



HAL
open science

Analyse du site d'implantation de produits de thérapie cellulaire dans un modèle d'ischémie des membres inférieurs

Rida Al-Rifai

► **To cite this version:**

Rida Al-Rifai. Analyse du site d'implantation de produits de thérapie cellulaire dans un modèle d'ischémie des membres inférieurs. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Reims Champagne Ardenne URCA, 2018. Français. NNT : . tel-02125290

HAL Id: tel-02125290

<https://hal.science/tel-02125290>

Submitted on 10 May 2019

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

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

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES FONDAMENTALES SANTE (SFS)

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : Biologie cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par

RIDA AL-RIFAI

Le 18 décembre 2018

**Analyse du site d'implantation de produits de thérapie cellulaire dans un modèle
d'ischémie des membres inférieurs**

Thèse dirigée par **PHILIPPE NGUYEN**

JURY

M Philippe NGUYEN,	Professeur,	CHU Reims,	Directeur de thèse
Mme Claire TOURNOIS,	Maître de Conférences,	Université de Reims Champagne Ardenne,	Co- Directrice de thèse
Mme Danièle BENSOUSSAN,	Professeur,	CHU Nancy,	Rapporteur
M Gilles PERNOD,	Professeur,	CHU Grenoble,	Rapporteur
M Abdelilah BELJEBBAR,	Maître de Conférences HDR,	Université de Reims Champagne Ardenne	
Mme Marie-Antoinette SEVESTRE,	Professeur,	CHU Amiens,	
Mme Catherine BOISSON-VIDAL,	Directeur de Recherche,	Inserm UMR 1140	
M Ambroise DUPREY,	Professeur,	CHU Reims	

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : Biologie cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par

RIDA AL-RIFAI

Le 18 décembre 2018

**Analyse du site d'implantation de produits de thérapie cellulaire dans un modèle
d'ischémie des membres inférieurs**

Thèse dirigée par **PHILIPPE NGUYEN**

JURY

M Philippe NGUYEN,	Professeur,	CHU Reims,	Directeur de thèse
Mme Claire TOURNOIS,	Maître de Conférences,	Université de Reims Champagne Ardenne,	Co- Directrice de thèse
Mme Danièle BENSOUSSAN,	Professeur,	CHU Nancy,	Rapporteur
M Gilles PERNOD,	Professeur,	CHU Grenoble,	Rapporteur
M Abdelilah BELJEBBAR,	Maître de Conférences HDR,	Université de Reims Champagne Ardenne	
Mme Marie-Antoinette SEVESTRE,	Professeur,	CHU Amiens,	
Mme Catherine BOISSON-VIDAL,	Directeur de Recherche,	Inserm UMR 1140	
M Ambroise DUPREY,	Professeur,	CHU Reims	

Remerciements :

Je tiens à remercier le Professeur **Philippe Nguyen** qui m'a encadrée, accueillie au sein du laboratoire et qui m'a fait partager sa rigueur durant mes trois années de thèse. Je vous remercie également pour la bienveillance et le support que vous m'avez témoignés. Je vous exprime également ma gratitude pour la disponibilité que vous avez pu m'accorder et pour vos qualités humaines qui ont été une réelle source de motivation.

Je remercie également le Docteur **Claire Tournois** pour m'avoir confié ce grand projet qui m'a tenue à cœur et que nous avons su porter, sans relâche, le plus loin possible. Je vous remercie de m'avoir encadrée, d'avoir cru en moi et de m'avoir encouragée. Merci également pour la relecture, la correction et la rédaction consciencieuses de ma thèse. Je vous remercie pour votre patience et pour l'aboutissement de ce travail.

Merci au Docteur **Abdelilah Beljebbar**, avec qui nous avons collaboré, pour son expertise en spectroscopie. Ce travail est le fruit d'une belle collaboration que nous avons tenue durant ma thèse. Je vous remercie pour votre disponibilité, votre aide précieuse et votre gentillesse.

Je remercie beaucoup le Professeur **Caroline François** pour m'avoir formée patiemment et rigoureusement aux techniques chirurgicales sur le petit rongeur. Cette formation a été fondamentale et passionnante pour moi.

