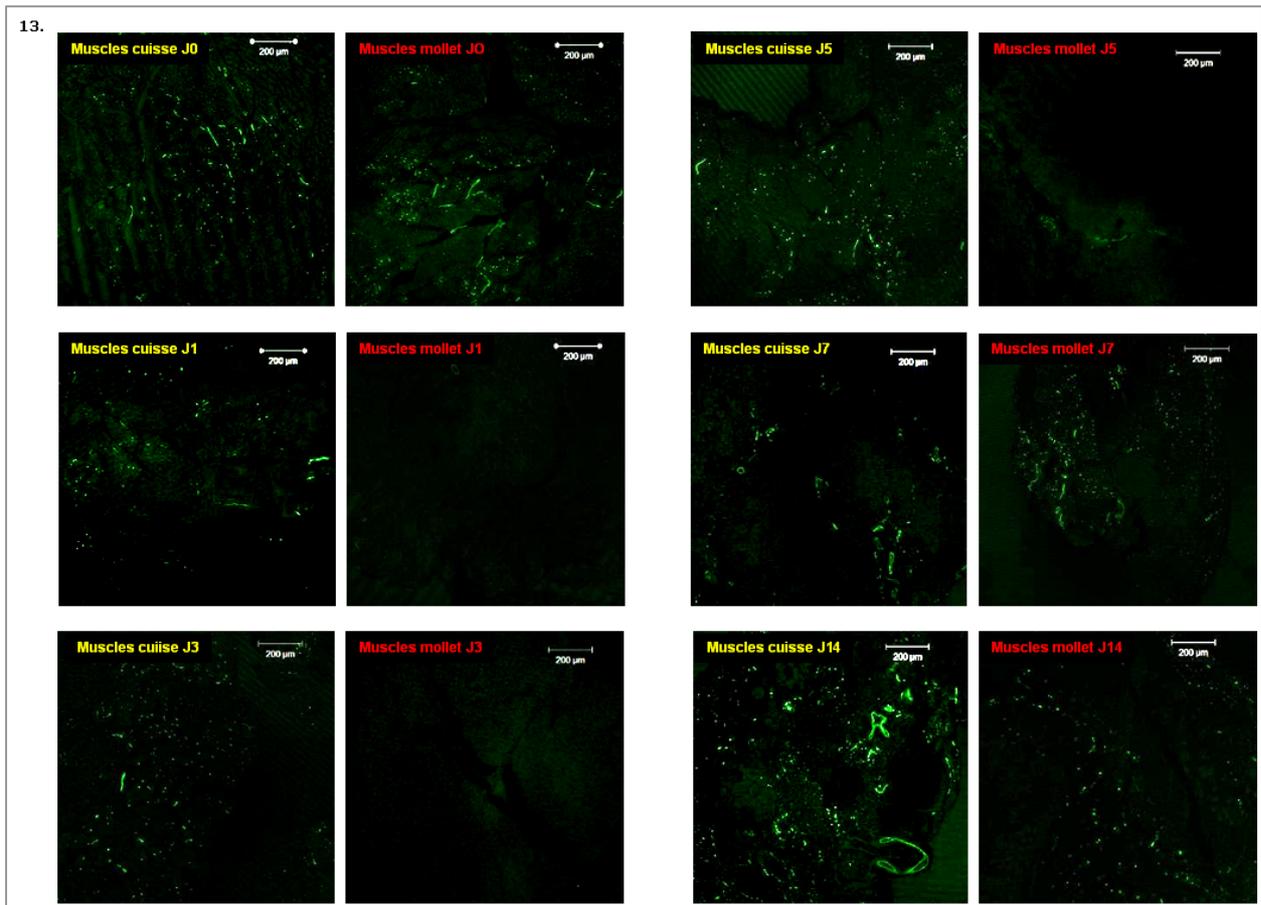


Figure 13 : Revascularisation post-ischémique fonctionnelle des muscles de la cuisse et du mollet. Coupes transversales, imagerie en microscopie confocale après l'injection intraveineuse d'isolectine fluorescente (conjuguée Alexa Fluor® 488).

La reperfusion post-ischémique de notre modèle est reproductible et modérée. Elle est de plus associée à une néovascularisation fonctionnelle qui est plus importante pour les muscles de la cuisse que du mollet. L'augmentation du nombre de vaisseaux sanguins de petite taille (cuisse et mollet) et la présence de vaisseaux de gros diamètre (cuisse) montre que, comme chez l'Homme, les processus d'angiogénèse et d'artériogénèse participent à la revascularisation de notre modèle murin d'AOMI. Dans la perspective d'un projet en thérapie cellulaire, nous avons vérifié l'implication du processus de vasculogénèse pendant la régénération vasculaire post-ischémique chez la souris.

2-7 Mise en évidence de la vasculogénèse chez la souris

Pour vérifier l'implication du processus de vasculogénèse pendant la revascularisation post-ischémique chez la souris nous avons envisagé deux approches expérimentales. Dans un premier temps, nous avons utilisé notre modèle d'AOMI développé chez les souris Balb/c nude pour étudier le phénotype des MNCs isolées à partir de sang périphérique (PB-MNCs) et mettre en évidence la présence d'EPCs. Comme le mécanisme de vasculogénèse est difficile à mettre en évidence, nous avons fait appel dans un second temps, à un modèle de xénogreffes pour discriminer les cellules venant de la moelle osseuse (humaines) de celles qui résident localement dans les tissus (murines). Nous avons ainsi transposé notre modèle d'AOMI chez des souris NOD/SCID/IL2R $\gamma^{-/-}$ (NSG) qui possèdent une moelle osseuse constituée de cellules souches hématopoïétiques humaines. La génération de cette souche (NSGh) est détaillée en Annexe 1.

2-7-1 Identification des EPCs chez les souris Balb/c nude

La morphologie des PB-MNCs adhérentes cultivées pendant 7 jours dans des conditions optimisées est étudiée après coloration au May Grünwald Giemsa (MGG). Nous avons choisi en parallèle d'identifier les EPCs en fonction de leur capacité à incorporer le LDL acétylé et à fixer l'isolectine sur leur membrane plasmique.

La coloration MGG est initialement prévue pour mettre en évidence les cellules sanguines sur frottis de sang. Nous l'avons utilisée dans nos expérimentations pour avoir une idée de la morphologie des PB-MNCs (Figure 14). Après 7 jours de culture, on observe trois types cellulaires distincts parmi les PB-MNCs adhérentes. La présence de cellules arrondies et des cellules avec un cytoplasme plus important et irrégulier pourrait être caractéristique de cellules immunitaires telles que des monocytes ou des macrophages (car nos conditions de culture ne sont pas favorables à la survie des lymphocytes). Mais de façon intéressante, on observe des cellules fusiformes pouvant être apparentées à des EPCs précoces²⁶.

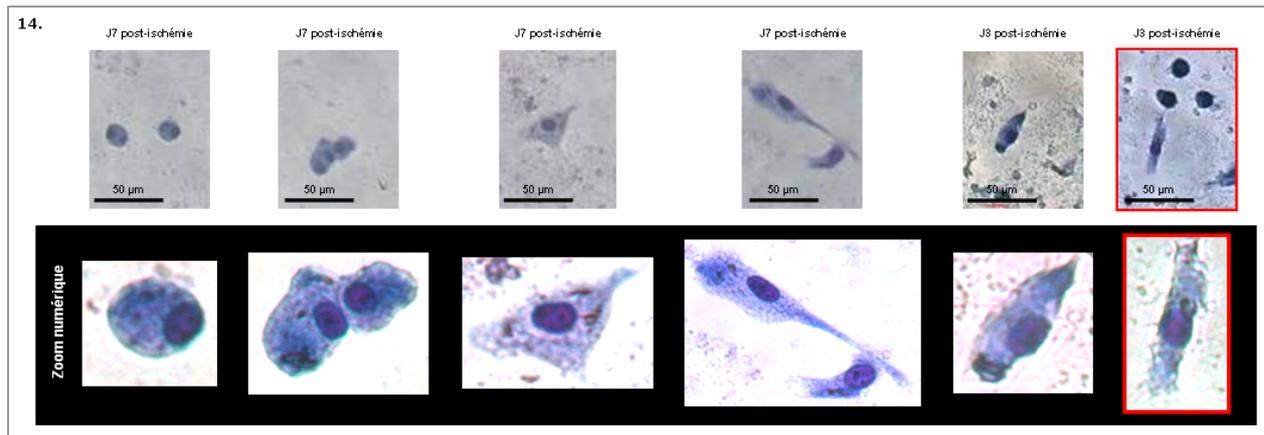


Figure 14 : Identification morphologique des PB-MNCs adhérentes après 7 jours de culture. Coloration au May Grünwald Giemsa. *Notons que les conditions de prise de vue qui ne sont pas optimales à cause de la faible épaisseur du fond en verre de la plaque de culture qui est prévue pour l'imagerie en fluorescence et qui rend ainsi difficile la mise au point en imagerie visible.*

PB-MNCs : peripheral blood mononuclear cells.

Pour l'analyse du phénotype des PB-MNCs en fluorescence, les cellules sont repérées via la détection de leur noyau grâce à un agent intercalant de l'ADN, le Hoechst 33342 (bleu). Contrairement à nos attentes, la totalité des PB-MNCs incorporent le LDL acétylé (orange, cytoplasmique) et fixent l'isoelectine (vert, membranaire). Il nous est donc pas possible de discriminer les EPCs parmi les PB-MNCs adhérentes après 7 jours de culture. Néanmoins nous confirmons la présence d'une population cellulaire hétérogène qui comprend des cellules fusiformes pouvant être apparentées à des EPCs (Figure 15). Cependant, le faible nombre de PB-MNCs adhérentes ne nous permet pas de réaliser une analyse quantitative.

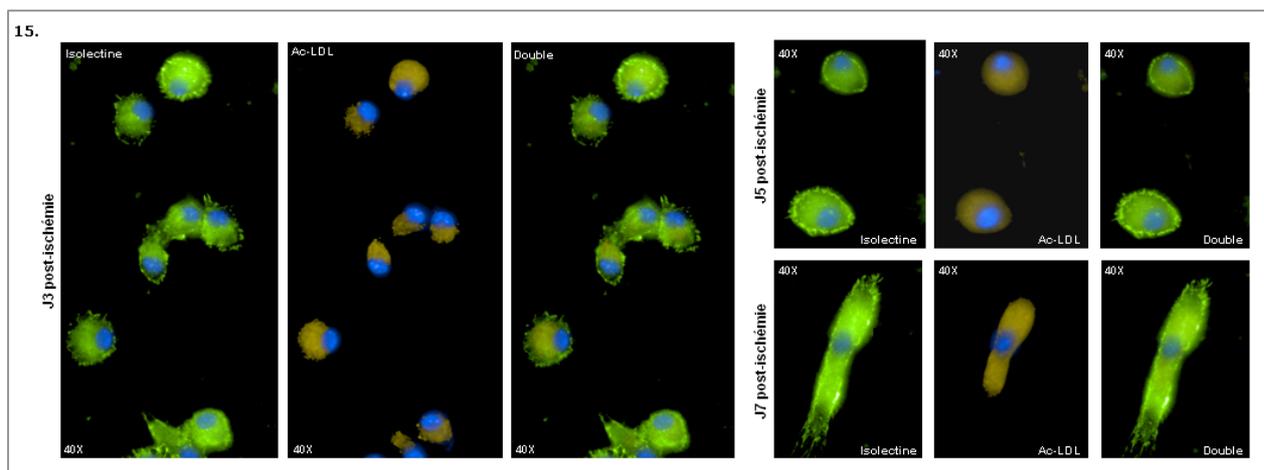


Figure 15 : Imagerie fluorescente des PB-MNCs adhérentes après 7 jours de culture. Incorporation de l'Ac-LDL (Dil : orange), fixation membranaire de l'isoelectine (fluorescéine : vert) et détection des noyaux (Hoechst 33342 : bleu).

Ac-LDL : LDL acétylé, Dil : 1,1'-dioctadécyl-3,3',3'- tetraméthylindocarbocyanine perchlorate, PB-MNCs : peripheral blood mononuclear cells.

2-7-2 Souris NSG humanisées

L'ischémie est induite par ligature de l'artère fémorale chez des souris NSG humanisées (NSGh) mâles et femelles de 14 semaines. La reperfusion post-ischémique est suivie pendant 14 jours, au terme desquels les muscles de la cuisse sont prélevés pour étudier la mobilisation des cellules humaines. La technique d'hybridation *in situ* (ISH) utilisant une sonde spécifique des séquences ALU (courts fragments d'ADN propres au génome humain) nous permet d'identifier les cellules humaines au sein des tissus murins. La spécificité de la sonde ALU a été validée sur des coupes de moelle osseuse des souris humanisées qui montrent des cellules ALU+ (cellules bleu foncé) qui ne sont pas détectées dans la moelle osseuse des souris NSG sauvages (Figure 16). L'ISH avec la sonde ALU sur des coupes de muscles de la cuisse de souris NSGh ischémiées depuis 14 jours permet de mettre en évidence le recrutement de cellules humaines en réponse à l'ischémie (Figure 16). Cette mobilisation s'effectue spécifiquement dans la zone ischémiée car on ne détecte pas de cellules humaines au niveau des muscles de la patte non opérée (muscles controlatéraux). Les cellules humaines recrutées sont également marquées par un anticorps qui reconnaît la forme humaine de la protéine CD105 (marquage marron). Ces résultats montrent que les cellules humaines recrutées sur le site d'ischémie ont un phénotype endothélial et participent au processus de vasculogénèse.

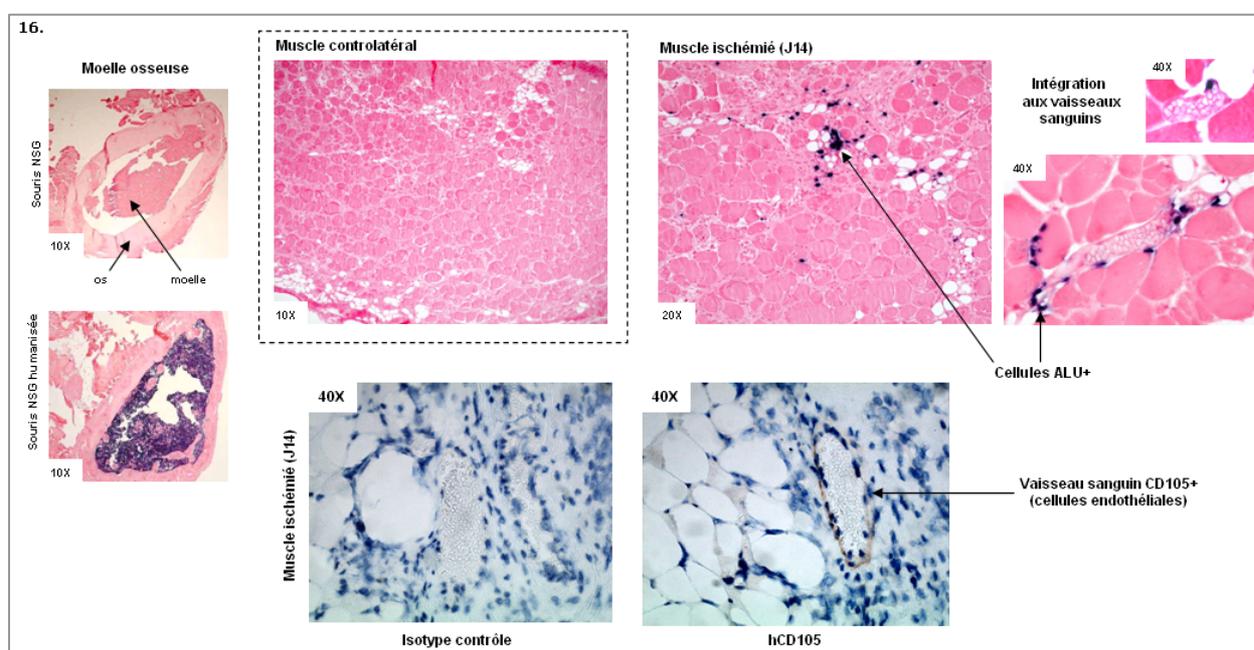


Figure 16 : Implication de la vasculogénèse dans la régénération vasculaire post-ischémique des souris NSG humanisées. Coupes transversales de muscles de la cuisse, hybridation *in situ* avec une sonde ALU et immunohistochimie avec un anticorps anti-hCD105.

NSG : NOD/SCID/IL2R γ ^{-/-}.

Au même titre que l'angiogenèse et l'artériogenèse, le processus de vasculogenèse est impliqué pendant la régénération vasculaire chez la souris. La ligature de l'artère fémorale chez les souris Balb/c nude permet de développer un modèle d'AOMI relevant des conditions de revascularisation observées chez l'Homme. La reperfusion post-ischémique reproductibles et modérés de notre modèle d'AOMI autorise la mise en évidence du bénéfice thérapeutique de la stimulation de la néovascularisation.

Partie 2 : Evaluation du bénéfice thérapeutique de la stimulation de la voie FGF.

Nous avons ainsi choisi d'évaluer le potentiel pro-angiogénique d'un agoniste de synthèse des récepteurs au FGF : le SAR X (Annexe 2). Le SAR X est capable d'induire la dimérisation du FGFR-4, son activation et l'activité angiogénique qui en dépend sur des modèles *in vitro* (cellules HUVECs en culture) et *in vivo* (modèle d'implant sous-cutané chez la souris). Les thérapies pro-angiogéniques sont cependant considérées par la FDA (Food and Drug Administration) comme pouvant avoir des effets pro-cancéreux via la promotion de la vascularisation tumorale. Le SAR X montre une forte affinité pour le FGFR-4 et une faible reconnaissance du FGFR-1. A faible dose, il présente donc l'avantage d'être spécifique du FGFR-4 sans activer la prolifération cellulaire qui est dépendante du FGFR-1 et qui serait susceptible de participer au développement des tumeurs. De plus, nous avons réalisé une étude de biodisponibilité du SAR X pour définir un schéma de traitement qui limite l'exposition au produit. Dans ces conditions d'administrations optimisées, nous avons évalué le bénéfice thérapeutique du SAR X vis-à-vis de la survie et de la fonctionnalité de la reperfusion post-ischémique de notre modèle.

Le SAR X est administré par voie intramusculaire (i.m) au niveau des muscles postérieurs de la cuisse. Il est évalué sur notre modèle en association avec un anticoagulant : l'idrabioparinux, pour se rapprocher des conditions cliniques, mais surtout pour optimiser la mesure de la reperfusion post-ischémique distale en limitant la formation de microthrombi qui pourraient biaiser la détermination du flux sanguin mesurée par imagerie Doppler. L'idrabioparinux (issu de la synthèse chimique Sanofi-Aventis) est un inhibiteur du facteur Xa qui est un facteur de la coagulation impliqué dans la transformation de la prothrombine en thrombine, qui transforme elle-même le fibrinogène en fibrine. Il a été retenu car il présente une bonne biodisponibilité et une bonne durée de vie chez la souris (1 jour). De plus, ne représentant pas une fraction

d'héparine, il n'est pas susceptible d'interagir avec le système FGF-FGFR. L'idrabiotaparinux est injecté (5 jours/semaine), pendant 21 jours, par voie sous-cutanée dans la région interscapulaire. La dose de 300 nmol/kg/jour a été déterminée en fonction de données internes au service (études de pharmacocinétique et évaluation sur un modèle pharmacologique permettant d'apprécier son bénéfice vis-à-vis de la réduction du temps de saignement).

1- Etude de biodisponibilité du SAR X

Le SAR X (1 mg/kg) et l'idrabiotaparinux sont respectivement administrés par voie i.m et s.c deux heures après la ligature de l'artère fémorale chez des souris Balb/c de 10 semaines. L'étude de la biodisponibilité est réalisée sur des souris Balb/c car cette souche, au demeurant moins onéreuse, sert de fond génétique aux souris nude que nous avons sélectionnées pour nos études. L'idrabiotaparinux est injecté quotidiennement pendant les 5 premiers jours de l'étude. Les muscles de la cuisse, les muscles du mollet et le plasma sont prélevés 1 heure, 24 heures, 72 heures, 96 heures et 168 heures après l'injection.

Suite à l'injection intramusculaire de SAR X, les plus fortes concentrations en produit (C_{max}) sont retrouvées au bout d'une heure pour les muscles de la cuisse (42100 ng/g) et le plasma (504 ng/mL), et après 24 heures pour les muscles du mollet (8430 ng/g) (Tableau 1). La détermination de l'aire sous la courbe (AUC) des concentrations tissulaires de SAR X en fonction du temps de prélèvement traduit une importante biodisponibilité du SAR X au niveau des muscles de la cuisse (3200000 ng/h/g) et du mollet (1000000 ng/h/g) avec un passage systémique négligeable (6400 ng/h/mL). Une semaine après l'injection, le SAR X est toujours détecté dans les muscles (t_{max} de 168 heures), mais n'est plus retrouvé dans la circulation après 3 jours (t_{max} de 72 heures).

Matrix	C_{max} (ng/mL or /g)	t_{max} (h)	AUC (0-last) (ng.h/mL or /g)	t_{last} (h)	AUC (0-inf) (ng.h/mL or /g)	tissue/plasma AUC _{0-last} ratio	tissue/plasma AUC _{0-inf} ratio
Plasma	504	1	6400	72	NC	NA	NA
Calf	8430	24	1000000	168	NC	156	NC
Thigh	42100	1	3200000	168	NC	500	NC

Tableau 1 : Pharmacocinétique tissulaire du SAR X (1 mg/kg) après son injection intramusculaire (cuisse). Souris Balb/c de 10 semaines. Déterminations réalisées sur 3 animaux par temps de prélèvement (0, 24, 72, 96 et 168 heures) au niveau des muscles de la cuisse, des muscles du mollet et du plasma. Pour les muscles expression des résultats en ng/g ou ng/h/g, pour le plasma expression des résultats en ng/mL ou ng/h/mL.

AUC : area under curve, calf : mollet, NC : not calculated, NA : not applicable, thigh : cuisse, t_{last} : last detection time, t_{max} : maximal detected concentration time.