Je remercie le Professeur **Danièle Bensoussan** et le Professeur **Gilles Pernod** pour l'honneur qu'ils m'ont m'accordé en acceptant d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Je remercie également le Professeur **Marie-Antoinette Sevestre**, le Docteur **Catherine Boisson-Vidal**, le Professeur **Ambroise Duprey** et le Docteur **Abdelilah Beljebbar** d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse.

Je remercie tout particulièrement et très sincèrement **Gaël Poitevin**, pour ton soutien et ton aide inconditionnels pour absolument tout ; tant pour les manip, les commandes et la « logistique » du labo. Merci d'avoir été là, de m'avoir encouragée et d'avoir atténué des moments parfois difficiles.

Un grand merci à **Nicole Bouland** pour son aide très précieuse en histologie et pour ses conseils avisés. Merci également pour sa disponibilité, sa gentillesse et ses cafés très réconfortants.

Je remercie également **Caroline Fichel** pour ses conseils et son aide concernant mes manip en immunofluorescence.

Je remercie **Samar Kheirallah** pour sa grande gentillesse et son aide dans l'interprétation anatomopathologique des coupes histologiques.

Je remercie le Docteur **Catherine Boisson-Vidal** et **Blandine Dizier** qui m'ont conseillée et aidée sur le modèle animal et la thérapie cellulaire. Je les remercie pour nos échanges très enrichissants.

Je remercie énormément **Catherine Deroche** et **Catherine Macé** pour leur immense aide en culture qui m'a été indispensable.

Je remercie énormément les étudiants de Master 1 qui se sont succédés durant ma thèse et qui m'ont aidée. Il a été vraiment très agréable de travailler : **Aurore Bruhier**, **Rémi Tilmont**, **Lucie Rigolot** et **Victor Fournier**. Je vous remercie pour votre motivation, votre gentillesse, votre sérieux et même votre dévouement.

Je remercie du fond du cœur **Laura Jayyosi** pour tout ce que nous avons partagé durant ma dernière année de thèse : les manips et les chirurgies à l'animalerie, la surveillance parfois désespérée des dernières gouttes d'isoflurane, l'affection pour les rats, nos *runnings* munies de nos montres connectées à estimer notre VMA, nos conversations allant du plus sérieux comme l'exploration anatomique de l'abdomen du rongeur au moins sérieux comme le dernier shopping compulsif de vêtements. J'ai beaucoup apprécié de travailler à tes côtés.

Un grand merci à **Jérémy Orillon** pour sa passion contagieuse et pour sa motivation irréprouvable de prodiguer de bons conseils à ses collègues en expérimentation animale et dans la réalisation des manips. Merci à sa *playlist* musicale qui nous a permis de meubler des heures à l'animalerie coupés du monde extérieur avant d'aller manger nos éternels sandwiches pas toujours très sains. Je continue d'apprécier notre complicité, nos conversations enrichissantes sans oublier ton humour omniprésent.

Je n'oublierai pas de remercier très sincèrement **Marie Guillon**, ma première collègue de bureau arrivée à Reims en même temps que moi. Ce qui nous a d'ailleurs permis de tester un bon paquet de restaurants pour découvrir la ville! J'ai beaucoup apprécié nos soirées et admiré ton sens du partage. Je te remercie aussi pour le cintre du vestiaire, il te revient désormais « *fais-en bon usage* » (#Harry Potter à l'école des sorciers)

Je remercie le Docteur **Jean Szymezak** pour son aide en informatique qui m'a été très précieuse pour l'analyse des résultats et la rédaction.

Je remercie le Docteur **Zoubir Djerada** pour ses encouragements, ses conseils et son aide méthodologique. J'exprime de profonds remerciements envers **Catherine Feliu** pour son énergie, **Yoann Cazaubon** pour sa détermination qui est source de motivation, **Hélène Peyret** et **Floriane Oszust** pour leurs qualités humaines et leur gentillesse.

Je tiens également à remercier le Docteur **Christine Terryn** pour son expertise en microscopie et son aide dans l'utilisation dans l'analyse des résultats obtenus en immunofluorescence.

Je remercie **Anthony Pigeon** et **Perrine Manot** pour leur aide à l'animalerie, leur patience et leur gentillesse.

Je remercie également le Docteur **Pascale Cornillet-Lefebvre** pour ses conseils en biologie moléculaire. J'ai également admiré ta bonne humeur, ton énergie débordante et ta grande générosité.

Je remercie **Vanessa Oudin** pour sa gentillesse, son aide et sa disponibilité.