Les données pharmacocinétiques du SAR X montrent qu'une administration intramusculaire (cuisse) à la dose de 1 mg/kg permet d'avoir une couverture thérapeutique d'une semaine au niveau des muscles de la cuisse et du mollet sans diffusion systémique. Dans le souci de limiter l'exposition au produit, nous avons choisi d'administrer le SAR X (1 mg/kg) en raison d'une fois par semaine pendant 14 jours : après la ligature de l'artère fémorale, puis après 7 et 14 jours.

2- Evaluation du SAR X

Le SAR X est administré par voie i.m une fois par semaine aux doses de 0,3 mg/kg et de 1 mg/kg pendant les 14 jours (J0, J7 et J14) qui suivent la ligature de l'artère fémorale chez des souris Balb/c nude de 10 semaines. La dose de 0,3 mg/kg a été évaluée car les importantes concentrations tissulaires déterminées lors de l'étude de biodisponibilité avec le SAR X à 1 mg/kg laissent penser qu'une dose plus faible pourrait également présenter une bonne distribution tissulaire, et ainsi montrer une activité biologique avec une exposition encore plus réduite. Un groupe expérimental de souris Balb/c nude traitées avec le véhicule du SAR X fait office de groupe témoin. L'ensemble des souris reçoivent une injection d'idrabiotaparinux (300 nmol/kg, s.c) pendant 21 jours, sauf le week-end.

2-1 Analyse macroscopique

2-1-1 Evolution pondérale

Les souris sont randomisées en fonction de leur poids au début de l'étude : $23,0 \pm 0,5$ g (véhicule + idrabiotaparinux), $22,4 \pm 0,5$ g (SAR X 0,3 mg/kg + idrabiotaparinux) et $22,9 \pm 0,4$ g (SAR X 1 mg/kg + idrabiotaparinux). La perte de poids après 7 jours d'ischémie n'est pas différente quelque soit le groupe expérimental (environ 2%), et le gain de poids après 28 jours (environ 8%) n'est pas non plus différent (Figure 17).

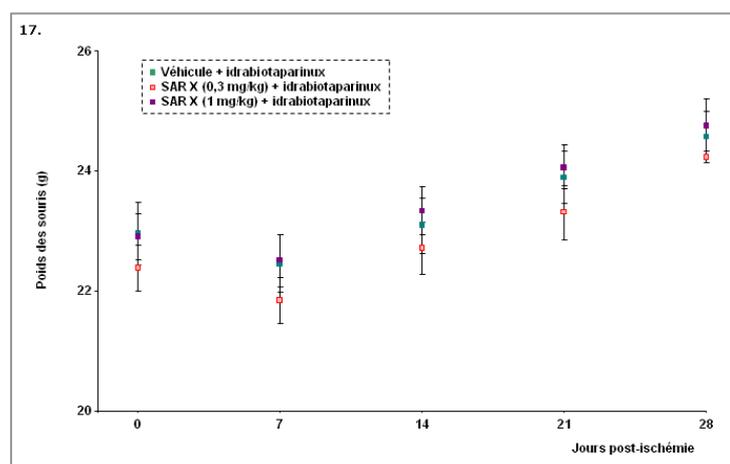


Figure 17 : Evolution pondérale post-ischémique. g ± sem. Véhicule + I (n=11), SAR X 0,3 mg/kg + I (n=12) et SAR X 1 mg/kg + I (n=12).

I : idrabiotaparinux, sem : standard error of mean.

2-1-2 Survie de la patte ischémique

Nous avons vérifié visuellement (pendant le traitement et lors des prélèvements) que l'injection intramusculaire du SAR X, ou de son véhicule, n'entraîne pas de conséquences délétères sur le muscle. Les altérations nécrotiques de la patte sont modérées, la majorité des souris ne présentent pas de nécroses pendant les 28 jours qui suivent la ligature de l'artère fémorale (Figure 18). Des nécroses des ongles et des doigts sont observées après une semaine chez les souris des groupes véhicule (ongles 18% et doigts 9%) ou traitées avec le SAR X à 0,3 mg/kg (ongles 8,5% et doigts gonflés 8,5%) alors que les souris traitées avec le SAR X à 1 mg/kg présentent des nécroses qui ne dépassent pas le niveau des ongles (8%). Les altérations nécrotiques restent relativement stables pendant les trois semaines suivantes. Après 28 jours, les nécroses ne dépassent pas le stade des doigts gonflés chez les souris témoin ou traitées avec le SAR X à 0,3 mg/kg avec respectivement 9% et 17% des animaux atteints. Les souris traitées avec le SAR X à 1 mg/kg présentent quant à elles des altérations nécrotiques qui ne dépassent toujours pas le niveau des ongles (17%).

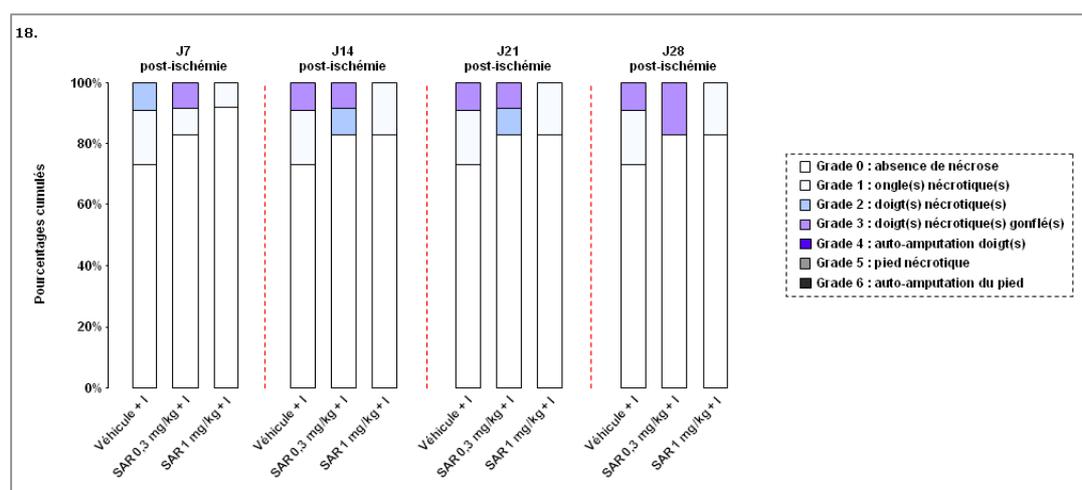


Figure 18 : Estimation de la survie de la patte ischémique. Incidence et hiérarchisation des nécroses de la patte en fonction de leur sévérité. Pourcentages cumulés de chaque grade de nécrose. Analyse descriptive. Véhicule + I (n=11), SAR X 0,3 mg/kg + I (n=12) et SAR X 1 mg/kg + I (n=12).

I : idrabiotaparinus.

2-2 Analyse fonctionnelle

2-2-1 Reperfusion post-ischémique

Le profil de reperfusion des différents groupes expérimentaux est comparable pendant les 14 premiers jours qui suivent la ligature de l'artère fémorale (Figure 19). Après 21 jours, soit une semaine après l'arrêt du traitement, les souris ayant été traitées avec le SAR X 1 mg/kg montrent

une reperfusion post-ischémique améliorée par rapport aux souris du groupe véhicule : $46,6 \pm 4,5$ % contre $38,3 \pm 3,2$ % ($p = 0,069$). Le SAR à 0,3 mg/kg n'a pas d'effet sur la reperfusion quelque soit le temps de régénération post-ischémie.

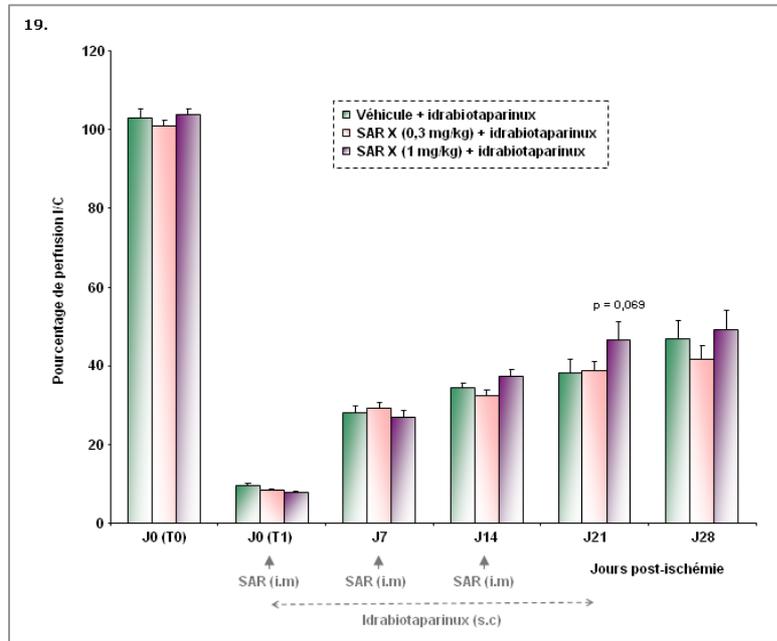


Figure 19 : Suivi de la reperfusion distale post-ischémique par imagerie Doppler. Pourcentage de perfusion I/C \pm sem. Test ANCOVA 2 facteurs avec mesures répétées sur le facteur temps. Véhicule + I (n=9), SAR X 0,3 mg/kg + I (n=10) et SAR X 1 mg/kg + I (n=12).

I : idrabiotaparinux, i.m : intramusculaire, J0(T0) : mesure avant l'opération, J0(T1) : mesure juste après l'induction de l'ischémie, s.c : sous-cutanée, sem : standard error of mean.

2-2-2 Activité angiogénique

La quantité de CD105 musculaire (normalisée par rapport à la quantité de protéines totales des échantillons) augmente dans le muscle de la cuisse 28 jours après l'induction de l'ischémie quelque soit le groupe expérimental (Figure 20). L'augmentation par rapport aux muscles controlatéraux est plus importante chez les souris traitées avec le SAR X 1mg/kg (+ 66%) que chez les souris du groupe véhicule (+ 51%) ou que chez les souris traitées avec le SAR X 0,3 mg/kg (+ 37%).

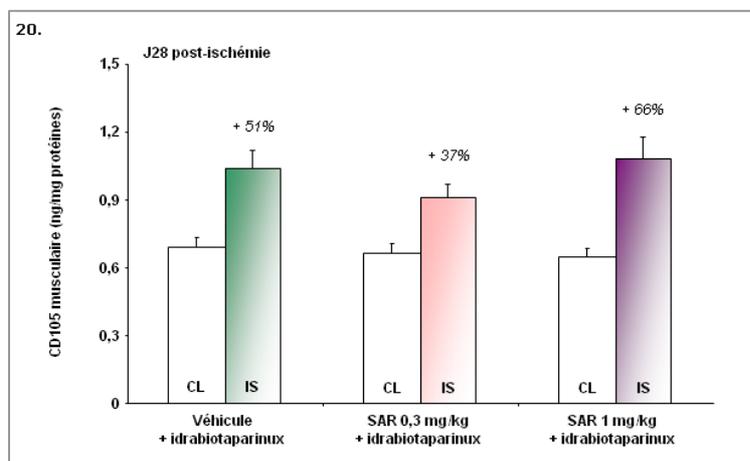


Figure 20 : Quantité de CD105 musculaire après 28 jours d'ischémie (cuisse). Dosage ELISA, pg/mg de protéines \pm sem. Véhicule + I (n=6), SAR X 0,3 mg/kg + I (n=7) et SAR X 1 mg/kg + I (n=7).

CL : muscles controlatéraux, I : idrabiotaparinux, IS : muscles ischémisés, sem : standard error of mean.

Le niveau d'induction de CD105 au niveau des muscles de la cuisse des souris traitées avec le SAR X (1mg/kg) montre une augmentation de l'activité angiogénique locale qui pourrait traduire une meilleure maturation, et ainsi, fonctionnalité de la néovascularisation produite. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé un deuxième protocole expérimental (même schéma de traitement) focalisé sur la dose de 1 mg/kg et qui intègre, en plus d'un groupe contrôle (véhicule), un groupe de souris non traitées

2-2-3 Fonctionnalité de la revascularisation

Au cours de ce nouveau protocole d'évaluation du SAR X (1 mg/kg, i.m) la récupération du flux sanguin distal des souris Balb/c nude est suivie pendant les 35 jours qui font suite à la ligature de l'artère fémorale. Les souris traitées avec le véhicule du SAR X et l'idrabiotaparinux font office de groupe contrôle. Les souris non traitées permettent dans un premier temps de valider que la voie d'administration (i.m) n'entraîne pas d'augmentation de la vitesse et du niveau de reperfusion des souris via une voie indépendante de l'activation du récepteur FGFR-4 par le SAR X (composante inflammatoire pro-angiogénique). Par ailleurs, les souris non traitées permettent également de vérifier que l'idrabiotaparinux et/ou le véhicule du SAR X ne stimulent pas la revascularisation.

Quelque soit le temps de récupération, la reperfusion des souris du groupe véhicule n'est pas différente de celle des souris non traitées (Figure 21). La voie d'injection intramusculaire, tout comme l'idrabiotaparinux et le véhicule du SAR X, n'influencent pas la cinétique de reperfusion de notre modèle. Le SAR X (1 mg/kg) améliore le rétablissement du flux sanguin distal après 28 jours d'ischémie, soit 14 jours après la dernière injection : $64,9 \pm 4,3$ % contre $46,4 \pm 7,4$ % pour les souris du groupe véhicule ($p = 0,039$). Nous avons donc choisi de continuer le suivi de la reperfusion jusqu'au 35^{ème} jour pour s'assurer de la pérennité de la revascularisation produite. Nous voyons ainsi que le bénéfice du SAR X vis-à-vis de la revascularisation reste effectif pendant cette semaine supplémentaire (statistiques descriptives). Les néovaisseaux sont toujours fonctionnels 3 semaines après l'arrêt du traitement. Notons que le SAR X (1 mg/kg) montre une tendance non significative à l'amélioration du ratio I/C à partir du 14^{ème} jour qui suit la ligature de l'artère fémorale.

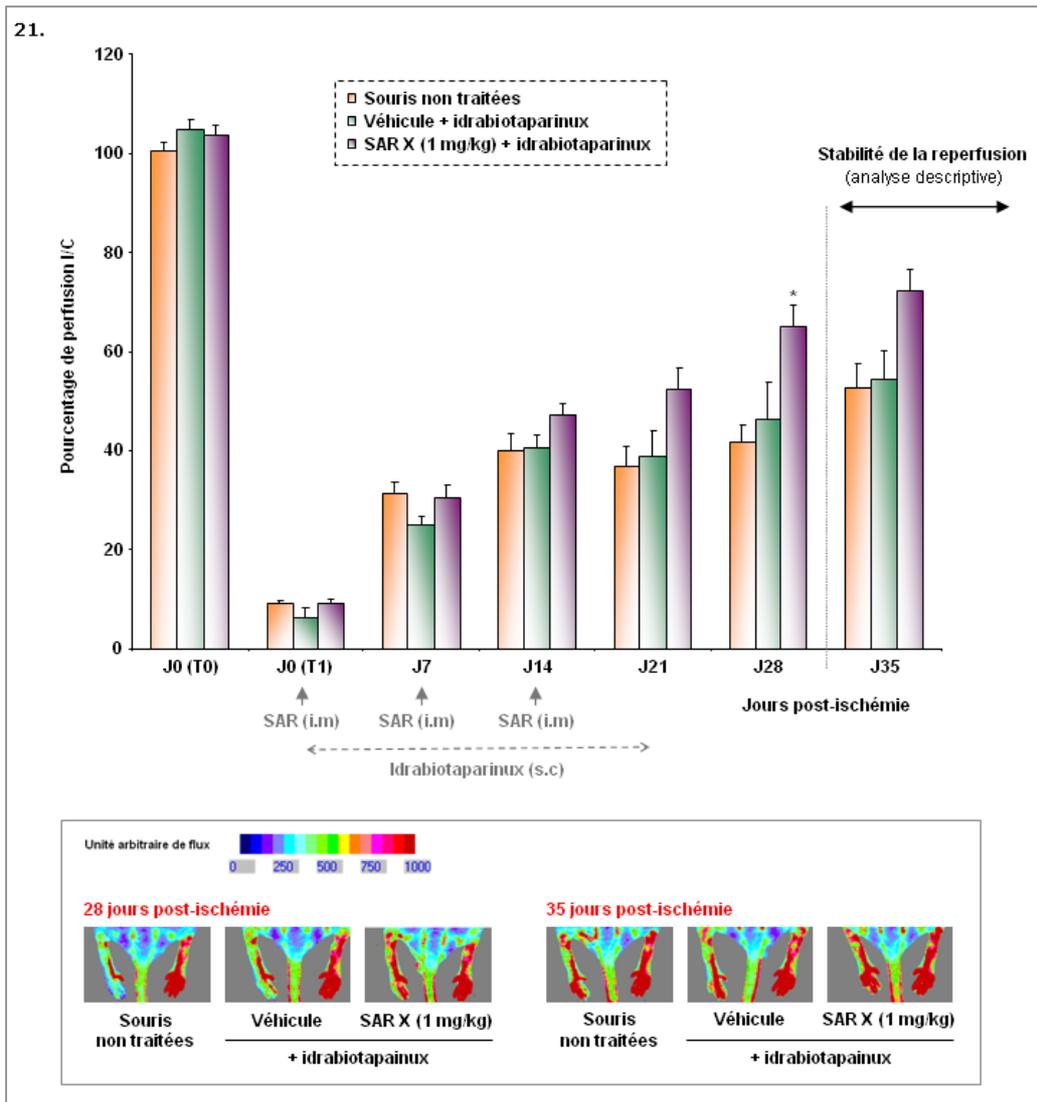


Figure 21 : Suivi de la reperfusion distale post-ischémique par imagerie Doppler. Etude de stabilité de la néovascularisation. Pourcentage de perfusion I/C \pm sem. Test ANCOVA deux facteurs avec mesures répétées sur le facteur temps : * : $p < 0,05$ pour la comparaison versus véhicule + I. Souris non traitées (n=6), véhicule + I (n=4) et SAR X 1 mg/kg + I (n=6).

I : idrabiotaparinux, i.m : intramusculaire, J0(T0) : mesure avant l'opération, J0(T1) : mesure juste après l'induction de l'ischémie, s.c : sous-cutanée, sem : standard error of mean.

Nous avons mis en évidence l'innocuité et l'efficacité d'un traitement local avec un agoniste des récepteurs FGFR-4 vis-à-vis de la stimulation de la régénération vasculaire. Le SAR X diminue l'incidence et la sévérité des nécroses de la patte et il stimule la revascularisation post-ischémique de notre modèle d'AOMI. L'amélioration de la reperfusion observée au 28^{ème} jour, soit deux semaines après la dernière administration, reste effective jusqu'au 35^{ème} jour, montrant ainsi que la néovascularisation produite reste fonctionnelle 3 semaines après l'arrêt du traitement.

Partie 3 : Evaluation du bénéfice thérapeutique de la greffe d'EPCs.

Nous avons évalué le bénéfice thérapeutique de l'administration d'EPCs vis-à-vis de la régénération post-ischémique de notre modèle d'AOMI développé chez les souris Balb/c nude. Nous avons administré tout d'abord des EPCs pour regarder leur mobilisation sur le site d'ischémie et leur capacité à intégrer les vaisseaux sanguins en croissance. L'autre objectif étant d'évaluer leur capacité à promouvoir la régénération vasculaire. Après avoir vérifié leur phénotype indifférencié et déterminé la meilleure voie d'administration, nous avons évalué leur potentiel thérapeutique vis-à-vis de la protection des atteintes nécrotiques de la patte et de l'amélioration de la reperfusion de la patte ischémisée. L'évaluation parallèle des HUVECs nous permet d'intégrer à nos expérimentations des cellules endothéliales matures (témoin positif).

1- Comparaison phénotypique des EPCs et des HUVECs

Le dosage des ARNm par PCR en temps réel montre peu de différences en termes d'expression des récepteurs au VEGF et au FGF entre les EPCs et les HUVECs (Tableau 2). Les quantités d'ARNm normalisées par rapport à un gène de référence (ici TBP) doivent varier d'une unité logarithmique pour que l'expression de la cible soit considérée comme plus importante pour un type cellulaire que pour un autre. Notons que TBP est un gène moyennement exprimé par les cellules que nous avons évalué, la normalisation qui donne des niveaux d'expression proche de 1 traduit un niveau d'expression moyen de la cible.

	Niveau d'expression des ARNm (UA) – Normalisation par rapport TBP						
	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3	FGFR-1	FGFR-2	FGFR-3	FGFR-4
EPCs	2,83	39,8	7,19	6,55	0,001	0,010	0,24
HUVECs	1,47	33,0	0,50	4,32	0,003	0,009	0,08

Tableau 2 : Profil d'expression des ARNm des récepteurs au VEGF et au FGF pour les EPCs et les HUVECs. Ratio d'expression de la quantité d'ARNm de la protéine cible normalisée par rapport au gène de référence TBP. Dosage en triplicate pour chaque détermination.

EPCs : endothelial progenitor cells, FGFR : fibroblast growth factor receptor, HUVECs : human umbilical vein endothelial cells, TBP : TATA box binding protein, UA : unité arbitraire, VEGFR : vascular endothelial growth factor receptor.

Les ARNm des récepteurs au VEGF (VEGFR1, VEGFR-2 et VEGFR-3) sont aussi bien détectés pour les EPCs que pour les HUVECs. Indépendamment du type cellulaire, le VEGFR-2 semble être plus exprimé que les autres isoformes. L'expression du VEGFR-3 est quant à elle plus importante pour les EPCs que pour les HUVECs (ratio de 7,19 contre 0,50). Le récepteur VEGFR-3 est spécifiquement exprimé sur les cellules endothéliales lymphatiques. Il est initialement exprimé par les progéniteurs endothéliaux qui sont communs aux lignées

endothéliales lymphatiques et vasculaires, puis il demeure seulement exprimé lors de leur différenciation en cellules endothéliales lymphatiques.

Les EPCs et les HUVECs présentent majoritairement les isoformes 1 et 4 des récepteurs au FGF avec une expression majoritaire du FGFR-1. Notons que le FGFR-4 est plus exprimé sur les EPCs (0,24) que sur les HUVECs (0,08).

La présence du VEGFR-3 sur les EPCs met en avant leur phénotype indifférencié par rapport aux HUVECs qui n'a pas été modifié pendant les étapes de culture in vitro. La présence des récepteurs FGFR-1 et FGFR-4 sur les EPCs et les HUVECs confirme l'implication du FGF dans la régulation de l'activité biologique des cellules endothéliales.

2- Sélection de la voie d'administration

Nous avons choisi d'évaluer la tolérance et le bénéfice thérapeutique des EPCs (comparées aux HUVECs) en confrontant deux voies d'injection : la voie intramusculaire (i.m) et la voie intraveineuse (i.v). Les cellules sont administrées un jour après la ligature de l'artère fémorale chez des souris Balb/c nude mâle de 10 semaines. L'injection est réalisée soit dans la veine caudale, soit au niveau des muscles postérieurs de la cuisse. Pour se rapprocher des conditions utilisées en clinique les EPCs sont administrées i.m en plusieurs points d'injection. Des souris injectées avec du PBS (véhicule) servent de groupe témoin. La régénération post-ischémique est suivie pendant 14 jours pour les souris ayant reçues les EPCs ou les HUVECs par voie i.v et pendant 28 jours pour les souris ayant reçues les EPCs par voie i.m.

2-1 Reperfusion post-ischémique

Les EPCs et les HUVECs injectées par voie i.v ou par voie i.m n'améliorent pas la récupération du flux sanguin distal après respectivement 14 ou 28 jours d'ischémie (Figure 22). La similitude des profils de reperfusion post-ischémique des souris ayant reçue une injection de PBS par voie i.v ou par voie i.m montre que l'administration musculaire ne cause pas d'inflammation locale pro-angiogénique : $35,5 \pm 4$ % (i.v) contre $31,8 \pm 2,8$ % (i.m) après 7 jours et $39,1 \pm 7,4$ % (i.v) contre $44,2 \pm 5,8$ % (i.m) après 14 jours. Notons que lors de l'évaluation du SAR X nous avons déjà observé que l'injection i.m n'a pas de répercussion sur la reperfusion post-ischémique de notre modèle.

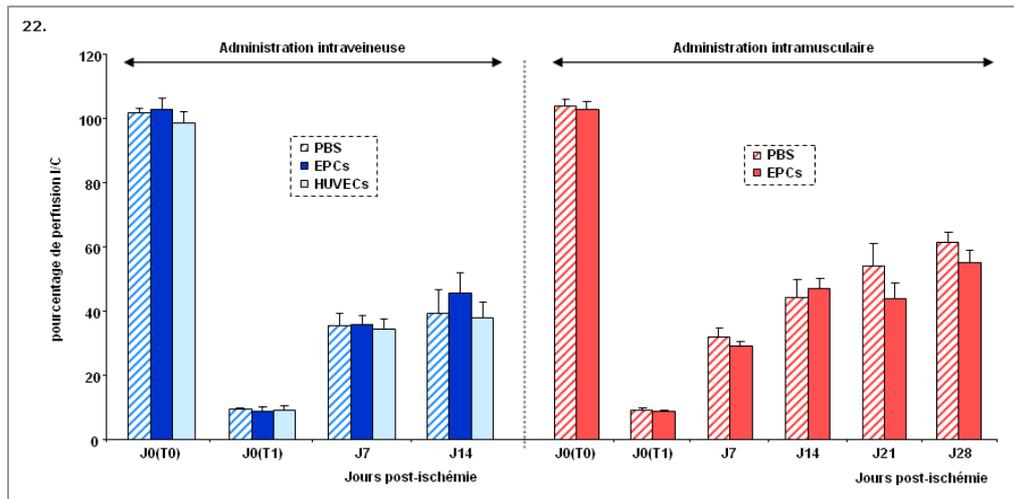


Figure 22 : Suivi de la reperfusion distale post-ischémique par imagerie Doppler. Comparaison des voies d'administration i.v et i.m des EPCs et des HUVECs. Pourcentage de perfusion I/C \pm sem. PBS i.v (n=3), EPCs i.v (n=3), HUVECs i.v (n=3), PBS i.m (n=5) et EPCs i.m (n=5).

EPCs : endothelial progenitor cells, HUVECs : human umbilical vein endothelial cells, i.m : intramusculaire, i.v : intramusculaire, J0(T0) : mesure avant l'opération, J0(T1) : mesure juste après l'induction de l'ischémie, PBS : phosphate buffer saline, sem : standard error of mean.

2-2 Analyse macroscopique

Indépendamment de la voie d'injection utilisée (i.m ou i.v), l'administration des EPCs ou des HUVECs ne modifie pas l'évolution pondérale des souris. Nous avons mesuré le poids de la rate en tant qu'indicateur d'inflammation généralisée. En effet, la rate est un organe lymphoïde secondaire impliqué dans l'immunité cellulaire et dans la régulation de la formation et de la destruction des éléments figurés du sang. Après 14 jours, le poids de la rate des souris pour lesquelles les cellules ont été injectées par voie i.v n'est pas différent de celui des souris contrôles : 115 ± 9 mg (EPCs) et 124 ± 11 mg (HUVECs) contre 117 ± 5 mg pour les souris ayant été injectés avec du PBS. Le poids de la rate n'est pas non plus modifié 28 jours après l'administration des EPCs par voir i.m : 127 ± 7 mg contre 134 ± 8 mg pour les souris ayant été injectés avec du PBS. Au niveau local, l'administration d'EPCs (ou de PBS) par voie i.m ne provoque pas d'effets délétères au niveau de la zone d'injection.

Les EPCs ou les HUVECs administrées par voie i.v ou i.m n'améliorent pas l'incidence et la sévérité des nécroses qui ont néanmoins été peu observées pendant le protocole (elles touchent seulement 15% des animaux et ne dépassent pas le niveau doigts).

2-3 Analyse microscopique

L'analyse structurale des muscles du mollet après la coloration Trichrome de Masson ne montre pas d'effet protecteur des cellules vis à vis de la dégénérescence musculaire. Nous avons utilisé l'ISH avec la sonde ALU pour rechercher les cellules au sein de différents tissus d'intérêt. Les EPCs et les HUVECs ne sont ne sont pas retrouvées au niveau de la rate, confirmant la

bonne tolérance immunitaire déterminée grâce à la mesure de l'organe. Les cellules ne sont pas non plus détectées au niveau des poumons. Les EPCs ou les HUVECs ne sont néanmoins pas retrouvées au niveau de la zone ischémique (muscles de la cuisse). Ainsi, indépendamment de leur stade de différenciation, les cellules de la lignée endothéliale administrées par voie locale (i.m) ou par voie systémique (i.v) n'intègrent pas le réseau vasculaire murin.

Indépendamment de la voie d'administration, les EPCs et les HUVECs sont bien tolérées par notre modèle d'AOMI. Cependant, nous n'avons pas obtenu d'amélioration vis-à-vis de la dégénérescence musculaire (mollet), de la survie de la patte ou encore de la reperfusion distale. Nous avons décidé de poursuivre néanmoins nos études en utilisant la voie i.m, mais en utilisant cette fois une matrice protéique qui ferait office de véhicule trophique et protecteur : le Matrigel® et l'acide hyaluronique.

En effet, les biomatériaux sont des supports de thérapie cellulaire de plus en plus étudiés⁷². Ces approches novatrices visent à associer un matériau (synthétique ou naturel) et une composante cellulaire dans une même architecture tridimensionnelle. Dans le cadre de la régénération du myocarde par exemple, Martens et al ont montré *in vivo* l'efficacité de l'utilisation d'un hydrogel (polymère biocompatible insoluble dans l'eau) pour augmenter la rétention et la survie de cellules souches administrées chez le rat au niveau de la zone lésée⁷³. Par ailleurs, Suuronen et al ont montré que l'incorporation de cellules CD133+ dans une matrice de collagène améliore les capacités vasculogéniques des cellules qui stimulent ainsi plus efficacement la revascularisation d'un modèle d'AOMI développé chez le rat⁷⁴.

3- Injection locale avec l'utilisation de matrices protéiques

3-1 Matrigel®

Nous avons choisi d'utiliser une matrice protéique couramment utilisée au laboratoire : le Matrigel®. Cette matrice qui fige à température corporelle contient différentes protéines de la matrice extracellulaire (60% laminine, 30% collagène IV, 8% entactine, HSPGs), des MMPs et de nombreux facteurs de croissance (dont notamment du TGF- β , du PDGF et de l'EGF). Le Matrigel® contenant les EPCs et les HUVECs est administré un jour après la ligature de l'artère fémorale au niveau des muscles de la cuisse de souris Balb/c nude de 10 semaines. Nous avons évalué pendant 14 jours l'innocuité et le bénéfice thérapeutique de cette approche vis-à-vis de la régénération vasculaire et musculaire.

3-1-1 Reperfusion post-ischémique

Après 14 jours d'ischémie, les EPCs ou les HUVECs n'améliorent pas la récupération du flux sanguin distal de notre modèle d'AOMI : pourcentages de perfusion I/C respectifs de $39,1 \pm 3,8 \%$ et $44,7 \pm 3,8 \%$ contre $37,2 \pm 5,8 \%$ pour les souris ayant reçu que du Matrigel® (Figure 23). Notons que l'injection de Matrigel® n'a pas d'effet sur la reperfusion post-ischémique mesurée par imagerie Doppler. En effet, rappelons que 14 jours après une injection i.m de PBS les souris présentent un pourcentage de perfusion I/C de $44,2 \pm 5,8 \%$.

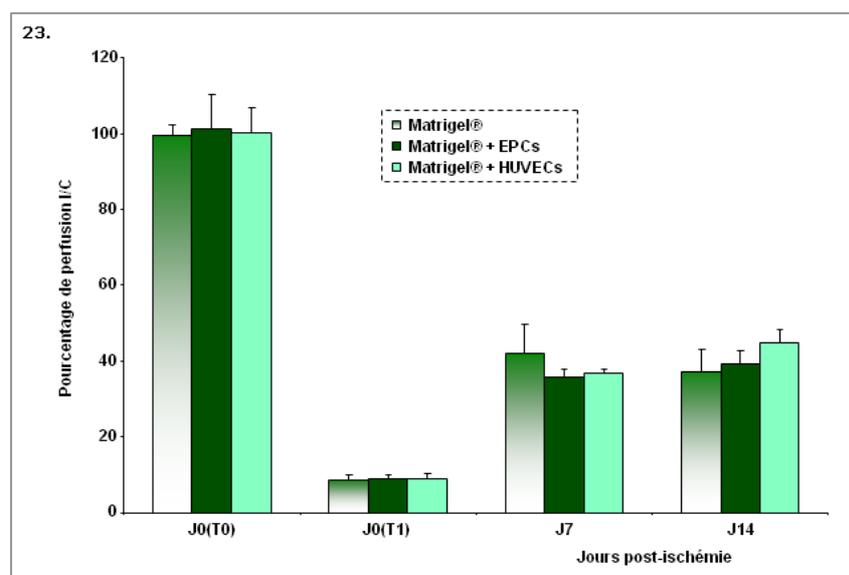


Figure 23 : Suivi de la reperfusion distale post-ischémique par imagerie Doppler. Administration locale des EPCs et des HUVECs avec du Matrigel®. Pourcentage de perfusion I/C \pm sem. Matrigel® (n=3), Matrigel® + EPCs (n=3) et Matrigel® + HUVECs (n=3).

EPCs : endothelial progenitor cells, HUVECs : human umbilical vein endothelial cells, J0(T0) : mesure avant l'opération, J0(T1) : mesure juste après l'induction de l'ischémie, sem : standard error of mean.

3-1-2 Analyse macroscopique

L'administration intramusculaire d'EPCs ou d'HUVECs avec du Matrigel® au niveau des muscles de la cuisse ne modifie pas l'évolution pondérale des souris qui est comparable à celle de souris injectées avec seulement du Matrigel®. L'injection des cellules n'entraîne pas d'inflammation généralisée, le poids de la rate est comparable aux souris injectées avec le Matrigel® : 111 ± 14 mg (Matrigel®+EPCs) et 130 ± 8 mg (Matrigel®+HUVECs) contre 113 ± 10 mg (Matrigel®). Au niveau local, l'administration du Matrigel® (avec ou sans cellules) par voie i.m ne provoque pas d'effets délétères au niveau de la zone d'injection.

Aucune nécrose de la patte n'a été observée pendant les 14 jours d'évaluation de l'administration des EPCs et des HUVECs avec le Matrigel®.

3-1-3 Analyse microscopique

3-1-3-1 Visualisation de la structure des muscles

L'analyse structurale des muscles du mollet après coloration Trichrome de Masson ne montre pas d'effet protecteur des EPCs et des HUVECs administrées avec du Matrigel® vis à vis de la dégénérescence musculaire. La coloration des coupes de muscles de la cuisse avec le Trichrome de Masson montre que les muscles ne présentent pas de traumatisme visuel ou structural consécutif à l'administration de Matrigel® contenant les cellules (Figure 24). Seule une chape cellulaire fibreuse se forme en périphérie de la matrice. Sur les coupes histologiques le Matrigel® apparaît en vert, couleur identifiant le collagène.

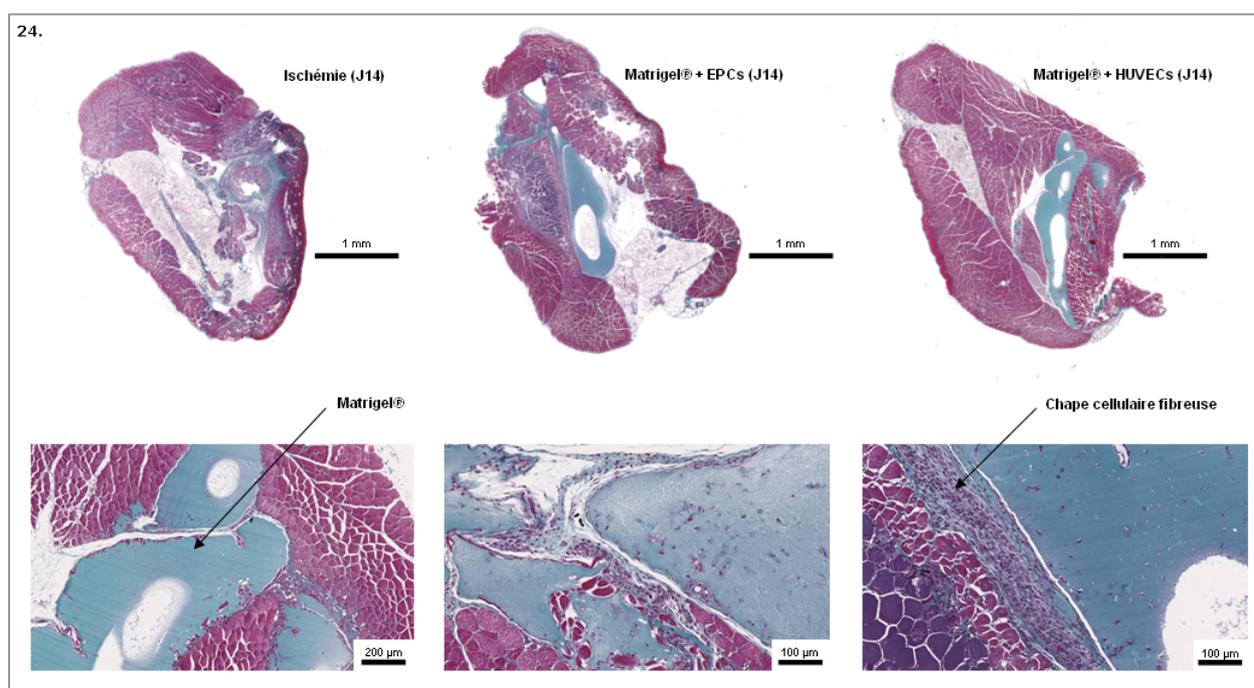
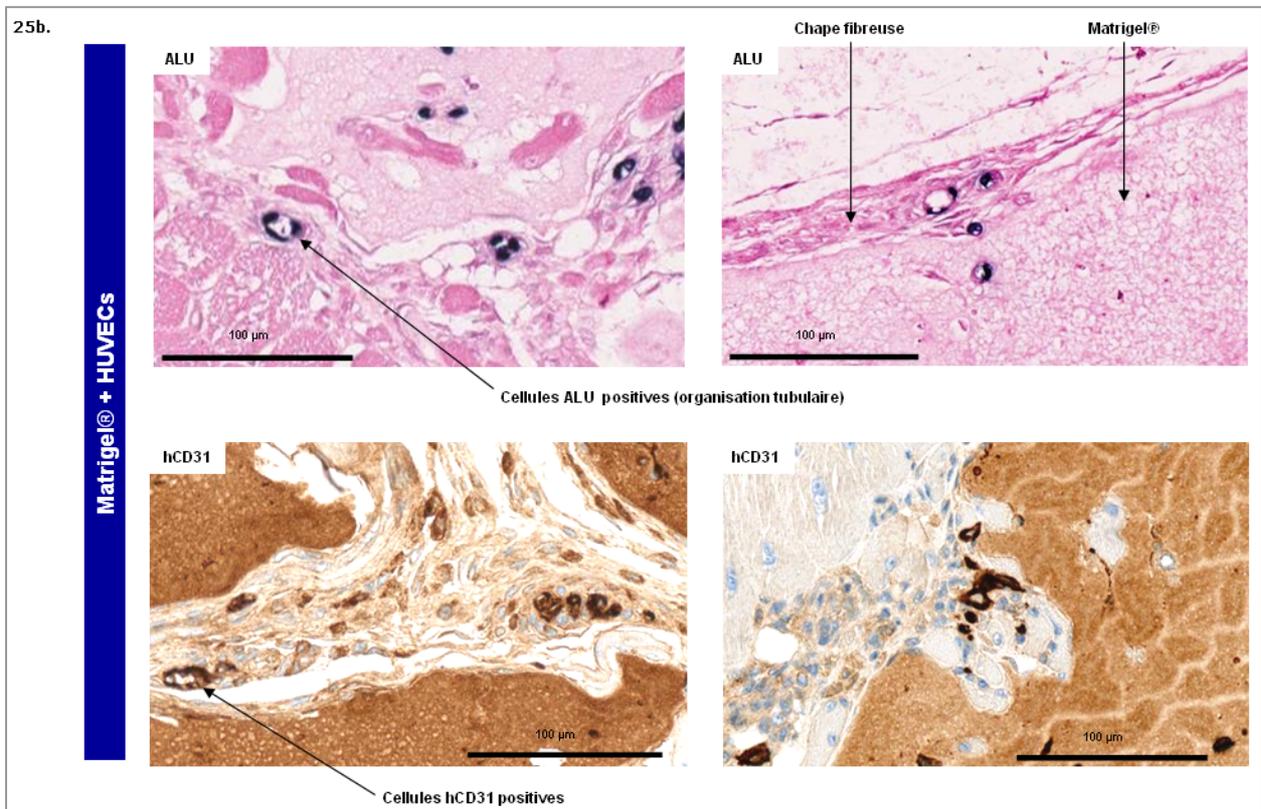
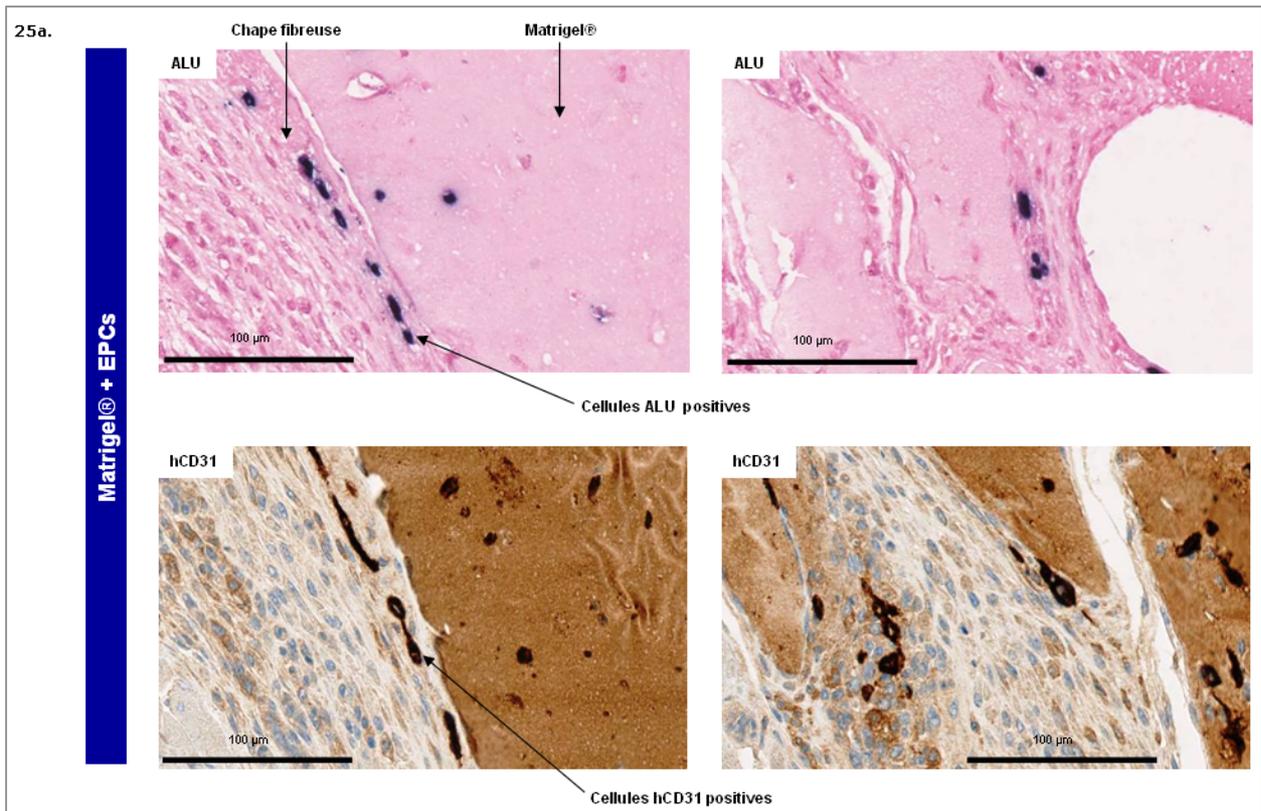


Figure 24 : Histologie structurale des muscles de la cuisse (J14 post-ischémie). Administration i.m d'EPCs et d'HUVECs avec du Matrigel®. Coupes transversales, coloration Trichrome de Masson.