Je remercie **Lucile Gillot** pour son aide en biologie moléculaire.

Je remercie également **Nicolas Correia**, **Laurine Pouzet**, **Antoine Liné** et **Nadia Boudaoud** pour nos conversations le midi, la plupart centrée sur ma thèse.

Je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui m'ont soutenue durant ma thèse et qu'il été agréable de rencontrer : **Manon Doué** pour son ouverture d'esprit, **Vincent Dupont** pour son calme et sa gentillesse, **Amandine Wahart** pour sa bonne humeur débordante, **Camille Bour** et **Camille Fuselier** pour leur gentillesse, **Emilie Sablon** pour ses conseils fitness, **Raphaël Dicaprio** pour sa « devise » 5 fruits et légumes par jour, **Valérie Creuza** pour sa gentillesse et sa compassion devant mes efforts de dernière ligne droite, **Elodie Dufailly** pour son soutien et sa gentillesse.

Merci à toutes les personnes que j'ai été heureuse de rencontrer : le Professeur **Bernard Pignon**, le Professeur **Sylvain Dukic**, le Professeur **Aude Marchal**, **Anaëlle Muggeo**, **Anamaria Babosan**, **Alexandre Pierre**, **Annie David**, **Aurélie Moniot**, le Docteur **Aurélie Trussardi**, le Docteur **Carine Lafon Lecoq** (alias KL), **Davy Mandin**, **Laura Daussin**, **Marie Dubus**, **Marius Colin**, le Docteur **Sandie Escotte**, le Docteur **Sandra Audonnet**, **Sophie Guillou**, **Sylvie Sauvage**, **Saviz Nasri**, **Christelle Coquelet**, **Thomas Levasseur**, **Véronique Fabre**, **Céline Muller**, **Carine Lion**, **Sandrine Pluot**, **Claire Pluchart**.

Un grand merci à toutes les personnes rencontrées à Reims que je n'ai pas pu citer

Un merci infini à toute l'équipe formidable de la pharmacie Cœur de Ville, ma deuxième famille : Je remercie **Philippe Dacosta-Noble** pour son soutien et ses qualités humaines. Je remercie très sincèrement tous les membres de l'équipe pour avoir supporté mes coups de fatigue et pour m'avoir soutenue indéfectiblement depuis le début : **Sandrine Dumont**, **Hélène Couybes**, **Anne Gratias**, **Jean-Pierre Gimenez**, **Patrice Chaumont**, **Chris Xia**, **Françoise Pidancier**, **Nicole Chouet**, **Nadine Lherault**, **Isabelle Adamo**, **Béatrice Gomez**, **Margaux Ferreira**, **Roxane Ferreira Kpodar**, **Stéphane Capra**, **Julien Lhuillier**, **Eléonore Dacosta-Noble**

Je remercie **Lise** pour tout ce qu'elle a été, pour son sourire inoubliable et pour ce qu'elle m'a appris.

Enfin je tiens à remercier ma famille, mes proches et mes amis ; mes **parents** pour qui aucun mot ne suffirait ; vous avez fait de moi la personne que je suis, vous m'avez soutenue avec ferveur dans la poursuite de mes études et vous avez toujours été un support et un réconfort. Je remercie mes sœurs **Rim** et **Sarah** et mes frères **Moe** et **Has'** pour notre grande complicité, nos confidences, nos éclats de rire, nos dîners de famille nombreuse avec aucune chaise appariée. Merci à ma petite nièce **Loulou** qui veut être une grande fille. Je remercie également **Alexandre** (alias Zayat) pour notre complicité, son humour et sa fidélité. Merci également à **Mouss** pour sa spontanéité et son énergie. Je remercie également mon oncle **Omar** pour ses encouragements. Je remercie très sincèrement **Myriam**, **Laure** qui tient absolument à ce que je sois Docteur, bébé **Aline**, **Ghina** et **Zouheir Zayat**.