EPCs : endothelial progenitor cells, HUVECs : human umbilical vein endothelial cells.

3-1-3-2 Détection des cellules injectées

Nous avons utilisé la sonde ALU en ISH pour visualiser les EPCs et les HUVECs au niveau des tissus murins. Après 14 jours, les cellules humaines administrées avec du Matrigel® sont détectées au sein du tissu musculaire (cellules bleu foncé). Le marquage en IHC de la protéine CD31 humaine (cellules brunes) confirme la détection de cellules humaines et montre qu'elles ont bien un phénotype des cellules endothéliales (Figures 25a et 25b).



Figures 25 : Détection des EPCs humaines (a) et des HUVECs (b) administrées avec du Matrigel® au niveau des muscles de la cuisse (14 jours post-ischémie). Coupes transversales, hybridation *in situ* avec la sonde ALU et IHC avec un anticorps anti-CD31 humain.

EPCs : endothelial progenitor cells, hCD31 : CD31 humain, HUVECs : human umbilical vein endothelial cells, IHC : immunohistochimie.

Notons que le Matrigel® qui a fixé la DAB (substrat de révélation de l'IHC) est coloré en marron. Les EPCs et les HUVECs s'organisent en périphérie du Matrigel® et colonisent la couche fibreuse sous-jacente mais elles ne diffusent cependant pas entre les fibres musculaires, et elles n'intègrent pas les vaisseaux sanguins natifs. Seules les HUVECs semblent s'organiser en tubules aux interfaces du Matrigel® et des composantes fibroblastiques.

L'utilisation de Matrigel® pour administrer les EPCs et les HUVECs est bien tolérée par notre modèle d'AOMI. Les cellules sont viables, néanmoins elles n'apportent pas de bénéfice vis-à-vis de la reperfusion post-ischémique. Après 14 jours, les cellules s'organisent au niveau de la couche fibreuse qui entoure le Matrigel®. Les EPCs et les HUVECs n'infiltrèrent cependant pas les fibres musculaires et ne sont pas mobilisées vers le site d'ischémie pour intégrer le réseau vasculaire natif. Nous avons donc décidé d'utiliser une autre matrice protéique : l'acide hyaluronique.

3-2 Acide hyaluronique

L'acide hyaluronique (HA) est un composant de la matrice extracellulaire formé d'une répétition d'unités disaccharidiques sulfatées (glycosaminoglycane). Sa présence naturelle dans de nombreux tissus fait de cette matrice protéique un support biocompatible et biodégradable utilisé en recherche biomédicale, et notamment dans le cadre de la reconstruction vasculaire⁷⁵. Grâce à son fort pouvoir de fixation de l'eau (1000 fois son volume), l'HA est un hydrogel à la structure très souple qui favorise la prolifération et la migration cellulaire⁷⁶. Par ailleurs, les formes courtes de l'HA (clivage endogène) stimulent la prolifération des cellules endothéliales et les protègent de l'apoptose, favorisant ainsi l'angiogenèse. Selon Tang et al, l'HA améliore le bénéfice thérapeutique de l'administration d'HUVECs chez un modèle murin d'AOMI⁷⁷. Nous avons ainsi choisi d'administrer des EPCs humaines avec de l'HA au niveau des muscles de la cuisse, un jour après la ligature de l'artère fémorale de souris Balb/c nude de 10 semaines. Nous avons évalué pendant 28 jours l'innocuité et le bénéfice thérapeutique de cette approche vis-à-vis de la régénération vasculaire.

3-2-1 Reperfusion post-ischémique

Après 28 jours, les EPCs n'améliorent pas la récupération du flux sanguin distal de notre modèle d'AOMI : pourcentage de perfusion I/C de $56,6 \pm 4,3$ % contre $65,4 \pm 10,6$ % pour les souris ayant reçu que de l'HA (Figure 26). L'injection d'HA n'a pas d'effet sur la reperfusion

post-ischémique mesurée par imagerie Doppler. En effet, rappelons que 28 jours après une injection i.m de PBS le pourcentage de perfusion I/C est de $61,5 \pm 3,1 \%$.

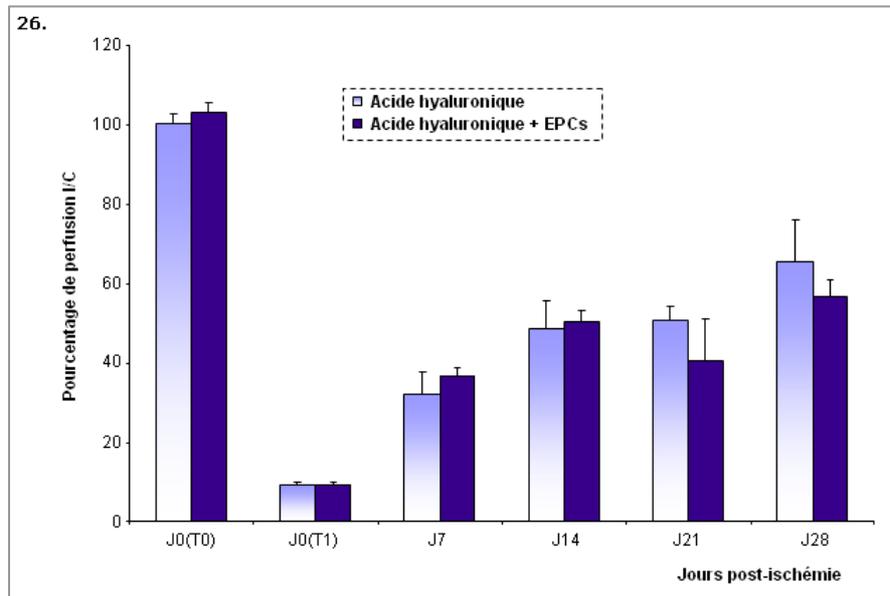


Figure 26 : Suivi de la reperfusion distale post-ischémique par imagerie Doppler. Administration locale des EPCs avec de l'acide hyaluronique. Pourcentage de perfusion I/C \pm sem. AH (n=4) et AH + EPCs (n=5).

AH : acide hyaluronique, AH + EPCs : acide hyaluronique + endothelial progenitor cells, J0(T0) : mesure avant l'opération, J0(T1) : mesure juste après l'induction de l'ischémie, sem : standard error of mean.

3-2-2 Analyse macroscopique

L'administration de HA seul ou avec des EPCs (HA+EPCs), au niveau des muscles de la cuisse ne modifie pas l'évolution pondérale post-ischémique des souris et n'entraîne pas d'augmentation du poids de la rate après 28 jours par rapport aux souris témoins : 134 ± 8 mg (PBS) contre 141 ± 11 mg (HA) et 125 ± 8 mg (HA+EPCs). Aucun effet délétère n'est observé au niveau des muscles injectés.

Des nécroses se limitant au niveau des ongles apparaissent au bout de la première semaine chez 20% des souris ayant reçu des EPCs avec l'HA et restent stables pendant 28 jours (Figure 27). Par contre, les altérations nécrotiques de la patte des souris ayant reçu une administration intramusculaire d'HA sont observées au niveau des ongles chez 25% des animaux après une semaine d'ischémie. Après 14 jours, 25% de souris présentent en plus des nécroses qui atteignent le stade des doigts gonflés, puis l'incidence (50%) et la sévérité des nécroses (grades 1 et 2) se stabilisent jusqu'au 28^{ième} jour.

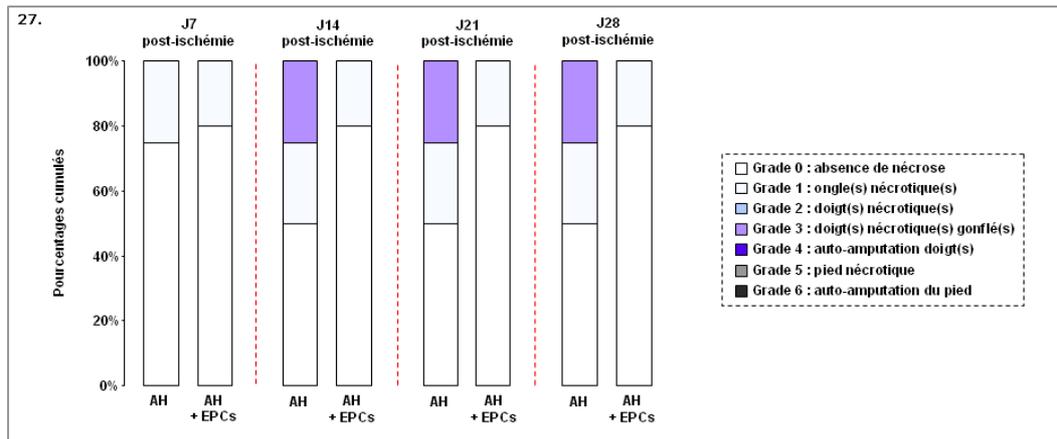


Figure 27 : Estimation de la survie de la patte ischémique. Administration locale des EPCs avec de l'acide hyaluronique. Incidence et hiérarchisation des nécroses de la patte en fonction de leur sévérité. Pourcentages cumulés de chaque grade de nécrose. Analyse descriptive. AH (n=4) et AH + EPCs (n=5).

AH : acide hyaluronique, AH + EPCs : acide hyaluronique + endothelial progenitor cells.

3-2-3 Analyse microscopique

L'analyse des coupes histologiques des muscles de la cuisse et du mollet après ISH avec la sonde ALU ne permet pas de mettre en évidence d'EPCs après 28 jours post-injection.

L'utilisation de l'acide hyaluronique comme vecteur pour administrer les EPCs est bien tolérée par notre modèle d'AOMI. Les EPCs diminuent l'incidence et la sévérité des atteintes nécrotiques de la patte, sans néanmoins apporter de bénéfice vis-à-vis de la reperfusion post-ischémique. Après 28 jours, les EPCs ne sont pas retrouvées au niveau des muscles, ce qui laisse penser qu'elles n'ont pas été mobilisées sur le site d'ischémie.

Malgré une bonne tolérance et des effets encourageants vis-à-vis de la protection contre les nécroses de la patte, les EPCs (et les HUVECs) n'ont pas apporté de bénéfice thérapeutique vis-à-vis de la reperfusion de notre modèle d'AOMI. L'utilisation de Matrigel® pour délivrer localement les cellules a été plus probante que l'acide hyaluronique, en effet, le Matrigel® permet la survie des cellules au sein du tissu musculaire. L'absence de mobilisation sur le site d'ischémie montre l'importance de stimuler les capacités vasculogéniques des EPCs avant de les injecter. Nous avons observé lors de l'analyse phénotypique des EPCs que le récepteur FGFR-4 est plus représenté à leur surface que sur les HUVECs, traduisant une meilleure sensibilité potentielle au SAR X. On peut ainsi envisager de prétraiter (ou co-administrer) les EPCs avec le SAR X pour stimuler leur différenciation in vivo en cellules endothéliales mûres (preuve de concept validée in vitro dans le laboratoire) et améliorer leurs capacités vasculogéniques (en cours d'étude).

Discussion et perspectives

La médecine translationnelle permet à la recherche fondamentale d'avancer depuis les découvertes en laboratoire jusqu'aux applications cliniques chez les patients. C'est dans cette perspective que nous nous sommes attachés à développer un modèle d'AOMI qui soit relevant de la pathologie humaine pour que les bénéfices thérapeutiques mis en évidence sur ce modèle puissent être prédictifs de la clinique humaine.

Partie 1 : Mise en place d'un modèle d'AOMI chez la souris nude.

Nous avons choisi de caractériser notre modèle d'AOMI vis-à-vis de la régénération vasculaire et musculaire chez les souris Balb/c nude. Nous avons choisi le fond génétique Balb/c pour sa reperfusion post ischémique ralentie par rapport aux souris C57Bl6 (autre fond génétique courant pour la souche nude). Les souris Balb/c sont en effet décrites pour présenter un retard de reperfusion naturel qui implique un déficit de la voie de signalisation du VEGF, une densité des artères collatérales préexistantes moins importante et une plasticité vasculaire réduite par rapport aux souris C57Bl6^{78,79}. Néanmoins, la forte incidence de nécroses de grade élevé lors de l'excision d'une portion de l'artère et de la veine fémorale n'est pas éthiquement acceptable et nous a conduit à envisager une chirurgie moins sévère. Ainsi, la ligature de l'artère fémorale, qui préserve l'intégrité du retour veineux, diminue le nombre et la sévérité des atteintes nécrotiques de la patte sans pour autant affecter le déficit de reperfusion des souris Balb/c. Nos observations sont confirmées par la littérature. Chez les souris Balb/c la nature et la localisation de l'obstruction du flux sanguin sur l'artère fémorale n'influence pas la reperfusion post-ischémique, mais conditionne plutôt la sévérité de la souffrance musculaire et des atteintes nécrotiques de la patte. Les stades de nécrose sont plus avancés lorsque l'obstruction est très proximale (artères iliaques), lorsque une partie de l'artère fémorale est excisée, ou encore quand l'intégrité du retour veineux n'est pas conservée⁶⁴.

La faible perte de poids consécutive à l'induction de l'ischémie et la bonne récupération pondérale des animaux montre que les souris Balb/c nude tolèrent bien la chirurgie par ligature de l'artère fémorale. La reperfusion post-ischémique modérée des souris, qui ne récupèrent pas plus de 35% du flux sanguin distal après 14 jours d'ischémie, favorise la mise en évidence d'un potentiel bénéfice thérapeutique lié à la stimulation de la néovascularisation.

Composante inflammatoire

L'induction de l'ischémie provoque une inflammation locale et généralisée qui est principalement observée pendant les cinq premiers jours qui suivent la ligature de l'artère fémorale et qui perdure au jusqu'au 14^{ième} jour. Le profil inflammatoire des souris des groupes sham montre que la procédure chirurgicale est en grande partie responsable de l'augmentation du nombre de globules blancs circulants. Néanmoins, la forte augmentation du taux de MCP-1 plasmatique et le recrutement des macrophages au niveau des muscles de la cuisse restent quant à eux spécifiques de la situation ischémique. La chimiokine MCP-1 sécrétée par les cellules endothéliales activées par l'ischémie assure la mobilisation des monocytes sur le site de lésion tissulaire avant qu'ils soient recrutés dans le tissu où ils se différencient en macrophages qui eux-mêmes sécréteront MCP-1 pour entraîner un plus grand recrutement. Le statut inflammatoire dépendant de l'ischémie est corroboré par l'aspect (dur, gonflé, décoloré) et le poids des muscles de la cuisse et du mollet qui traduisent la formation d'un œdème inflammatoire lors des 3 premiers jours consécutifs à l'induction de l'ischémie.

Les modèles d'AOMI développés chez la souris nécessitent une obstruction chirurgicale du flux sanguin fémoral qui provoque une inflammation rapide qui n'est pas représentative de la pathologie ischémique humaine. En effet, chez les patients souffrant d'une l'AOMI, on observe également une inflammation, mais celle-ci est plus lente et permanente car elle est associée à la progression de l'athérosclérose. En plus de marqueurs inflammatoires comme la CRP (C reactive protein) ou l'Il-6 (interleukine-6) qui sont décrits pour être augmentés avec la sévérité de l'AOMI chez l'Homme⁸⁰, on note une augmentation du nombre des monocytes circulants qui est diminuée après le traitement chirurgical des patients⁸¹. Cette augmentation réversible du nombre de monocytes montre que l'inflammation n'est pas exclusivement associée au processus d'athérosclérose, mais qu'elle est aussi directement dépendante de la situation ischémique. La chimiokine MCP-1 qui est décrite pour être augmentée chez les patients atteints d'AOMI pourrait au même titre que la numération des cellules inflammatoires être envisagée comme un biomarqueur de cette pathologie chez l'Homme^{82,83}.

Souffrance et régénération musculaire

L'interruption du flux sanguin fémoral entraîne des dommages au niveau des structures tissulaires et cellulaires qui sont plus importants pour les muscles du mollet que pour les muscles de la cuisse. Cette différence anatomique est à mettre en relation avec la perfusion résiduelle observée au niveau des muscles de la cuisse après l'induction de l'ischémie et qui n'est pas observée pour les muscles du mollet qui ne commencent à être réellement reperfusés qu'après

une semaine. Nos observations sont en accord avec les travaux du Dr Helisch qui montrent qu'au niveau des muscles du mollet des souris Balb/c, une nécrose et une hypoxie post-ischémique s'installe contrairement aux muscles de la partie haute de la patte⁷⁹. Il serait intéressant de vérifier que la différence de revascularisation résiduelle que nous observons entre les muscles de la cuisse et les muscles du mollet est associée à un statut hypoxique anatomiquement différent. Statut hypoxique que nous pourrions mettre en évidence grâce à la détection en IHC de la protéine HIF1- α sur des coupes histologiques de muscles de la cuisse et du mollet (mise au point des conditions de marquage déjà réalisée au laboratoire).

La privation en oxygène consécutive à l'ischémie est associée à une souffrance musculaire qui est reflétée par l'atrophie des muscles du mollet après deux semaines (fonte musculaire d'environ 40%). La perte de poids des muscles est détectée à partir du 14^{ème} jour, masquée vraisemblablement dans les temps plus précoces par un œdème inflammatoire. Cette présence d'atrophie et de dégénérescence musculaire précoce est mise en évidence par l'analyse structurale des muscles du mollet qui montre une hétérogénéité de la taille et de la forme des cellules musculaires dès le premier jour post-ischémie. En effet, les cellules musculaires qui sont initialement anguleuses s'arrondissent et deviennent nécrotiques (opacification du cytoplasme). La migration des noyaux au centre des cellules musculaires (gros noyaux vésiculaires) signe de l'état de souffrance et de future régénération des cellules. Les cellules musculaires altérées sont remplacées par des adipocytes qui colonisent les zones lésées. L'infiltration cellulaire accrue autour des fibres lésées reflète l'inflammation locale qui aboutie après deux semaines d'ischémie à une fibrose du tissu musculaire mise en évidence par l'augmentation de la synthèse de collagène. Pour compléter cette analyse structurale, on peut proposer de mesurer l'activité proliférative des cellules infiltrées par la détection en IHC de la protéine nucléaire Ki-67 qui est spécifiquement exprimée pendant les phases actives du cycle cellulaire. Notons que la régénération musculaire qui est également reflétée par la récupération des capacités motrices de la patte après une semaine d'ischémie s'accompagne de la synthèse de protéines contractiles comme l'actine et la myosine qui pourraient être mises en évidence au niveau musculaire par dosage ELISA et/ou IHC. L'acidose tissulaire post-ischémique mise en évidence par la coloration bleue/violette des muscles du mollet traduit un changement de statut métabolique des muscles qui est corroboré par l'augmentation plasmatique des taux d'acide lactique. En effet, la privation en oxygène ne permettant plus aux cellules musculaires de produire de l'énergie sous forme d'ATP par dégradation aérobie du pyruvate produit par la glycolyse (cycle de Krebs), elles basculent vers un métabolisme anaérobie faisant intervenir l'enzyme qui catalyse la dégradation du pyruvate en lactate (lactate déshydrogénase).

Chez l'Homme, la diminution de l'apport sanguin aux tissus est également associée à une dégénérescence des muscles du mollet qui se caractérise par des modifications morphologiques comme l'atrophie⁸⁴, l'apoptose⁸⁵ et l'augmentation du nombre de fibres qui évoluent d'un type oxydatif (type I) vers un type glycolytique (type II)⁸⁶. Cette dernière modification structurale et les dommages relevés au niveau de l'ADN mitochondrial⁸⁷ signent du changement de statut métabolique des muscles qui s'accompagne notamment de l'augmentation des concentrations circulantes d'acide lactique^{88,89}. Notons que l'atrophie musculaire observée dans le cadre de l'AOMI chez l'Homme pourrait être mise en relation avec le statut inflammatoire généralisé, et plus particulièrement avec l'augmentation de la concentration d'Il-6 consécutive à l'inflammation. En effet, les taux d'Il-6 et de TNF- α (tumor necrosis factor- α) sont augmentés dans le plasma des individus atteints d'atrophie musculaire liée à l'âge⁹⁰.

Angiogenèse, artériogenèse et vasculogenèse

Le suivi de la reperfusion par imagerie Doppler montre une revascularisation distale progressive et modérée qui reflète la formation de néo-vaisseaux sanguins au niveau des muscles de la patte ischémisée. La revascularisation mise en évidence au niveau des muscles de la cuisse et du mollet grâce à l'injection systémique d'isolectine fluorescente reflète la fonctionnalité des vaisseaux sanguins formés après la ligature de l'artère fémorale. Après 14 jours d'ischémie, les muscles de la cuisse et du mollet montrent une augmentation du nombre de vaisseaux sanguins de petite taille, alors que des vaisseaux sanguins de gros diamètre sont uniquement observés au niveau des muscles de la cuisse. Ces observations sont en accord avec les travaux du Dr Schaper qui montrent que chez la souris la revascularisation post-ischémique des muscles du mollet est dépendante de l'angiogenèse (augmentation de la densité vasculaire) alors que le rétablissement du flux sanguin des muscles de la cuisse est plutôt dépendant du processus d'artériogenèse (augmentation de diamètre vasculaire)⁶. L'augmentation des quantités de CD105 déterminée au niveau des muscles de la cuisse traduit l'activation des cellules endothéliales qui est responsable de la néovascularisation, et confirme par ailleurs la formation de néo-vaisseaux fonctionnels. Notons que nous pourrions envisager un co-marquage de l'isolectine ou de CD105 (marqueurs des cellules endothéliales) avec l' α -SMA (marqueur des cellules murales) pour vérifier la maturation vasculaire et s'assurer de la pérennité du nouveau réseau vasculaire formé. Chez l'Homme les marquages IHC sont peut réalisés pendant les études cliniques car ils nécessitent une biopsie de muscle qui s'avère douloureuse pour le patient et qui de plus pourrait influencer les critères de reperfusion mesurés. Dès lors, ces échantillons musculaires sont obtenus à partir de muscles prélevés chez des patients décédés ou amputés. Les données qui sont néanmoins

collectées au niveau des muscles du mollet (Figure 1) mettent en évidence une revascularisation plutôt dépendante de l'angiogenèse qui est caractérisée par une augmentation de la densité vasculaire⁴⁵ et notamment des vaisseaux sanguins de petite taille (artérioles et capillaires)⁵⁶.

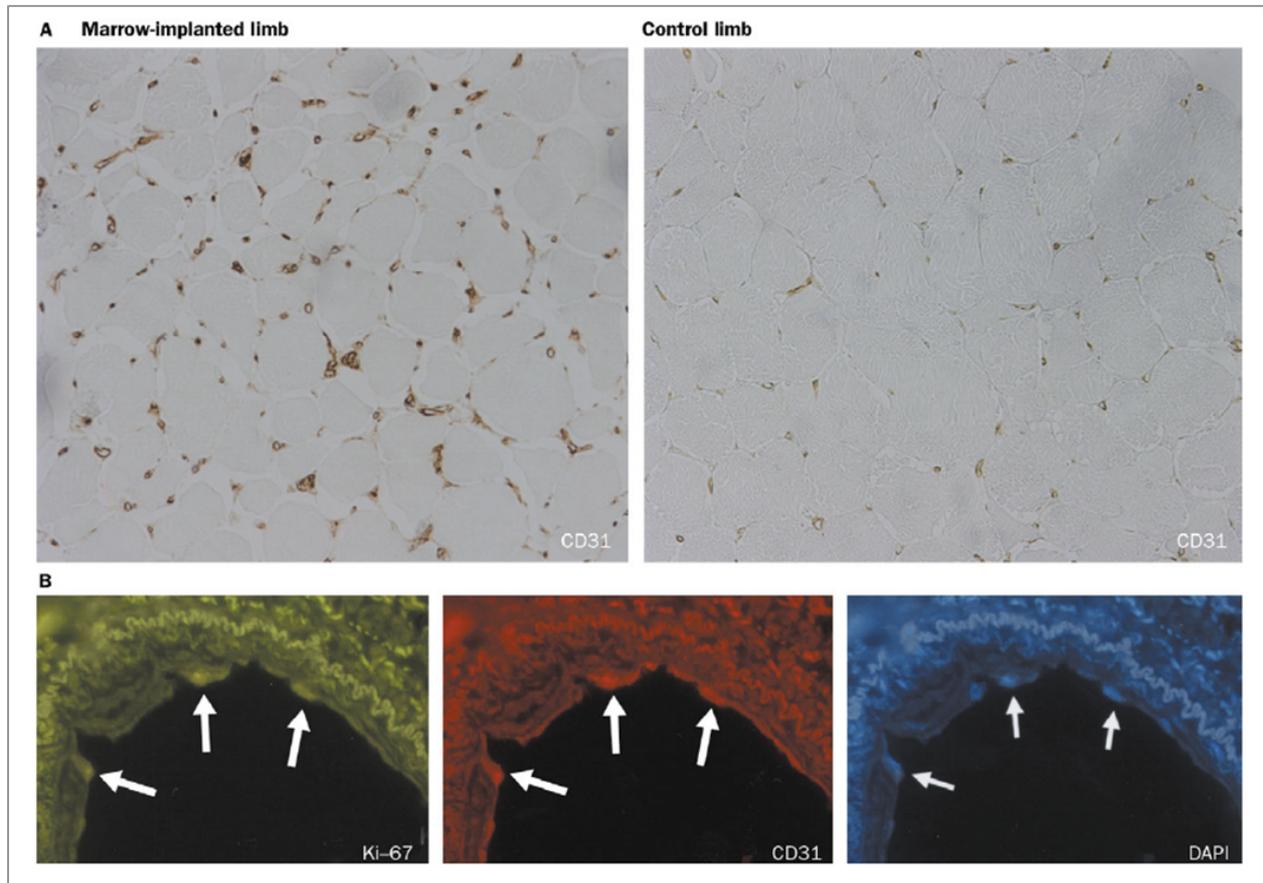


Figure 1 : Analyse immunohistochimique de nouveaux vaisseaux sanguins (muscle du mollet).

A/ Le nombre de vaisseaux sanguins CD31 positifs (marron) est augmenté dans le muscle ischémié d'un patient ayant reçu une injection de PB-MNCs en comparaison de son muscle contrôle ayant reçu une injection de NaCl 0,9% (X200). B/Les flèches montrent les cellules positives pour Ki-67, CD31 et DAPI (X400). *Tateishi-Yuyama*⁴⁵.

DAPI : 4-6-diamidino-2-phenylindole, NaCl : chlorure de sodium, PB-MNCs : peripheral blood mononuclear cells.

Le développement du système vasculaire chez l'Homme à longterm a été exclusivement associé aux processus d'angiogenèse et d'artériogenèse. Cependant ce dogme a été remis en question à la fin des années 90 lors de la découverte de cellules mononucléées dérivées du sang humain qui sont capables de se différencier en cellules endothéliales et de participer à la revascularisation après leur administration chez des modèles précliniques d'ischémie. Ces cellules, les EPCs, présentent des marqueurs de surface endothéliaux et sont incorporées au niveau du site d'ischémie. Ainsi, avant d'envisager un projet de thérapie cellulaire qui prévoit la greffe d'EPCs, nous avons voulu vérifier l'implication du processus de vasculogenèse dans la revascularisation post-ischémique de notre modèle d'AOMI.

Dans un premier temps nous avons cherché à identifier les EPCs dans le sang de souris Balb/c nude ischémiées. Nous nous sommes basés sur une caractérisation morphologique et phénotypique pour identifier les EPCs à cause du faible nombre de PB-MNCs adhérentes. De plus, la grande majorité des cellules présentent un phénotype Ac-LDL⁺/isolectine⁺. Nous pensons que dans nos conditions expérimentales, les PB-MNCs qui adhèrent à la fibronectine après 7 jours de culture sont majoritairement des monocytes et des macrophages (nos conditions de culture n'étant pas favorable aux lymphocytes). En effet, la revue de la littérature montre que les monocytes et les macrophages sont également capables de fixer l'isolectine et d'incorporer l'Ac-LDL⁹¹⁻⁹³. Nous avons néanmoins mis en évidence, parmi une population cellulaire hétérogène (PB-MNCs), des cellules fusiformes ayant un phénotype Ac-LDL⁺/isolectine⁺ qui présentent les caractéristiques des EPCs décrites par Kalka et al⁹⁴ (Figure 2).

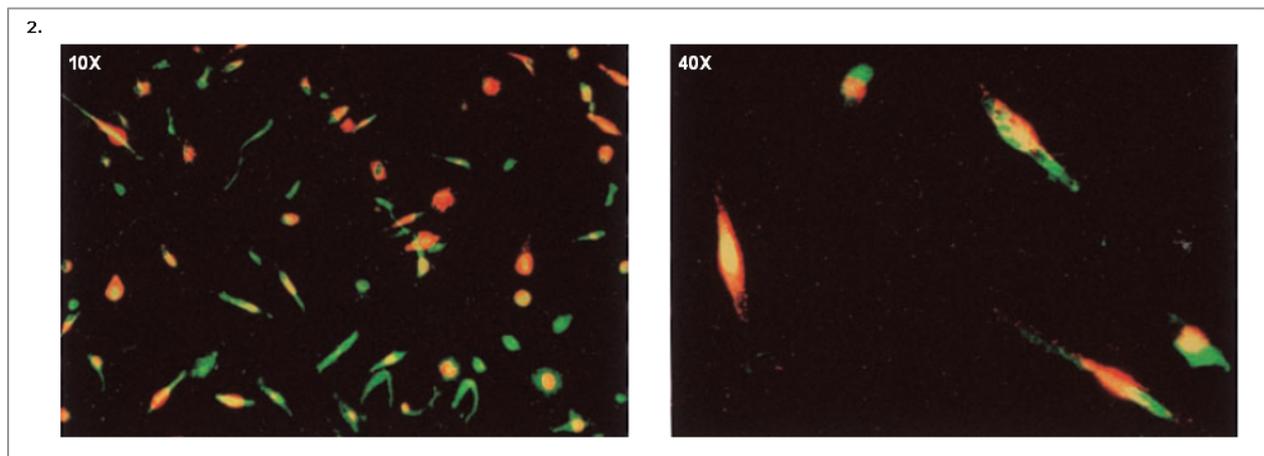


Figure 2 : Mise en évidence des EPCs isolées à partir de MNCs issues de sang humain. Incorporation de l'Ac-LDL (dil : rouge) et fixation membranaire de l'UEA (FITC : vert). PB-MNCs mises en culture 7 jours sur un support fibronectine. *Kalka et al⁹⁴*.

Ac-LDL : LDL acétylé, Dil : Dil : 1,1'-dioctadécyl-3,3,3',3'- tetraméthylindocarbocyanine perchlorate, EPCs : endothelial progenitor cells, FITC : Fluorescein isothiocyanate, PB-MNCs : peripheral blood mononuclear cells, UEA : Ulex europaeus agglutinin.

Dans un deuxième temps, l'utilisation des souris NSGh nous a permis de mettre clairement en évidence l'implication du processus de vasculogénèse dans le cadre de la reperfusion post-ischémique chez la souris après l'interruption du flux sanguin fémoral. Des cellules médullaires humaines au phénotype endothélial sont spécifiquement recrutées au niveau du site d'ischémie pour intégrer le réseau vasculaire natif murin. Ces observations signent de la participation active de la vasculogénèse dans le cadre de la reperfusion post-ischémique de notre modèle, mais elles demandent néanmoins à être complétées par l'identification phénotypique des cellules humaines qui sont mobilisées et qui intègrent le réseau vasculaire natif de la souris par IHC avec la détection de CD31 et/ou du VEGFR2.

L'induction de l'ischémie de la patte par ligature de l'artère fémorale est bien tolérée par les souris Balb/c nude. La reperfusion post-ischémique reproductible et modéré permet l'évaluation de l'activité thérapeutique de facteurs pro-angiogéniques. Les altérations post-ischémiques comme la dégénérescence du tissu musculaire, le changement du statut métabolique des muscles et l'inflammation généralisée (cependant dépendante du geste chirurgical dans sa phase précoce) qui sont observées sur notre modèle sont comparables à la situation pathologique humaine. De plus, les mécanismes physiologiques de revascularisation (l'angiogenèse, l'artériogenèse et la vasculogenèse) que nous avons mis en évidence chez les souris Balb/c nude sont également impliqués lors de la régénération vasculaire chez l'Homme. Ainsi, notre modèle d'AOMI autorise l'évaluation de thérapies comme l'administration de facteurs de croissance ou de cellules souches (indépendamment ou en association) en vu de transposer les résultats à la pathologie humaine et être prédictif d'un éventuel bénéfice clinique pour les patients.

Partie 2 : Evaluation du bénéfice thérapeutique de la stimulation de la voie FGF.

L'angiogenèse thérapeutique représente une approche possible pour traiter les patients atteints d'une AOMI. Le but de cette thérapie étant de restaurer et de maintenir dans le temps la reperfusion des territoires ischémiés en stimulant les processus de néovascularisation. Les études précliniques et cliniques (Tableau 1 de la partie introduction de ce mémoire) montrent la faisabilité et l'innocuité de l'administration de facteurs de croissance, et notamment du FGF au niveau du site d'ischémie. En effet, le FGF est largement décrit comme un acteur majeur de l'angiogenèse. Il stimule la néovascularisation par un effet direct ou en induisant la production de VEGF. Le FGF favorise la dégradation enzymatique de la matrice extracellulaire, il stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales et les protège de l'apoptose. Son bénéfice thérapeutique vis-à-vis de la revascularisation est d'autant plus important qu'il est également impliqué au niveau des processus d'artériogenèse et de vasculogenèse.

Les patients atteints d'une AOMI sont des patients pour lesquels les mécanismes de revascularisation sont déficients. Le diabète et le vieillissement sont deux causes majeures de ce retard de néovascularisation qui est en partie dépendant d'une altération de la voie du FGF. En effet, le diabète entraîne la glycation du FGF-2 qui diminue son activité biologique vis-à-vis des cellules endothéliales bovines⁹⁵. Le vieillissement est associé à une baisse des taux endogènes et à l'absence d'induction des ARNm du FGF-2 dans le cadre de la cicatrisation chez la souris⁹⁶.

D'où l'intérêt de promouvoir la revascularisation chez ces patients en activant le système FGF par l'intermédiaire de molécules exogènes. Le SAR X est une molécule hétérocyclique formée par l'association de deux antagonistes des récepteurs aux FGF (Annexe 1). Il a été montré que son activité vis-à-vis des cellules endothéliales est dépendante de l'activation du FGFR-4. Le SAR X active le récepteur en induisant sa dimérisation par rapprochement mécanique de deux monomères qui sont chacun reconnus par les deux antagonistes.

Innocuité du traitement

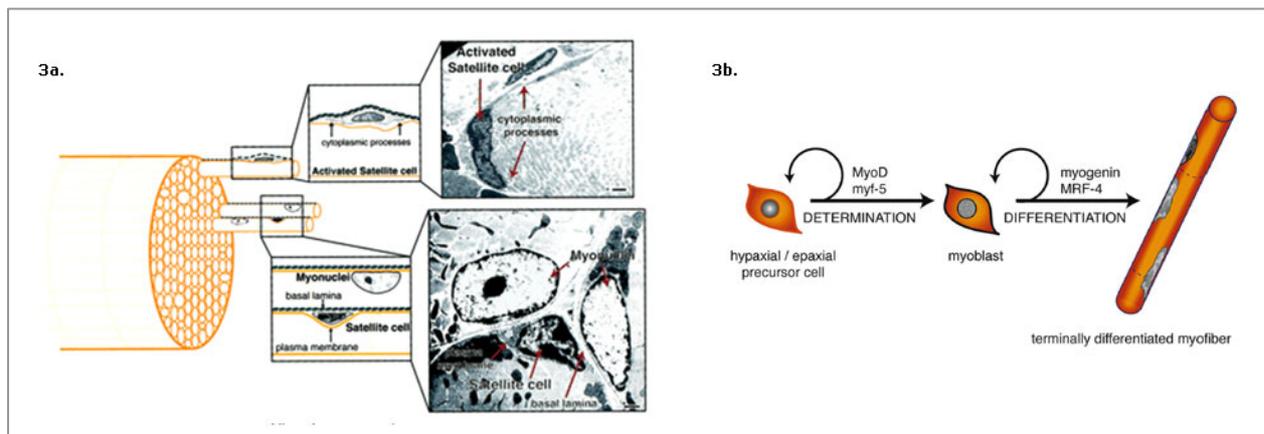
L'administration intramusculaire de SAR X ne modifie pas l'évolution pondérale des souris et les muscles de la cuisse ne présentent pas de traumatismes pouvant être liés à la voie d'injection. Le SAR X présente une bonne durée de vie *in vivo*, il est encore détecté après 7 jours dans le muscle d'injection (cuisse) et montre une bonne distribution au niveau des muscles du mollet. La non détection de SAR X au niveau circulant renseigne sur sa spécificité d'action au niveau des muscles de la patte et lève ainsi l'inquiétude des putatifs effets pro-cancéreux pouvant être associés aux concepts thérapeutiques qui visent à stimuler la synthèse de nouveaux vaisseaux sanguins. Ces données pharmacocinétiques nous ont permis d'envisager un schéma de traitement avec une exposition réduite qui est proche de celui réalisé chez l'Homme lors de l'administration de facteurs de croissance recombinants : administration intramusculaire, faibles doses et fréquence d'injection réduite.

Bénéfice thérapeutique

Au cours d'un premier protocole d'évaluation, le SAR X (1mg/kg) protège la patte ischémisée des nécroses dès la première semaine de traitement et améliore la reperfusion distale mesurée après 21 jours d'ischémie. Notons que la dose de 0,3 mg/kg n'a pas apporté de bénéfice vis-à-vis de ces deux critères. A la dose de 1 mg/kg, le SAR X augmente l'expression de CD105 dans les muscles de la cuisse de la patte ischémisée et n'a pas d'effet sur la patte controlatérale. Cette augmentation qui traduit une activité angiogénique locale, nous a conduit à réaliser un deuxième protocole pour étudier la pérennité de la revascularisation. Dans cette expérience, nous avons pu montrer que la vascularisation reste stable pendant 35 jours (récupération du flux sanguin distal), soit 21 jours après la dernière administration du produit. Ce paramètre est fort intéressant par rapport à la situation clinique. En effet, la revascularisation produite chez les patients en réponse à la stimulation de la néovascularisation est la plus part du temps transitoire et demande à être améliorée dans le temps. Pour valider sur notre modèle d'AOMI que le mécanisme d'action *in vivo* du SAR X est dépendant de l'activation du FGFR-4, nous prévoyons

d'étudier au niveau des muscles de la cuisse la phosphorylation du FGFR-4 et de protéines impliquées dans la transduction du signal comme la PKB par exemple. De plus, la mise en évidence de la phosphorylation du FGFR-4 pourrait être un biomarqueur de l'activité du SAR X. L'efficacité thérapeutique du SAR X vis à vis de la régénération vasculaire pourrait néanmoins être améliorée en envisageant une délivrance progressive via l'utilisation de biomatériaux qui nous permettraient de se rapprocher des conditions physiologiques en reproduisant le gradient de facteurs de croissance consécutif au gradient d'hypoxie⁹⁷.

L'incidence et la sévérité des nécroses apparaissent indépendantes du niveau de reperfusion chez la souris⁶⁴, mais également chez l'Homme, pour qui l'amélioration des ulcérations ischémiques ne passe pas forcément par l'augmentation de la vascularisation^{52,53}. Ainsi, l'effet protecteur du SAR X vis-à-vis des atteintes nécrotiques de la patte pourrait ainsi être attribué à la diminution de l'apoptose via la stimulation du système FGF. Ce bénéfice vis-à-vis de la diminution de la mort cellulaire au niveau des tissus ischémiques pourrait être mis en évidence par le marquage IHC des caspases ou d'autres marqueurs d'apoptose tels que les PARP clivées (Poly ADP-ribose polymérase). Le SAR X pourrait également protéger le tissu musculaire de la nécrose grâce à l'activation du récepteur FGFR-4 qui est impliqué dans le développement et la régénération musculaire^{98,99}. En effet, la stimulation du FGFR-4 induit la prolifération des cellules satellites myogéniques. Ces cellules progénitrices musculaires résidentes sont des cellules à la capacité proliférative qui contribuent au développement musculaire et à la régénération des myocytes en souffrance (Figures 3a et 3b)¹⁰⁰.



Figures 3 : a- localisation musculaire des cellules satellites. (Barre échelle = 1 µm). Les cellules satellites quiescentes sont localisées dans un dédoublement de la lame basale et elles sont préférentiellement situées à proximité des capillaires et des plaques motrices. Elles ont un rapport nucléocytoplasmique élevé, peu d'organites cellulaires et une hétérochromatine riche. Elles sont dépourvues de ramifications. Les cellules satellites activées sont également localisées dans un dédoublement de la lame basale mais peuvent migrer à distance de leur localisation initiale. Ces cellules présentent une activité mitotique qui s'accompagne de l'enrichissement en organites cellulaires, d'une diminution du rapport nucléocytoplasmique, de l'appauvrissement en hétérochromatine et de l'acquisition de ramifications du corps cellulaire. **b-Contrôle de l'évolution phénotypique des cellules satellites.** Les facteurs de transcription MyoD et myf-5 régulent la détermination du phénotype myogénique des précurseurs des cellules satellites. La myogénine et le facteur de transcription MRF-4 contrôlent quant à eux la différenciation terminale des cellules satellites en myofibrilles. *Hawke et al. 2001*¹⁰⁰.

mMRF-4 : muscular regulatory factor-4, myf-5 : myogenic factor-5, MyoD : myogenic differentiation.

Nous pourrions ainsi mettre en évidence la prolifération de cellules satellites via la détection en IHC de la desmine (protéine structurale) ou des facteurs de transcription comme myf5 et MyoD qui sont spécifiques de cette population cellulaire.

L'injection intramusculaire de SAR X montre que la stimulation exogène du système FGF améliore la revascularisation fonctionnelle et la survie de la patte ischémique de notre modèle d'AOMI. La pérennité de la revascularisation que nous observons permet d'espérer une néovascularisation durable chez l'Homme. Nous avons cependant conscience que le SAR X pourrait être confrontée aux mêmes problèmes que lors de l'administration de facteurs de croissance exogènes (dégradation, choix de la juste dose pour limiter la saturation du système). Ainsi, nous pensons que l'optimisation du potentiel thérapeutique du SAR X pourrait passer par son association avec la thérapie cellulaire.

Partie 3 : Evaluation du bénéfice thérapeutique de la greffe d'EPCs.

Depuis la mise en évidence des EPCs dans le sang humain, les recherches cliniques se sont orientées vers leur utilisation pour promouvoir la revascularisation dépendante de la vasculogénèse. La thérapie cellulaire utilisant les EPCs bénéficie des avancées scientifiques sur les cellules souches et nourrit ainsi pour les patients l'espoir d'une médecine régénérative. La faible proportion des EPCs circulantes conduit néanmoins les recherches cliniques à utiliser une population cellulaire plus large qui inclue les EPCs : les cellules CD34+ issues du sang ou de la moelle osseuse. Ces cellules font l'objet de nombreuses études en thérapie cellulaire pour promouvoir la régénération vasculaire des patients atteints d'une AOMI (Tableau 2, page 19). Cette approche montre sa faisabilité et son innocuité. Néanmoins, comme pour l'utilisation thérapeutique des facteurs de croissance, les résultats encourageants restent à être stabilisés dans le temps. Nous avons ainsi voulu au travers de notre projet en thérapie cellulaire (administration d'EPCs humaines) mettre au point des conditions expérimentales optimisées dans la perspective d'évaluer leur potentiel thérapeutique après avoir amélioré leur capacité à promouvoir la revascularisation.

Sélection de la voie d'administration : systémique ou locale

Nous avons voulu tout d'abord déterminer la meilleure voie d'administration des EPCs. Pour ce faire, nous avons comparé la voie intramusculaire (i.m) et la voie intraveineuse (i.v).