Pour terminer je remercie l'équipe de **France de Football** d'avoir gagné la coupe du Monde cette année ; une seconde étoile décrochée l'année de ma soutenance et qui rappelle 1998, premier sacre des bleus et année de soutenance du Professeur Phillippe Nguyen ! **

- **Is this a holdup?**
- **It's a science experiment!**

Back to the Future

Résumé :

Analyse du site d'implantation de produit de thérapie cellulaire dans un modèle d'ischémie critique des membres inférieurs

L'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI) est une affection vasculaire obstructive athéroscléreuse. Elle touche 20% des plus de 70 ans. L'ischémie critique des membres inférieurs (ICMI) est le stade ultime et nécessite une revascularisation. La thérapie cellulaire (TC) tente de promouvoir l'angiogenèse chez les patients en impasse thérapeutique. Les cellules souches mésenchymateuses (MSCs) sont des cellules candidates prometteuses à la TC, car elles associent des propriétés pro-angiogéniques et immunomodulatrices. L'objectif de cette thèse a été : 1) d'évaluer dans un modèle murin d'ischémie de la patte, l'efficacité de deux types de MSCs injectées dans le membre ischémié : les MSCs indifférenciées et les MSCs « *endothelial like* » (MELs) en les comparant aux cellules médullaires de patients atteints d'ICMI; 2) d'analyser le membre ischémié par spectroscopie Raman.

Les MELs et les MSCs ont induit une restauration complète du flux et une amélioration fonctionnelle du membre. Aucune nécrose n'a été signalée après administration des MELs. Histologiquement, les MELs ont induit les taux les plus élevés de néoangiogenèse et de régénération musculaire. La spectroscopie Raman différencie un tissu ischémié d'un tissu sain et indique une augmentation du ratio lipide/protide au cours de l'ischémie.

Notre étude conclut que les MELs rétablissent le flux sanguin et permettent la réparation musculaire. La spectroscopie Raman est une technique non invasive et sensible pouvant être utilisée pour évaluer l'ischémie chez les patients atteints d'ICMI.

Mots clefs : ischémie, cellules souches mésenchymateuses, ischémie des membres inférieurs, thérapie cellulaire



Thèse réalisée au sein de l'unité EA3801

HERVI : Hémostase et Remodelage Vasculaire post-Ischémie

Université de Reims Champagne Ardenne, UFR de Médecine

dirigée par le Pr Philippe Nguyen

Abstract:

Analysis of the implantation site of cell therapy products in hindlimb ischemia model

Peripheral artery disease (PAD) is an atherosclerotic obstructive disease affecting lower limbs arteries. It affects nearly 20% of over 70s. Critical limb ischemia (CLI) is the ultimate stage and requires revascularization. Cell therapy (CT) has been proposed for patients with CLI. Mesenchymal stem cells (MSCs) may be a better option as they combine angiogenic and immunomodulatory properties. MSCs can be obtained from bone marrow derived cells (BMCs) of CLI-patients. The aim of this study was first to evaluate, in a murine hindlimb ischemia model, the efficacy of two types of MSCs: undifferentiated MSCs and “endothelial-like” MSCs (MELs) in comparison with currently used BMCs. Secondly, the objective was to perform a non-invasive analysis of ischemic limb using Raman Spectroscopy.

MELs and MSCs induced complete perfusion restoration whereas BMCs did not. The complete flow recovery was significantly earlier with MELs in comparison with MSCs. Both MSCs and MELs improved functionality more efficiently than BMCs. Interestingly, complete limb salvage was observed in the MELs treated group exclusively. In muscles, MELs induced the highest rate of neoangiogenesis and the best muscle repair as shown by the presence of regenerated myofibers. Spectral acquisitions revealed that Raman spectroscopy can discriminate ischemic limb from healthy limb and can grade ischemia over time.

Our study brings evidence that MELs obtained from CLI-patients can restore blood flow and provide muscle repair. Moreover, Raman spectroscopy could be used clinically to assess ischemia in CLI-patients.

Keywords: ischemia, mesenchymal stem cells, peripheral arterial disease, cell therapy



Thèse réalisée au sein de l'unité EA3801

HERVI : Hémostase et Remodelage Vasculaire post-Ischémie

Université de Reims Champagne Ardenne, UFR de Médecine

dirigée par le Pr Philippe Nguyen

Liste des travaux réalisés au cours de la thèse

Thèse effectuée au sein de l'unité : EA3801 – HERVI : Hémostase et Remodelage Vasculaire post-Ischémie.