L'injection i.m a été réalisée en différents points pour se rapprocher des conditions cliniques, multiplier les sites potentiels d'intégration au niveau du réseau vasculaire, et limiter les traumatismes liés à la présence de liquide entre les fibres musculaires. est bien tolérée par notre modèle d'AOMI : l'évolution pondérale des souris n'est pas modifiée et nous n'observons pas de signe d'inflammation locale ou généralisée. De plus les cellules ne sont pas détectées au niveau des poumons. Indépendamment de la voie d'administration, les EPCs n'améliorent pas la récupération post-ischémique évaluée vis-à-vis de la survie de la patte ischémique, la reperfusion distale et la dégénérescence des muscles du mollet. Nous pensons que ce manque d'effet peut s'expliquer par l'absence de mobilisation des cellules sur le site d'ischémie. En effet, les EPCs ne sont pas détectées au niveau du muscle ou du réseau vasculaire de la patte ischémique. Soupçonnant une dégradation systémique et/ou locale, nous avons décidé d'évaluer le bénéfice thérapeutique de l'administration intramusculaire d'EPCs en utilisant des matrices protéiques qui seraient susceptible de préserver les cellules de la dégradation endogène : le Matrigel® et l'acide hyaluronique. Nous avons choisi de poursuivre nos investigations avec la voie i.m car cette voie est utilisée dans la grande majorité des études cliniques.

Administration locale via une matrice protéique

Notre modèle murin d'AOMI tolère bien l'administration i.m de Matrigel® et d'EPCs. De plus, le Matrigel® reste une matrice inerte vis-à-vis de la régénération vasculaire ou musculaire consécutive à l'ischémie. Notons que le volume de Matrigel® pourrait néanmoins être réduit au vu de la place qu'il occupe au sein du tissu musculaire. L'administration des EPCs n'a pas montré de bénéfice thérapeutique vis-à-vis de la reperfusion post-ischémique et de la régénération des muscles du mollet. Les cellules ont néanmoins survécu pendant les 14 jours. Elles se sont organisées en périphérie du Matrigel® ou ont migré au niveau de la chape conjonctive (collagène, fibroblastes...) qui borde la matrice, mais elles n'intègrent cependant pas le réseau vasculaire existant. Un prétraitement préalable des EPCs avant de les administrer pourrait améliorer leur capacité vasculogénique. Le SDF1- α est par exemple montré comme un facteur qui favorise la capacité des EPCs à s'organiser en tubules endothéliaux¹⁰¹. Par ailleurs, 14 jours n'est peut-être pas une durée suffisante pour que les EPCs migrent et s'organisent en tubules. En effet, Zhou et al ont mis en évidence la capacité des PB-MNCs à former des tubules endothéliaux sur un modèle d'implant sous-cutané de Matrigel® chez la souris nude après 21 jours¹⁰². Nous avons donc décidé d'évaluer le bénéfice thérapeutique des EPCs sur notre modèle d'AOMI au cours d'un protocole de 28 jours, en utilisant une matrice visqueuse et

biodégradable : l'acide hyaluronique (HA). Nous avons profité de cette nouvelle expérience pour doubler la quantité de cellules injectées et pour diminuer le volume de matrice injecté.

Les souris Balb/c nude tolèrent bien l'administration i.m d'acide hyaluronique et d'EPCs. Les EPCs n'ont pas d'effet bénéfique vis-à-vis de la reperfusion post-ischémique mesurée par imagerie Doppler. Les cellules ne sont pas détectées après 28 jours au niveau de la zone d'injection, ni au niveau du réseau vasculaire existant laissant penser que les EPCs sont tout de même dégradées malgré l'utilisation de HA. Les EPCs améliorent diminuent néanmoins l'incidence et la sévérité des nécroses de la patte ischémisée, peut-être via un effet sécrétoire pendant les temps précoces qui suivent leur administration.

Pour les deux protocoles de thérapie cellulaire les EPCs ont été administrées après un jour d'ischémie, au moment de la phase inflammatoire qui suit l'induction de l'ischémie. La réponse immunitaire pourrait ainsi être responsable de la dégradation des EPCs qui sont administrées avec l'HA (ou sans matrice lors de l'évaluation des voies d'administration i.m et i.v) alors que l'utilisation d'une matrice protéique comme le Matrigel® protégerait les cellules mais limiterait par la même occasion leur migration vers les tissus environnants et la diffusion des facteurs trophiques sécrétés. Ainsi, nous pouvons proposer d'administrer les cellules après le cinquième jour qui suit l'induction de l'ischémie. Cependant la néovascularisation étant initiée pendant cette période précoce, le bénéfice de la greffe d'EPCs perdrait son intérêt. Il faudrait donc envisager l'utilisation d'une matrice qui garantirait la diffusion des cellules, mais plus particulièrement des facteurs sécrétés, tout en assurant une relative protection vis-à-vis de l'environnement inflammatoire. L'utilisation de Matrigel® moins concentré (tests de dilution) pour élargir le maillage protéique pourrait être une première solution avant d'envisager de tester une autre matrice de délivrance que nous déterminerons selon la littérature. Notons par exemple que Maguire et al ont montré que l'encapsulation de cellules souches dans des billes d'alginate poly-(L-lysine) permet de développer un système qui favorise leur différenciation en hépatocytes, tout en assurant leur viabilité et le maintien de leur phénotype différencié¹⁰³.

Le contexte physiopathologique des patients souffrant d'AOMI pose un problème conceptuel concernant l'administration autologue d'EPCs. Les pathologies comme le diabète ou l'hypercholestérolémie diminuent les capacités vasculogéniques des EPCs^{104,105}. Les EPCs utilisées dans nos études expriment le récepteur au FGFR-4 qui est la cible de notre FGFR agoniste de synthèse. Cette caractéristique phénotypique est intéressante dans le cadre d'un traitement *in vitro* avec le SAR X sur des cellules isolées à partir de la moelle osseuse ou du sang périphérique avant leur ré-administration chez le patient. Cette étape préliminaire pourrait favoriser la prolifération et la migration des EPCs, les protéger de l'apoptose, ou encore

augmenter leur d'adhésion au mur vasculaire via l'expression des E et P-sélectines (preuve de concept en cours d'évaluation *in vitro*). De plus si on envisage un traitement *in vivo* consécutif à la greffe pour maintenir l'amélioration des capacités vasculogénique des EPCs, on pourrait profiter du bénéfice thérapeutique du SAR X vis-à-vis de l'angiogenèse via la stimulation du système FGF.

L'administration d'EPCs n'a pas eu le bénéfice escompté vis-à-vis de la régénération post-ischémique de notre modèle. Il nous est donc impossible pour l'instant d'évaluer le bénéfice du SAR X en prétraitement ou en association. Ainsi, nous proposons en perspective à ce travail, un nouveau protocole expérimental optimisé qui nous permettrait de montrer la participation active des EPCs dans la revascularisation de notre modèle. Nous prévoyons d'administrer chez des souris Balb/c nude (ischémie induite par ligature de l'artère fémorale) des EPCs humaines prétraitées avec le SAR X pour augmenter leur potentiel vasculogénique et notamment leur capacité à former des tubules endothéliaux. Les souris seront suivies pendant 21 jours : évolution pondérale, incidence et sévérité des nécroses de la patte, et reperfusion post-ischémique distale (imagerie Doppler). Le protocole pourra être continué en fonction de l'évolution de la reperfusion pour s'assurer de la pérennité de la revascularisation. Nous prévoyons une étude histologique des muscles de la cuisse et du mollet (coloration Trichrome de Masson) pour vérifier l'innocuité et le bénéfice thérapeutique de l'administration des EPCs vis-à-vis de la dégénérescence musculaire qui sera complétée par de l'IHC en vu de regarder la prolifération (Ki-67) et l'apoptose cellulaire (Caspase-3). La mobilisation des EPCs humaines sur site d'ischémie, leur arrangement en tubules endothéliaux et leur intégration aux vaisseaux sanguins natifs pourra être mise en évidence par ISH avec la sonde ALU associée à la détection de marqueurs endothéliaux murins comme CD31 et/ou CD105.

Conclusion

Nous avons développé un modèle murin d'AOMI qui intègre bon nombre de critères de médecine translationnelle. Notre modèle prend en considération des paramètres cliniques tels que la quantification de la reperfusion distale par imagerie Doppler, l'estimation des altérations nécrotiques du membre ischémié ou encore la mesure de l'atrophie des muscles. De plus, la dégénérescence musculaire qui est caractérisée par des altérations structurales et un changement du statut métabolique des muscles rappellent les manifestations cliniques de l'AOMI. Par ailleurs, nous avons mis en évidence la participation de l'angiogenèse, de l'artériogenèse et de la vasculogenèse lors de la revascularisation de notre modèle qui sont également des processus physiologiques apparentés à la néovascularisation chez l'Homme.

L'induction de l'ischémie de la patte par ligature proximale de l'artère fémorale chez la souris Balb/c nude permet d'obtenir un modèle d'étude qui présente des nécroses éthiquement acceptables et pour lequel la reperfusion post-ischémique fonctionnelle et modérée autorise l'évaluation de stratégies qui visent à stimuler la néovascularisation. Nous avons ainsi pu montrer le potentiel thérapeutique de la stimulation de la voie du FGF par le SAR X. Néanmoins, la greffe d'EPCs n'ayant pas montré de bénéfice sur notre modèle, nous projetons d'optimiser les conditions expérimentales pour associer ce concept de thérapie cellulaire à un prétraitement et/ou un co-traitement avec le SAR X.

Cependant, il faut noter des limites à notre modèle qui sont valables pour l'ensemble des modèles d'AOMI développés dans la littérature. Tout d'abord, nous utilisons des animaux sains qui présentent une ischémie aiguë alors que les patients ayant une maladie artérielle souffrent de divers troubles métaboliques menant à une ischémie chronique qui touche de nombreux territoires des membres inférieurs et qui est souvent bilatérale. Par ailleurs, dans la pathologie humaine les vaisseaux sanguins les plus exposés à l'occlusion sont principalement les vaisseaux de petit calibre comme les capillaires et les artérioles, mais plus rarement les grosses artères comme l'artère fémorale. Enfin, il semble intéressant de noter que dans le cadre des recherches cliniques, le traitement de l'AOMI est associé à une activité physique pour favoriser la récupération post-ischémique des patients. Ce paramètre d'étude reste cependant difficile à mettre en place avec des animaux de petite taille comme la souris.

Les modèles d'étude développés chez l'animal sont des modèles prédictifs de l'activité biologique chez l'Homme. Néanmoins, les origines multifactorielles de la pathologie ischémique et la complexité des régulations mise en jeu pour compenser le déficit vasculaire complique les

mises au point expérimentales. La composante inflammatoire dépendante du geste chirurgical et la brutalité de l'interruption du flux sanguin restent éloignées de la pathologie humaine. En effet, chez l'Homme l'obstruction du flux sanguin est un phénomène qui progresse lentement dans le temps. Il nous semble important de s'attacher à recréer une ischémie chronique pour évaluer le bénéfice de nouvelles stratégies thérapeutiques dans un cadre plus relevant de la pathologie humaine. Ainsi, nous prévoyons de caractériser (surement chez les souris Balb/c nude) un modèle d'AOMI chronique utilisant des anneaux constricteurs longtemps réservés pour les modèles développés chez le gros animal, mais depuis quelques années envisageables chez le rongeur¹⁰⁶. Ces anneaux dont le diamètre diminue lorsqu'ils sont hydratés par les fluides biologiques permettent d'obtenir une constriction progressive de l'artère qui on l'espère diminuerait la composante inflammatoire locale responsable d'une sécrétion accrue de facteurs de croissance qui n'est pas représentative de la situation ischémique constatée pendant l'installation d'une AOMI chez l'Homme.

Annexes

Annexe 1 : Souris NOD/SCID/IL2R γ ^{-/-} humanisées (NSGh).

Initialement des souris NOD/SCID adultes étaient irradiées de façon subléthale avant de recevoir une greffe de cellules CD34 humaines. Nous avons déterminé que les meilleures prises de greffe étaient obtenues avec des cellules de cordon ombilical fraîchement préparées (non congelées). Mais la proportion des cellules humaines parmi les cellules murines était faible, transitoire et hétérogène d'une souris à l'autre. Nous avons donc décidé d'utiliser des souris NOD/SCID/IL2R γ ^{-/-} (NSG) pour limiter le rejet de greffe. Cette souche immunodéprimée en lymphocytes T, B et NK est décrite en 2008 comme étant révolutionnaire dans le domaine des xénogreffes. Au même moment, le laboratoire de Léonard Schultz a développé les premiers essais de greffe de cellules CD34 humaines chez la souris NSG⁷⁰. Ainsi, après prise de contact et échange d'informations avec son équipe, nous avons envisagé de greffer des cellules CD34 humaines fraîchement prélevées à partir de cordon ombilical chez des souriceaux irradiés depuis un jour. Sanofi n'étant pas habilitée à préparer des cellules issues de cordon ombilical humain et à manipuler des souriceaux nouveau-nés, nous avons décidé de collaborer avec la société *Oncodesign* pour générer cette souche souris humanisées (NSGh). Dès leur naissance, les souriceaux sont irradiés (1,8 Grays) pour détruire les cellules souches natives (Figure 1). Des cellules souches hématopoïétiques fraîchement purifiées (24 heures, CD34+) à partir de sang de cordon ombilical sont administrées par voie intracardiaque aux souriceaux irradiés la veille. Après validation du chimérisme au niveau des différentes populations sanguines (globules rouges, globules blancs et plaquettes), la détection du marqueur de surface CD45 par cytométrie en flux a été sélectionnée comme étant suffisamment représentatif du chimérisme global. La prise de greffe est ainsi contrôlée à l'âge de 6 semaines (sang) par la détermination de la proportion de cellules CD45 humaines par rapport aux cellules CD45 murines.

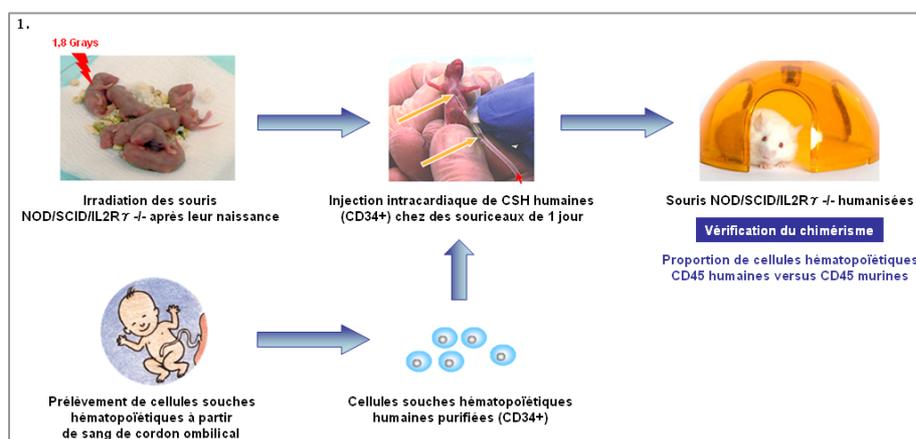


Figure 1 : Génération des souris NOD/SCID/IL2R γ ^{-/-} humanisées. Collaboration avec *Oncodesign*.

Annexe 2 : Le SAR X, un FGFR agoniste de synthèse.

Le SAR X est une petite molécule issue de la synthèse chimique des laboratoires Sanofi-Aventis qui a été développée pour activer la voie de signalisation du FGF et promouvoir ainsi la néovascularisation. Cette molécule hétérocyclique est formée par deux antagonistes des récepteurs aux FGF qui sont reliés par une structure chimique de petite taille (Figure 2). Le SAR X agit comme une "pince à sucre" qui induit la dimérisation du FGFR par rapprochement mécanique de deux monomères du récepteur qui sont chacun reconnus les deux antagonistes.

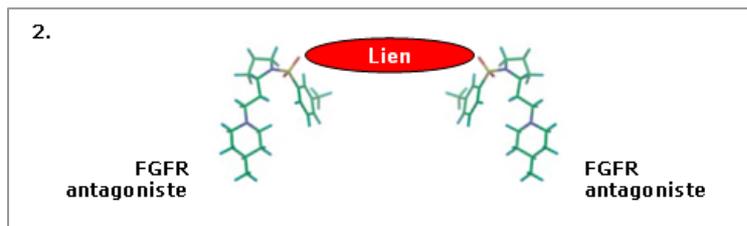


Figure 2 : Structure imagée du SAR X.

Le SAR X présente une forte affinité pour les FGFR-4 α , -2 α et -3 α (de l'ordre du nanomolaire) et une faible affinité pour le FGFR-1 α (sans liaison au récepteur FGFR-1 β). Etant donné que les cellules endothéliales expriment uniquement les récepteurs FGFR-4 et FGFR-1 β , les effets pro-angiogéniques du SAR X sont dépendants de la voie de transduction du FGFR-4. L'absence d'activation de la composante FGFR-1 évite la stimulation de la prolifération cellulaire et limite ainsi les effets pro-cancéreux attribués aux thérapies qui visent à stimuler la néovascularisation.

La spécificité du SAR X pour le FGFR-4 est confirmée *in vitro* sur des cellules endothéliales (HUVECs) en comparant son activité au FGF-19 et au FGF-4 qui sont respectivement des ligands spécifiques des récepteurs FGFR-4 et au FGFR-1. Les études mécanistiques montrent que le SAR X induit la phosphorylation du récepteur FGFR-4 et de la protéine Akt, et qu'il stimule l'internalisation des EEA1 (early endosome antigen 1) associés à l'internalisation du récepteur. Le SAR X montre des effets biologiques associés à l'activation du récepteur FGFR-4 endothélial : il stimule la sécrétion de VEGF, la migration haptotactique et la formation de tubules. Enfin, le SAR X protège les HUVECs de l'apoptose. Les capacités pro-angiogéniques du SAR X observées *in vitro* sont confirmées chez la souris. Il stimule la néovascularisation sur un modèle murin d'implant sous-cutané (modèle éponge) et favorise la cicatrisation et la reperfusion post-ischémique (AOMI) dans un contexte diabétique (souris db/db).

Annexe 3 : Liste d'exclusion des agents pathogènes recommandée par la FELASA.
(Federation of Laboratory Animal Science Associations).

38

FELASA Working Group on Health Monitoring of Rodent and Rabbit Colonies

Appendix 3 Health monitoring reports

Health Monitoring in Accordance with FELASA recommendations

Date of issue:

Location:

Housing: (Barrier/Non-Barrier/IVC/Isolator):

Species: Mouse

Strain: (Strain)

Species and strains present within the unit:

	Test frequency	Latest test date	Latest results	Testing laboratory	Test method	Historical results (≤ 18 months)
Viruses						
Mouse hepatitis virus	3 months					
Mouse rotavirus (EDIM)	3 months					
Parvoviruses						
Minute virus of mice	3 months					
Mouse parvovirus	3 months					
Pneumonia virus of mice	3 months					
Sendai virus	3 months					
Theiler's murine encephalomyelitis virus	3 months					
Ectromelia virus	Annually					
Lymphocytic choriomeningitis virus	Annually					
Mouse adenovirus type 1 (FL)	Annually					
Mouse adenovirus type 2 (K87)	Annually					
Mouse cytomegalovirus	Annually					
Reovirus type 3	Annually					
Additional organisms tested:						
Bacteria, mycoplasma and fungi						
<i>Citrobacter rodentium</i>	3 months					
<i>Clostridium piliforme</i> (Tyzzer's disease)	3 months					
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	3 months					
<i>Mycoplasma</i> spp.	3 months					
Pasteurellaceae	3 months					
<i>Salmonella</i> spp.	3 months					
Streptococci	3 months					
β-haemolytic (not group D)						
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3 months					
<i>Helicobacter</i> spp.	Annually					
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	Annually					
Additional organisms tested:						
Parasites						
Ectoparasites:						
Species designation	3 months					
Endoparasites:						
Species designation	3 months					
Pathological lesions observed	3 months					

Data are expressed as number positive/number tested

Positive findings in other species in the same unit:

Abbreviations used in this report:

ELISA = enzyme linked immunosorbent assay, MICR = microscopy, IFA = immunofluorescence assay, CULT = culture, PATH = gross pathology, PCR = polymerase chain reaction, HIST = histopathology, NT = not tested

Annexe 4 : Traitements des tissus et des coupes histologiques.

- **Inclusion des tissus en paraffine** : Automatisé (ASP300, *Leica*).

Les échantillons sont déshydratés pour que l'eau soit remplacée par de la paraffine (Tissue-Tek®

III embedding wax, *Sakura, ref 4502*) :

- Alcool 70° pendant 1 heure,
- Alcool 90 ° pendant 1 heure,
- Alcool 95 ° pendant 1 heure (X2),
- Alcool 100 ° pendant 1 heure (X2),
- Xylène pendant 1 heure (X3),
- Paraffine pendant 1h30 à 58°C (X3).

Pour finir, les tissus sont inclus en bloc de paraffine (Histoembedder, *Leica*).

- **Déshydratation des coupes de tissu** : Automatisée (Jung Autostainer XL, *Leica*).

Les lames sont plongées dans des bains successifs :

- Ethanol 50° pendant 2 minutes,
- Ethanol 70° pendant 2 minutes,
- Ethanol 90° pendant 2 minutes,
- Ethanol 100° pendant 2 minutes,
- Xylène pendant au moins 2 minutes.

- **Déparaffinage des coupes de tissu** : Automatisée (Jung Autostainer XL, *Leica*).

Dans le cadre de l'histologie associée à l'injection in vivo d'isolectine fluorescente.

Les lames sont plongées dans des bains successifs :

- Xylène pendant 2 minutes (X2),
- Ethanol 100° pendant 2 minutes,
- Ethanol 90° pendant 2 minutes,
- Ethanol 70° pendant 2 minutes,
- Ethanol 50° pendant 2 minutes,
- PBS pendant au moins 2 minutes.

Annexe 5 : Protocoles d'immunohistochimie.

Les Ac I sont dilués dans le Discovery AB Diluent (*Ventana, ref 760-108*) et les Ac II dans le Dako REAL AB Diluent (*Dako, ref S2022*).

IHC - CD105 murin

- 1 Prélèvement [Sélectionné]
- 2 Paraffine [Sélectionné]
- 3 Déparaffinage [Sélectionné]
- 4 Cell Conditioning [Sélectionné]
- 5 avec tampon CC2 (Cell Conditioner #2) [Sélectionné]
- 6 CC2 Court [Sélectionné]
- 7 CC2 Standard [Sélectionné]
- 8 Anticorps [Sélectionné]
- 9 Distribution automatique de l'anticorps [Sélectionné]
- 10 Incubation Ac standard [Sélectionné]
- 11 Déposer une goutte de [ANTIBODY 8] (Anticorps), et incuber [60 Minutes]
- 12 Anticorps Secondaire [Sélectionné]
- 13 Distribution automatique de l'Ac secondaire [Sélectionné]
- 14 Déposer une goutte de [DETECTION 6] (Détection 2), et incuber [32 Minutes]
- 15 Déposer une goutte de [UMap anti-Rb HRP] (Multimer HRP), Appliquer Coverslip, et incuber [16 Minutes]
- 16 Contre-coloration [Sélectionné]
- 17 Standard [Sélectionné]
- 18 Déposer une goutte de [HEMATOXYLIN II] (Contre-coloration), Appliquer Coverslip, et incuber [4 Minutes]
- 19 Post Contre-Coloration [Sélectionné]
- 20 Déposer une goutte de [BLUING REAGENT] (Post Contre-Coloration), Appliquer Coverslip, et incuber [4 Minutes]
- 21 Nettoyage des lames [Sélectionné]

CC2 (*Ventana, ref 760-107*), Coverslip (*Ventana, ref 250-009*), Antibody 8 = Ac I = Goat anti-mouse endoglin AB (*R&D Systems, ref AF1320*), Detection 6 = Ac II = AffiniPure Rabbit Anti-Goat IgG (H+L) (*Jackson ImmunoResearch, ref 305-005-045*), Chromo MAP DAB kit (*Ventana, ref 760-159*), OMNI MAP anti-rabbit HRP (*Ventana, ref 760-4311*), Hematoxylin II (*Ventana, ref 790-2208*) et Bluing reagent (*Ventana, ref 760-2037*).

IHC - F4-80 murin

- 1 Prélèvement [Sélectionné]
- 2 Paraffine [Sélectionné]
- 3 Déparaffinage [Sélectionné]
- 4 Enzyme [Sélectionné]
- 5 Déposer une goutte de [PROTEASE 3] (Enzyme), Appliquer Coverslip, et incuber [4 Minutes]
- 6 Blocage des biotines endogènes [Sélectionné]
- 7 Incuber [32 Minutes] (Avidine)
- 8 Incuber [32 Minutes] (Biotine)
- 9 Anticorps [Sélectionné]
- 10 Distribution automatique de l'anticorps [Sélectionné]
- 11 Incubation Ac standard [Sélectionné]
- 12 Déposer une goutte de [ANTIBODY 2] (Anticorps), et incuber [32 Minutes]
- 13 Anticorps Secondaire [Sélectionné]
- 14 Distribution automatique de l'Ac secondaire [Sélectionné]
- 15 Déposer une goutte de [DETECTION 2] (Détection 2), et incuber [32 Minutes]
- 16 Contre-coloration [Sélectionné]
- 17 Standard [Sélectionné]
- 18 Déposer une goutte de [HEMATOXYLIN II] (Contre-coloration), Appliquer Coverslip, et incuber [4 Minutes]
- 19 Post Contre-Coloration [Sélectionné]
- 20 Déposer une goutte de [BLUING REAGENT] (Post Contre-Coloration), Appliquer Coverslip, et incuber [4 Minutes]
- 21 Nettoyage des lames [Sélectionné]

Protease 3 (*Ventana, ref 760-2020*), Coverslip (*Ventana, ref 250-009*), Endogenous biotin blocking kit (*Ventana, ref 760-050*), Antibody 2 = Ac I = Rat anti-mouse F4-80 antigen clone BM8 (*Clinisciences, ref 14-4801*), Detection 2 = Ac II = Biotin-SP-AffiniPure Donkey Anti- Rat IgG (H+L) (*Jackson ImmunoResearch, ref 712-065-150*), IHC DAB MAP (*Ventana, ref 760-124*), Hematoxylin II (*Ventana, ref 790-2208*) et Bluing reagent (*Ventana, ref 760-2037*).

IHC - CD31 humain

- 1 Prélèvement [Sélectionné]
- 2 Paraffine [Sélectionné]
- 3 Déparaffinage [Sélectionné]
- 4 Cell Conditioning [Sélectionné]
- 5 avec tampon CC1 (Cell Conditioner #1) [Sélectionné]
- 6 CC1 Court [Sélectionné]
- 7 Anticorps [Sélectionné]
- 8 Distribution automatique de l'anticorps [Sélectionné]
- 9 Incubation Ac standard [Sélectionné]
- 10 Déposer une goutte de [CD31 (JC70)] (Anticorps), et incuber [60 Minutes]
- 11 Anticorps Secondaire [Sélectionné]
- 12 Distribution automatique de l'Ac secondaire [Sélectionné]
- 13 Déposer une goutte de [DETECTION 4] (Détection 2), et incuber [32 Minutes]
- 14 Déposer une goutte de [UMap anti-Rb HRP] (Multimer HRP), Appliquer Coverslip, et incuber [8 Minutes]
- 15 Contre-coloration [Sélectionné]
- 16 Standard [Sélectionné]
- 17 Déposer une goutte de [HEMATOXYLIN II] (Contre-coloration), Appliquer Coverslip, et incuber [8 Minutes]
- 18 Post Contre-Coloration [Sélectionné]
- 19 Déposer une goutte de [BLUING REAGENT] (Post Contre-Coloration), Appliquer Coverslip, et incuber [4 Minutes]
- 20 Nettoyage des lames [Sélectionné]

CC1 (*Ventana, ref 950-124*), Coverslip (*Ventana, ref 250-009*), CD31 = Ac I = Mouse anti-human CD31 clone JC70 (*Ventana, ref 760-4378*), Detection 4 = Ac II = Anti-Mouse IgG1 rabbit monoclonal AB clone M1gG51-4 (*Epitomics, ref 3030-1*), Chromo MAP DAB kit (*Ventana, ref 760-159*) et OMNI MAP anti-rabbit HRP (*Ventana, ref 760-4311*), Hematoxylin II (*Ventana, ref 790-2208*) et Bluing reagent (*Ventana, ref 760-2037*).

IHC - CD105 humain

- 1 Prélèvement [Sélectionné]
- 2 Paraffine [Sélectionné]
- 3 Déparaffinage [Sélectionné]
- 4 Enzyme [Sélectionné]
- 5 Déposer une goutte de [PROTEASE 1] (Enzyme), Appliquer Coverslip, et incuber [8 Minutes]
- 6 Blocage des biotines endogènes [Sélectionné]
- 7 Incuber [16 Minutes] (Avidine)
- 8 Incuber [16 Minutes] (Biotine)
- 9 Anticorps [Sélectionné]
- 10 Distribution automatique de l'anticorps [Sélectionné]
- 11 Incubation Ac prolongé [Sélectionné]
- 12 Déposer une goutte de [ANTIBODY 11] (Anticorps), et incuber [6 Heures]
- 13 Anticorps Secondaire [Sélectionné]
- 14 Distribution automatique de l'Ac secondaire [Sélectionné]
- 15 Déposer une goutte de [DETECTION 10] (Détection 2), et incuber [32 Minutes]
- 16 Contre-coloration [Sélectionné]
- 17 Standard [Sélectionné]
- 18 Déposer une goutte de [HEMATOXYLIN II] (Contre-coloration), Appliquer Coverslip, et incuber [8 Minutes]
- 19 Post Contre-Coloration [Sélectionné]
- 20 Déposer une goutte de [BLUING REAGENT] (Post Contre-Coloration), Appliquer Coverslip, et incuber [4 Minutes]
- 21 Nettoyage des lames [Sélectionné]

Protease 1 (*Ventana, ref 760-2318*), Coverslip (*Ventana, ref 250-009*), Endogenous biotin blocking kit (*Ventana, ref 760-050*), Antibody 11 = Ac I = Rabbit anti-human CD105 receptor (*Thermo Lab Vision, ref RB-9291*), Detection 10 = Ac II = Biotin-SP-AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) (*Jackson ImmunoResearch, ref 711-065-152*), DAB MAP kit (*Ventana, ref 760-124*), Hematoxylin II (*Ventana, ref 790-2208*) et Bluing reagent (*Ventana, ref 760-2037*).

Annexe 6 : Protocole d'hybridation *in situ* avec la sonde ALU.

L'Ac II est dilué dans le Dako REAL AB Diluent (Dako, ref S2022).

ISH - Sonde ALU

- 1 Prélèvement [Sélectionné]
- 2 Paraffine [Sélectionné]
- 3 Déparaffinage [Sélectionné]
- 4 Fixative [Sélectionné]
- 5 Déposer une goutte de [RiboPrep] (Fixative), Appliquer Coverslip, et incuber 4 Minutes
- 6 Chauffer la lame à [37 Deg C], et Incuber [32 Minutes] (Standard)
- 7 Prétraitement 1 [Sélectionné]
- 8 Utiliser Tampon EZ pour PT1 [Sélectionné]
- 9 Chauffage des lames pour PT1-EZ [Sélectionné]
- 10 Chauffer la lame à [37 Deg C], et Incuber 4 Minutes (Prétraitement 1 Temp EZ)
- 11 Déposer une goutte de [RiboClear] (Prétraitement 1), Appliquer Coverslip, et incuber [12 Minutes]
- 12 Cell Conditioning [Sélectionné]
- 13 avec tampon CC2 (Cell Conditioner #2) [Sélectionné]
- 14 CC2 Court [Sélectionné]
- 15 Prétraitement 2 [Sélectionné]
- 16 Utiliser Reaction Buffer pour PT2 [Sélectionné]
- 17 Chauffage des lames pour PT2-RB [Sélectionné]
- 18 Chauffer la lame à [37 Deg C], et Incuber 4 Minutes (Prétraitement 2 Temp RB)
- 19 Déposer une goutte de [PROTEASE 3] (Enzyme), Appliquer Coverslip, et incuber [20 Minutes]
- 20 Sonde [Sélectionné]
- 21 Dépôt automatique de la sonde [Sélectionné]
- 22 Déposer une goutte de [Alu POS CTL] (Sonde), Appliquer Coverslip, et incuber 4 Minutes
- 23 Chauffer la lame à [85 Deg C], et Incuber [8 Minutes] (Dénaturation)
- 24 Chauffer la lame à [47 Deg C], et Incuber 4 Minutes (Hybridation)
- 25 Incuber [1 Heure] (Hybridation)
- 26 Lavage de Stringence 1 [Sélectionné]
- 27 Rincer avec User Wash #1 [2,0X SSC]
- 28 Chauffer la lame à [45 Deg C], et Incuber [4 Minutes] (Lavage de Stringence 1)
- 29 Lavage de Stringence 2 [Sélectionné]
- 30 Rincer avec User Wash #2 [2,0X SSC]
- 31 Chauffer la lame à [45 Deg C], et Incuber [4 Minutes] (Lavage de Stringence 2)
- 32 Post Fixation [Sélectionné]
- 33 Déposer une goutte de [RiboFix] (Post Fixation), Appliquer Coverslip, et incuber [20 Minutes]
- 34 Anticorps [Sélectionné]
- 35 Distribution automatique de l'anticorps [Sélectionné]
- 36 Incubation Ac standard [Sélectionné]
- 37 Déposer une goutte de [ANTIBODY 4] (Anticorps), et incuber [32 Minutes]
- 38 Incuber [1 Heure] (Substrat)
- 39 Contre-coloration [Sélectionné]
- 40 Standard [Sélectionné]
- 41 Déposer une goutte de [Red Stain II] (Contre-coloration), Appliquer Coverslip, et incuber [8 Minutes]
- 42 Nettoyage des lames [Sélectionné]

RiboPrep, RiboClear et RiboFix : RiboMAP kit (Ventana, ref 760-102), EZ buffer (Ventana, ref 750-100), Coverslip (Ventana, ref 250-009), CC2 (Ventana, ref 760-107), Reaction buffer (Ventana, ref 950-300), Protease 3 (Ventana, ref 760-2020), ALU = ALU positive control probe (Ventana, ref 800-2845), Wash : Ribowash (Ventana, ref 760-105), Antibody 4 = Ac II = Biotin-SP-conjugated IgG fraction monoclonal mouse anti-fluorescein FITC (Jackson ImmunoResearch, ref 200-062-037), BlueMAP kit (Ventana, ref 760-120), Red stain II (Ventana, ref 780-2218).

Annexe 7 : Protocoles des colorations structurales.

- **Trichrome de Masson** : Automatisé (Jung Autostainer XL, *Leica*).

Le déparaffinage des tissus est réalisé au début du protocole (bains de xylène et d'éthanol).

Coloration Trichrome de Masson

- 1 Xylène pendant 2 minutes (x2),
- 2 Ethanol 100° pendant 2 minutes (x2),
- 3 Ethanol 95° pendant 2 minutes (x2),
- 4 Eau distillée pendant 2 minutes,
- 5 Hémalun de Mayer pendant 10 minutes,
- 6 Rinçage à l'eau courante pendant 5 minutes,
- 7 Fushine Ponceau 1 % pendant 5 minutes,
- 8 Eau distillée pendant 5 minutes (x2),
- 9 Acide phosphomolybdique 1 % pendant 5 minutes,
- 10 Vert lumière 1 % pendant 5 minutes,
- 11 Eau acétique 1 % pendant 5 minutes
- 12 Ethanol 100° pendant 2 minutes (x2),
- 13 Xylène pendant 2 minutes (x2).

Acide phosphomolybdique (*Fluka, ref 79560*), Fushine Ponceau (*Reactif RAL, ref 313200-0025*), Hémalun de Mayer (*Reactif RAL, ref 320550-1000*), Vert lumière (*Reactif RAL, ref 32077-6*).

- **Hématoxyline** : La coloration est réalisée en utilisant le module de contre-coloration du Discovery XT (*Ventana*). Le déparaffinage des tissus est réalisé par la chaleur.

Coloration hématoxyline

- 1 Prélèvement [Sélectionné]
- 2 Paraffine [Sélectionné]
- 3 Déparaffinage [Sélectionné]
- 4 Contre-coloration [Sélectionné]
- 5 Standard [Sélectionné]
- 6 Déposer une goutte de [HEMATOXYLIN II] (Contre-coloration), Appliquer Coverslip, et incuber [8 Minutes]
- 7 Post Contre-Coloration [Sélectionné]
- 8 Déposer une goutte de [BLUING REAGENT] (Post Contre-Coloration), Appliquer Coverslip, et incuber [4 Minutes]
- 9 Nettoyage des lames [Sélectionné]

Coverslip (*Ventana, ref 250-009*), Hematoxylin II (*Ventana, ref 790-2208*) et Bluing reagent (*Ventana, ref 760-2037*).

Annexe 8 : Conditions de culture des EPCs et des HUVECs.

Les EPCs d'origine humaine (*ABCell-Bio, ref PEC-CT-CG*) sont cultivées en flasques ventilées T25 (*Falcon, ref 35-3109*) dans du milieu EBM-2 (*Lonza, ref CC-3156*) auquel nous rajoutons de l'EGM-2 SingleQuots® (*Lonza, ref CC-4176*). Le milieu EBM-2 complet, contient ainsi du sérum de veau fœtal (2%), de l'hydrocortisone, du hFGF, du VEGF, du hEGF, du R³-IGF-1, du GA-1000 (gentamicine, amphotéricine B), de l'acide ascorbique et de l'héparine. Les EPCs sontensemencées à 20000 cellules/cm².

Les HUVECs (*Lonza, ref C-12200*) sont cultivées en flasques ventilées T75 coatées collagène (*BD Biocoat, ref 356485*) dans du milieu EBM (*Lonza, ref CC-3129*) + SingleQuots® (*Lonza, ref CC-4133*). Parmi les différents SingleQuots®, nous rajoutons seulement le sérum de veau fœtal (2%) et le hEGF. Le milieu est enrichi par l'ajout extemporané d'héparine à 100 µg/mL final (*Sigma-Aldrich, ref H3393*) et de l'endothelial cell growth supplement à 30 µg/mL (*BD Biosciences, ref 356006*). Les HUVECs sontensemencées à 25000 cellules/cm².

Récupération des cellules pour l'entretien de la lignée ou leur utilisation in vivo.

Le tapis cellulaire est lavé avec du PBS avant d'ajouter de l'accutase (*Sigma-Aldrich, ref A6964*) qui permet le décollement des cellules. Les flasques sont incubées 5 minutes à 37°C. L'action enzymatique de l'accutase est inhibée par ajout de milieu de culture. Les cellules sont ensuite culotées par centrifugation (température ambiante, 5 minutes, 400 g). Selon leur utilisation, les cellules sont reprises dans du PBS (expérimentations *in vivo*) ou du milieu de culture spécifique (entretien de la lignée). Un comptage cellulaire est réalisé en cellule de Malassez.

Références bibliographiques

- 1- Badimon L, Storey RF, Vilahur G. Update on lipids, inflammation and atherothrombosis. *Thromb Haemost.* 2011; 105(Suppl 1):S34-42.
- 2- Arkkila PE. Thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). *Orphanet J Rare Dis.* 2006; 1:14.
- 3- Gallois P, Vallée J.P, Le Noc Y. Artériopathie des membres inférieurs : fréquente mais méconnue. *Médecine* 200 ; 2(6):267-72.
- 4- Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med.* 2003; 9(6):677-84.
- 5- Markkanen JE, Rissanen TT, Kivelä A, Ylä-Herttuala S. Growth factor-induced therapeutic angiogenesis and arteriogenesis in the heart--gene therapy. *Cardiovasc Res.* 2005; 65(3):656-64. Review.
- 6- Schaper W, Scholz D. Factors regulating arteriogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2003; 23(7):1143-51.
- 7- Roca C, Adams RH. Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling. *Genes Dev.* 2007; 21(20):2511-24. Review.
- 8- Obi S, Yamamoto K, Shimizu N, Kumagaya S, Masumura T, Sokabe T, Asahara T, Ando J. Fluid shear stress induces arterial differentiation of endothelial progenitor cells. *Journal of Applied Physiology* 2009; 106(1):203-11.
- 9- Böttcher RT, Niehrs C. Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocr Rev.* 2005; 26(1):63-77.
- 10- Tsuboi R, Sato Y, Rifkin DB. Correlation of cell migration, cell invasion, receptor number, proteinase production, and basic fibroblast growth factor levels in endothelial cells. *J Cell Biol.* 1990; 110(2):511-7.
- 11- Nourse MB, Rolle MW, Pabon LM, Murry CE. Selective control of endothelial cell proliferation with a synthetic dimerizer of FGF receptor-1. *Lab Invest.* 2007; 87(8):828-35.
- 12- Deindl E, Hoefler IE, Fernandez B, Barancik M, Heil M, Strniskova M, Schaper W. Involvement of the fibroblast growth factor system in adaptive and chemokine-induced arteriogenesis. *Circ Res.* 2003; 92(5):561-8.
- 13- Karsan A, Yee E, Poirier GG, Zhou P, Craig R, Harlan JM. Fibroblast growth factor-2 inhibits endothelial cell apoptosis by Bcl-2-dependent and independent mechanisms. *Am J Pathol.* 1997; 151(6):1775-84.
- 14- Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, Gualandris A, Pintucci G, Robbins ES, Shapiro RL, Galloway AC, Rifkin DB, Mignatti P. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J Cell Biol.* 1998; 141(7):1659-73.
- 15- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996; 380(6573):439-42.
- 16- Rahimi N. VEGFR-1 and VEGFR-2: two non-identical twins with a unique physiognomy. *Front Biosci.* 2006; 11:818-29.

- 17- Dorey K, Amaya E. FGF signalling: diverse roles during early vertebrate embryogenesis. *Development*. 2010; 137(22):3731-42. Review.
- 18- Zakrzewska M, Krowarsch D, Wiedlocha A, Olsnes S, Otlewski J. Structural requirements of FGF-1 for receptor binding and translocation into cells. *Biochemistry*. 2006; 45(51):15338-48.
- 19- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, Zee R, Li T, Witzenbichler B, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275(5302):964-67.
- 20- Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *New England Journal of Medicine* 2005; 353(10):999-1007.
- 21- Tepper OM, Capla JM, Galiano RD, Ceradini DJ, Callaghan MJ, Kleinman ME, Gurtner GC. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood* 200 ; 105(3):1068-77.
- 22- Li B, Sharpe EE, Maupin AB, Teleron AA, Pyle AL, Carmeliet P, Young PP. VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *FASEB J*. 2006; 20(9):1495-7.
- 23- Jin DK, Shido K, Kopp HG, Petit I, Shmelkov SV, Young LM, Hooper AT, Amano H, Avecilla ST, Heissig B, Hattori K, Zhang F, Hicklin DJ, Wu Y, Zhu Z, Dunn A, Salari H, Werb Z, Hackett NR, Crystal RG, Lyden D, Rafii S. Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4+ hemangiocytes. *Nature Medicine* 2006; 12(5):557-67.
- 24- Tongers J, Roncalli JG, Losordo DW. Role of endothelial progenitor cells during ischemia-induced vasculogenesis and collateral formation. *Microvasc Res*. 2010; 79(3):200-6.
- 25- Burger PE, Coetzee S, McKeehan WL, Kan M, Cook P, Fan Y, Suda T, Hebbel RP, Novitzky N, Muller WA, Wilson EL. Fibroblast growth factor receptor-1 is expressed by endothelial progenitor cells. *Blood*. 2002; 100(10):3527-35.
- 26- Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, Oh BH, Lee MM, Park YB. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasclogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2004; 24(2):288-93.
- 27- Hosaka A, Koyama H, Kushibiki T, Tabata Y, Nishiyama N, Miyata T, Shigematsu H, Takato T, Nagawa H. Gelatin hydrogel microspheres enable pinpoint delivery of basic fibroblast growth factor for the development of functional collateral vessels. *Circulation*. 2004; 110(21):3322-8.
- 28- Li Y, Hazarika S, Xie D, Phippen AM, Kontos CD, Annex BH. In mice with type 2 diabetes, a vascular endothelial growth factor (VEGF)-activating transcription factor modulates VEGF signaling and induces therapeutic angiogenesis after hindlimb ischemia. *Diabetes*. 2007; 56(3):656-65.
- 29- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circulation Research* 1999; 85(3):221-28.
- 30- Lazarous DF, Unger EF, Epstein SE, Stine A, Arevalo JL, Chew EY, Quyyumi AA. Basic fibroblast growth factor in patients with intermittent claudication: results of a phase I trial. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 36(4):1239-44.
- 31- Comerota AJ, Throm RC, Miller KA, Henry T, Chronos N, Laird J, Sequeira R, Kent CK, Bacchetta M, Goldman C, Salenius JP, Schmieder FA, Pilsudski R. Naked plasmid DNA encoding fibroblast growth

factor type 1 for the treatment of end-stage unreconstructible lower extremity ischemia: preliminary results of a phase I trial. *J Vasc Surg.* 2002; 35(5):930-6.

32- Mäkinen K, Manninen H, Hedman M, Matsi P, Mussalo H, Alhava E, Ylä-Herttuala S. Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study. *Molecular Therapy* 2002; 6(1):127-33.

33- Lederman RJ, Mendelsohn FO, Anderson RD, Saucedo JF, Tenaglia AN, Hermiller JB, Hillegass WB, Rocha-Singh K, Moon TE, Whitehouse MJ, Annex BH; TRAFFIC Investigators. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet* 2002; 359(9323):2053-8.

34- Rajagopalan S, Trachtenberg J, Mohler E, Olin J, McBride S, Pak R, Rasmussen H, Crystal R. Phase I study of direct administration of a replication deficient adenovirus vector containing the vascular endothelial growth factor cDNA (CI-1023) to patients with claudication. *Am J Cardiol.* 2002; 90(5):512-6.

35- Mohler ER 3rd, Rajagopalan S, Olin JW, Trachtenberg JD, Rasmussen H, Pak R, Crystal RG. Adenoviral-mediated gene transfer of vascular endothelial growth factor in critical limb ischemia: safety results from a phase I trial. *Vasc Med.* 2003; 8(1):9-13.

36- Rajagopalan S, Mohler ER 3rd, Lederman RJ, Mendelsohn FO, Saucedo JF, Goldman CK, Blebea J, Macko J, Kessler PD, Rasmussen HS, Annex BH. Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation* 2003; 108(16):1933-8.

37- Shyu KG, Chang H, Wang BW, Kuan P. Intramuscular vascular endothelial growth factor gene therapy in patients with chronic critical leg ischemia. *Am J Med.* 2003; 114(2):85-92.

38- Matyas L, Schulte KL, Dormandy JA, Norgren L, Sowade O, Grötzbach G, Palmer-Kazen U, Rubanyi GM, Wahlberg E. Arteriogenic gene therapy in patients with unreconstructable critical limb ischemia: a randomized, placebo-controlled clinical trial of adenovirus 5-delivered fibroblast growth factor-4. *Hum Gene Ther.* 2005; 16(10):1202-11.

39- Kusumanto YH, van Weel V, Mulder NH, Smit AJ, van den Dungen JJ, Hooymans JM, Sluiter WJ, Tio RA, Quax PH, Gans RO, Dullaart RP, Hospers GA. Treatment with intramuscular vascular endothelial growth factor gene compared with placebo for patients with diabetes mellitus and critical limb ischemia: a double-blind randomized trial. *Human Gene Therapy* 200 ; 17(6):683-91.

40- Powell RJ, Simons M, Mendelsohn FO, Daniel G, Henry TD, Koga M, Morishita R, Annex BH. Results of a double-blind, placebo-controlled study to assess the safety of intramuscular injection of hepatocyte growth factor plasmid to improve limb perfusion in patients with critical limb ischemia. *Circulation.* 2008; 118(1):58-65.

41- Nikol S, Baumgartner I, Van Belle E, Diehm C, Visoná A, Capogrossi MC, Ferreira-Maldent N, Gallino A, Wyatt MG, Wijesinghe LD, Fusari M, Stephan D, Emmerich J, Pompilio G, Vermassen F, Pham E, Grek V, Coleman M, Meyer F; TALISMAN 201 investigators. Therapeutic angiogenesis with intramuscular NV1FGF improves amputation-free survival in patients with critical limb ischemia. *Molecular therapy* 2008; 16(5):972-8.

42- Morishita R, Makino H, Aoki M, Hashiya N, Yamasaki K, Azuma J, Taniyama Y, Sawa Y, Kaneda Y, Ogihara T. Phase I/IIa clinical trial of therapeutic angiogenesis using hepatocyte growth factor gene transfer to treat critical limb ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31(3):713-20.

- 43-** Belch J, Hiatt WR, Baumgartner I, Driver IV, Nikol S, Norgren L, Van Belle E; TAMARIS Committees and Investigators. Effect of fibroblast growth factor NV1FGF on amputation and death: a randomised placebo-controlled trial of gene therapy in critical limb ischaemia. *Lancet*. 2011; 377(9781):1929-37.
- 44-** Capiod JC, Tournois C, Vitry F, Sevestre MA, Daliphard S, Reix T, Nguyen P, Lefrère JJ, Pignon B. Characterization and comparison of bone marrow and peripheral blood mononuclear cells used for cellular therapy in critical leg ischaemia: towards a new cellular product. *Vox Sang*. 2009; 96(3):256-65.
- 45-** Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T; Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation (TACT) Study Investigators. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360(9331):427-35.
- 46-** Miyamoto M, Yasutake M, Takano H, Takagi H, Takagi G, Mizuno H, Kumita S, Takano T. Therapeutic angiogenesis by autologous bone marrow cell implantation for refractory chronic peripheral arterial disease using assessment of neovascularization by 99mTc-tetrofosmin (TF) perfusion scintigraphy. *Cell Transplant*. 2004; 13(4) 429-37.
- 47-** Durdu S, Akar AR, Arat M, Sancak T, Eren NT, Ozyurda U. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation for patients with Rutherford grade II-III thromboangiitis obliterans. *J Vasc Surg*. 2006; 44(4):732-9.
- 48-** Hernández P, Cortina L, Artaza H, Pol N, Lam RM, Dorticós E, Macías C, Hernández C, del Valle L, Blanco A, Martínez A, Díaz F. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation in patients with severe lower limb ischaemia: a comparison of using blood cell separator and Ficoll density gradient centrifugation. *Atherosclerosis*. 2007; 194(2):e52-6.
- 49-** Bartsch T, Brehm M, Zeus T, Kögler G, Wernet P, Strauer BE. Transplantation of autologous mononuclear bone marrow stem cells in patients with peripheral arterial disease (the TAM-PAD study). *Clin Res Cardiol*. 2007; 96(12):891-9.
- 50-** Saito Y, Sasaki K, Katsuda Y, Murohara T, Takeshita Y, Okazaki T, Arima K, Katsuki Y, Shintani S, Shimada T, Akashi H, Ikeda H, Imaizumi T. Effect of autologous bone-marrow cell transplantation on ischemic ulcer in patients with Buerger's disease. *Circ J*. 2007; 71(8):1187-92.
- 51-** Huang PP, Yang XF, Li SZ, Wen JC, Zhang Y, Han ZC. Randomised comparison of G-CSF-mobilized peripheral blood mononuclear cells versus bone marrow-mononuclear cells for the treatment of patients with lower limb arteriosclerosis obliterans. *Thromb Haemost*. 2007; 98(6):1335-42.
- 52-** Matoba S, Tatsumi T, Murohara T, Imaizumi T, Katsuda Y, Ito M, Saito Y, Uemura S, Suzuki H, Fukumoto S, Yamamoto Y, Onodera R, Teramukai S, Fukushima M, Matsubara H; TACT Follow-up Study Investigators. Long-term clinical outcome after intramuscular implantation of bone marrow mononuclear cells (Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation [TACT] trial) in patients with chronic limb ischemia. *Am Heart J*. 2008; 156(5):1010-8.
- 53-** Walter DH, Krankenberg H, Balzer JO, Kalka C, Baumgartner I, Schlüter M, Tonn T, Seeger F, Dimmeler S, Lindhoff-Last E, Zeiher AM; PROVASA Investigators. Intraarterial administration of bone marrow mononuclear cells in patients with critical limb ischemia: a randomized-start, placebo-controlled pilot trial (PROVASA). *Circ Cardiovasc Interv*. 2011; 4(1):26-37.
- 54-** Huang P, Li S, Han M, Xiao Z, Yang R, Han ZC. Autologous transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells improves critical limb ischemia in diabetes. *Diabetes Care*. 2005; 28(9):2155-60.

- 55-** Yang XF, Wu Y, Wang H, Xu Y, Xu B, Lu X, zang F, Zhang Y. Transplantation of mobilized peripheral blood mononuclear cells for peripheral arterial occlusive disease of the lower extremity. *Journal of Geriatric Cardiology* 2006; 3(3):181-83.
- 56-** Kawamura A, Horie T, Tsuda I, Abe Y, Yamada M, Egawa H, Iida J, Sakata H, Onodera K, Tamaki T, Furui H, Kukita K, Meguro J, Yonekawa M, Tanaka S. Clinical study of therapeutic angiogenesis by autologous peripheral blood stem cell (PBSC) transplantation in 92 patients with critically ischemic limbs. *J Artif Organs*. 2006; 9(4):226-33.
- 57-** Tateno K, Minamino T, Toko H, Akazawa H, Shimizu N, Takeda S, Kunieda T, Miyauchi H, Oyama T, Matsuura K, Nishi J, Kobayashi Y, Nagai T, Kuwabara Y, Iwakura Y, Nomura F, Saito Y, Komuro I. Critical roles of muscle-secreted angiogenic factors in therapeutic neovascularization. *Circ Res*. 2006; 98(9):1194-202.
- 58-** Kawamoto A, Katayama M, Handa N, Kinoshita M, Takano H, Horii M, Sadamoto K, Yokoyama A, Yamanaka T, Onodera R, Kuroda A, Baba R, Kaneko Y, Tsukie T, Kurimoto Y, Okada Y, Kihara Y, Morioka S, Fukushima M, Asahara T. Intramuscular transplantation of G-CSF-mobilized CD34(+) cells in patients with critical limb ischemia: a phase I/IIa, multicenter, single-blinded, dose-escalation clinical trial. *Stem Cells*. 2009; 27(11):2857-64.
- 59-** Elewa HF, El-Remessy AB, Somanath PR, Fagan SC. Diverse effects of statins on angiogenesis: new therapeutic avenues. *Pharmacotherapy*. 2010; 30(2):169-76.
- 60-** Hu Z, Zhang F, Yang Z, Yang N, Zhang D, Zhang J, Cao K. Combination of simvastatin administration and EPC transplantation enhances angiogenesis and protects against apoptosis for hindlimb ischemia. *J Biomed Sci*. 2008; 15(4):509-17.
- 61-** Couffinhal T, Silver M, Kearney M, Sullivan A, Witzenbichler B, Magner M, Annex B, Peters K, Isner JM. Impaired collateral vessel development associated with reduced expression of vascular endothelial growth factor in ApoE^{-/-} mice. *Circulation*. 1999; 99(24):3188-98.
- 62-** Westvik TS, Fitzgerald TN, Muto A, Maloney SP, Pimiento JM, Fancher TT, Magri D, Westvik HH, Nishibe T, Velazquez OC, Dardik A. Limb ischemia after iliac ligation in aged mice stimulates angiogenesis without arteriogenesis. *J Vasc Surg*. 2009; 49(2):464-73.
- 63-** Peng X, Wang J, Lassance-Soares RM, Najafi AH, Sood S, Aghili N, Alderman LO, Panza JA, Faber JE, Wang S, Epstein SE, Burnett MS. Gender differences affect blood flow recovery in a mouse model of hindlimb ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 300(6):H2027-34.
- 64-** Goto T, Fukuyama N, Aki A, Kanabuchi K, Kimura K, Taira H, Tanaka E, Wakana N, Mori H, Inoue H. Search for appropriate experimental methods to create stable hind-limb ischemia in mouse. *Tokai J Exp Clin Med*. 2006; 31(3):128-32.
- 65-** Couffinhal T, Silver M, Zheng LP, Kearney M, Witzenbichler B, Isner JM. Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol*. 1998; 152(6):1667-79.
- 66-** Niiyama H, Huang NF, Rollins MD, Cooke JP. Murine model of hindlimb ischemia. *J Vis Exp*. 2009; (23):1035.
- 67-** Izquierdo E, Cañete JD, Celis R, Santiago B, Usategui A, Sanmartí R, Del Rey MJ, Pablos JL. Immature blood vessels in rheumatoid synovium are selectively depleted in response to anti-TNF therapy. *PLoS One*. 2009; 4(12):e8131.
- 68-** Oses P, Renault MA, Chauvel R, Leroux L, Allières C, Séguéy B, Lamazière JM, Dufourcq P, Couffinhal T, Duplâa C. Mapping 3-dimensional neovessel organization steps using micro-computed

tomography in a murine model of hindlimb ischemia-brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29(12):2090-2.

69- Mieno S, Clements RT, Boodhwani M, Sodha NR, Ramlawi B, Bianchi C, Sellke FW. Characteristics and function of cryopreserved bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Ann Thorac Surg.* 2008; 85(4):1361-6.

70- Kumar P, Ban HS, Kim SS, Wu H, Pearson T, Greiner DL, Laouar A, Yao J, Haridas V, Habiro K, Yang YG, Jeong JH, Lee KY, Kim YH, Kim SW, Peipp M, Fey GH, Manjunath N, Shultz LD, Lee SK, Shankar P. T cell-specific siRNA delivery suppresses HIV-1 infection in humanized mice. *Cell.* 2008; 134(4):577-86.

71- Barbara NP, Wrana JL, Letarte M. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem.* 199 ; 274(2):584-94.

72- Chai C, Leong KW. Biomaterials approach to expand and direct differentiation of stem cells. *Mol Ther.* 2007; 15(3):467-80.

73- Martens TP, Godier AF, Parks JJ, Wan LQ, Koeckert MS, Eng GM, Hudson BI, Sherman W, Vunjak-Novakovic G. Percutaneous cell delivery into the heart using hydrogels polymerizing in situ. *Cell Transplant.* 2009; 18(3):297-304.

74- Suuronen EJ, Veinot JP, Wong S, Kapila V, Price J, Griffith M, Mesana TG, Ruel M. Tissue-engineered injectable collagen-based matrices for improved cell delivery and vascularization of ischemic tissue using CD133+ progenitors expanded from the peripheral blood. *Circulation.* 2006; 114(1 Suppl):I138-44.

75- Pandis L, Zavan B, Bassetto F, Ferroni L, Iacobellis L, Abatangelo G, Lepidi S, Cortivo R, Vindigni V. Hyaluronic acid biodegradable material for reconstruction of vascular wall: a preliminary study in rats. *Microsurgery.* 2011; 31(2):138-45.

76- Hayen W, Goebeler M, Kumar S, Riessen R, Nehls V. Hyaluronan stimulates tumor cell migration by modulating the fibrin fiber architecture. *J Cell Sci.* 1999; 112 (Pt 13):2241-51.

77- Tang ZC, Liao WY, Tang AC, Tsai SJ, Hsieh PC. The enhancement of endothelial cell therapy for angiogenesis in hindlimb ischemia using hyaluronan. *Biomaterials.* 2011; 32(1):75-86.

78- Chalothorn D, Clayton JA, Zhang H, Pomp D, Faber JE. Collateral density, remodeling, and VEGF-A expression differ widely between mouse strains. *Physiol Genomics.* 2007; 30(2):179-91.

79- Helisch A, Wagner S, Khan N, Drinane M, Wolfram S, Heil M, Ziegelhoeffer T, Brandt U, Pearlman JD, Swartz HM, Schaper W. Impact of mouse strain differences in innate hindlimb collateral vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26(3):520-6.

80- Silvestro A, Scopacasa F, Ruocco A, Oliva G, Schiano V, Zincarelli C, Brevetti G. Inflammatory status and endothelial function in asymptomatic and symptomatic peripheral arterial disease. *Vasc Med.* 2003; 8(4):225-32.

81- Magri D, Vasilas P, Muto A, Fitzgerald TN, Fancher TT, Feinstein AJ, Nishibe T, Dardik A. Elevated monocytes in patients with critical limb ischemia diminish after bypass surgery. *J Surg Res.* 2011; 167(1):140-50.

82- Petrkova J, Szotkowska J, Hermanova Z, Lukl J, Petrek M. Monocyte chemoattractant protein-1 in patients with peripheral arterial disease. *Mediators Inflamm.* 2004; 13(1):39-43.

- 83-** Satiroglu O, Uydu HA, Demir A, Bostan M, Atak M, Bozkurt E. Association between plasma monocyte chemoattractant protein-1 levels and the extent of atherosclerotic peripheral artery disease. *Tohoku J Exp Med.* 2011; 224(4):301-6.
- 84-** Askew CD, Green S, Walker PJ, Kerr GK, Green AA, Williams AD, Febbraio MA. Skeletal muscle phenotype is associated with exercise tolerance in patients with peripheral arterial disease. *J Vasc Surg.* 2005; 41(5):802-7.
- 85-** Mitchell RG, Duscha BD, Robbins JL, Redfern SI, Chung J, Bensimhon DR, Kraus WE, Hiatt WR, Regensteiner JG, Annex BH. Increased levels of apoptosis in gastrocnemius skeletal muscle in patients with peripheral arterial disease. *Vasc Med.* 2007; 12(4):285-90.
- 86-** McGuigan MR, Bronks R, Newton RU, Sharman MJ, Graham JC, Cody DV, Kraemer WJ. Muscle fiber characteristics in patients with peripheral arterial disease. *Med Sci Sports Exerc.* 2001; 33(12):2016-21.
- 87-** Bhat HK, Hiatt WR, Hoppel CL, Brass EP. Skeletal muscle mitochondrial DNA injury in patients with unilateral peripheral arterial disease. *Circulation.* 1999; 99(6):807-12.
- 88-** Brass EP, Hiatt WR. Acquired skeletal muscle metabolic myopathy in atherosclerotic peripheral arterial disease. *Vasc Med.* 2000; 5(1):55-9.
- 89-** Rexroth W, Hageloch W, Isgro F, Koeth T, Manzl G, Weicker H. Influence of peripheral arterial occlusive disease on muscular metabolism. Part 1: Changes in lactate, ammonia, and hypoxanthine concentration in femoral blood. *Klin Wochenschr.* 1989; 67(11):576-82.
- 90-** Visser M, Pahor M, Taaffe DR, Goodpaster BH, Simonsick EM, Newman AB, Nevitt M, Harris TB. Relationship of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha with muscle mass and muscle strength in elderly men and women: the Health ABC Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2002; 57(5):M326-32.
- 91-** Rohde E, Malischnik C, Thaler D, Maierhofer T, Linkesch W, Lanzer G, Guelly C, Strunk D. Blood monocytes mimic endothelial progenitor cells. *Stem Cells.* 2006; 24(2):357-67.
- 92-** Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979; 76(1):333-7.
- 93-** Maddox DE, Shibata S, Goldstein IJ. Stimulated macrophages express a new glycoprotein receptor reactive with Griffonia simplicifolia I-B4 isolectin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982; 79(1):166-70.
- 94-** Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(7):3422-7.
- 95-** Duraisamy Y, Slevin M, Smith N, Bailey J, Zweit J, Smith C, Ahmed N, Gaffney J. Effect of glycation on basic fibroblast growth factor induced angiogenesis and activation of associated signal transduction pathways in vascular endothelial cells: possible relevance to wound healing in diabetes. *Angiogenesis.* 2001; 4(4):277-88.
- 96-** Komi-Kuramochi A, Kawano M, Oda Y, Asada M, Suzuki M, Oki J, Imamura T. Expression of fibroblast growth factors and their receptors during full-thickness skin wound healing in young and aged mice. *J Endocrinol.* 2005; 186(2):273-89.
- 97-** Nguyen EH, Schwartz MP, Murphy WL. Biomimetic approaches to control soluble concentration gradients in biomaterials. *Macromol Biosci.* 2011; 11(4):483-92.

- 98-** Marics I, Padilla F, Guillemot JF, Scaal M, Marcelle C. FGFR4 signaling is a necessary step in limb muscle differentiation. *Development*. 2002; 129(19):4559-69.
- 99-** Zhao P, Caretti G, Mitchell S, McKeehan WL, Boskey AL, Pachman LM, Sartorelli V, Hoffman EP. Fgfr4 is required for effective muscle regeneration in vivo. Delineation of a MyoD-Tead2-Fgfr4 transcriptional pathway. *J Biol Chem*. 2006; 281(1):429-38.
- 100-** Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol*. 2001 ; 91(2) : 534-51. Review. Erratum in: *J Appl Physiol* 2001; 91(6):2414.
- 101-** Zemani F, Silvestre JS, Fauvel-Lafeve F, Bruel A, Vilar J, Bieche I, Laurendeau I, Galy-Fauroux I, Fischer AM, Boisson-Vidal C. Ex vivo priming of endothelial progenitor cells with SDF-1 before transplantation could increase their proangiogenic potential. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28(4):644-50.
- 102-** Zhou B, Bi YY, Han ZB, Ren H, Fang ZH, Yu XF, Poon MC, Han ZC. G-CSF-mobilized peripheral blood mononuclear cells from diabetic patients augment neovascularization in ischemic limbs but with impaired capability. *J Thromb Haemost*. 2006; 4(5):993-1002.
- 103-** Maguire T, Novik E, Schloss R, Yarmush M. Alginate-PLL microencapsulation: effect on the differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes. *Biotechnol Bioeng*. 2006; 93(3):581-91.
- 104-** Wang X, Chen J, Tao Q, Zhu J, Shang Y. Effects of ox-LDL on number and activity of circulating endothelial progenitor cells. *Drug Chem Toxicol*. 2004; 27(3):243-55.
- 105-** Zhang W, Wang X, Jin H, Qian R, Zhang G, Chen S, Hu R. Effects of high glucose plus high insulin on proliferation and apoptosis of mouse endothelial progenitor cells. *Inflamm Res*. 2008; 57(12):571-6.
- 106-** Yang Y, Tang G, Yan J, Park B, Hoffman A, Tie G, Wang R, Messina LM. Cellular and molecular mechanism regulating blood flow recovery in acute versus gradual femoral artery occlusion are distinct in the mouse. *J Vasc Surg*. 2008; 48(6):1546-58.