Dirigée par le Pr P. Nguyen à l'Université de Reims Champagne Ardenne, UFR de Médecine

- **Liste des publications** :

Cell therapy in critical limb ischemia: A comprehensive analysis of two cell therapy products, Claire Tournois, Bernard Pignon, Marie-Antoinette Sevestre, Rida Al-Rifai, Valérie Creuza, Gaël Poitevin, Caroline François & Philippe Nguyen, Volume 19, Issue 2, 299- 310, 2017

***In vivo* efficacy of endothelial like mesenchymal stem cells derived from patients with critical limb ischemia**, Rida Al-Rifai, Philippe Nguyen, Nicole Bouland, Christine Terryn, Lukshe Kanagaratnam, Gaël Poitevin, Caroline François, Catherine Boisson-Vidal, Marie-Antoinette Sevestre, and Claire Tournois, soumis dans *Journal of Translational Medicine*

Subcutaneous and transcutaneous monitoring of murine Hindlimb ischemia by *in vivo* Raman spectroscopy, Rida Al-Rifai, Claire Tournois, Samar Kheirallah, Nicole Bouland, Gaël Poitevin, Philippe Nguyen, Abdelilah Beljebbar, soumis dans *Analyst*

- **Liste des congrès** :

Poster : 02 – 05 Mai 2018 : ISCT annual meeting (Montreal, Canada), R.Al-Rifai, N.Bouland, C.Terryn, C.François, B.Dizier, P.Nguyen, C.Tournois , “***In vivo* efficacy of human Mesenchymal Stem Cells in comparison with human Bone Marrow derived Cells in a murine hindlimb ischemia model**”, *Cytotherapy* Volume 20, Issue 5, Supplement, May 2018, Pages S27-S28

Poster : 11 – 13 October 2018 : 2nd Congress of the Francophone Society of Nephrology, Dialysis and Transplantation (Nice, France), **Role of Uremia and AGE Receptor (RAGE) in post-ischemic revascularization**, V.Dupont, R.Al-Rifai, L.Jayyosi, J.Ortillon, C.François, P.Rieu, G.Poitevin, S.Jaïsson, C.Boulagnon-Rombi, A.Marchal, C.Tournois, P.Nguyen, F.Touré

Poster : 14 – 16 October 2018 : 8th Congress of the Francophone Society of Angiogenesis (Reims, France), **Angiogenic potential of endothelial like mesenchymal stem cells derived from patients with critical limb ischemia**, R.Al-Rifai, N.Bouland, C.Terryn, G.Poitevin, B.Dizier, P.Nguyen, C.Tournois

Poster : 18 – 19 October 2018 : 3rd Conference of Stem Cells and Cancer (Montreal, Canada), **Endothelial like Mesenchymal Stem Cells from critical limb ischemia patients provide blood flow recovery and muscle repair *in vivo***, R.Al-Rifai, N.Bouland, C.Terryn, G.Poitevin, B.Dizier, P.Nguyen, C.Tournois

Liste des abréviations utilisées :

ABI : *Ankle brachial index*

ALDH : Aldéhyde déshydrogénase

AOMI : Artériopathie oblitérante des membres inférieurs

AVC : Accident vasculaire cérébral

ADA : *American Diabete Association*

ADSCs : *Adipose tissue derived stem cells*

Ang-2 : Angiopoïétine 2

BM-MNCs : *Bone Marrow-Mononuclear Cells*

CD : *Cluster of Differentiation*

CDH5 : *Ve-Cadherine, Cadhein-5, (CD144)*

CFU : *Colony-Forming Unit*

c-kit : Tyrosine kinase receptor (*ou KIT*) CD117

CMF : Cytométrie en flux

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CML : Cellules musculaires lisses

CRP : Protéine C reactive

CXCL12 : *Stroma cell derived factor-1 (SDF-1, Stromal derived factor 1)*

CXCR4 : *LPS-associated protein-3, CD184*

ECs : *Endothelial cells*

ECFCs : *Endothelial colony forming cells*

eNOs : *endothelial Nitric Oxyde Synthase*

EPCs : *Endothelial progenitor cells*

FGF : *Fibroblast growth factor*

GM-CSF: *Granulocyte Macrophage-Colony stimulating factor-2*

HIF : *Hypoxia inducible factor*

HLIM : *Hind limb ischemia model*

HSCs : *Hematopoïetic stem cells (cellules souches hématopoïétiques)*

IA : Intra-artériel

ICMI : Ischémie critique des membres inférieurs

ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule-1 (CD54)

IDM : Infarctus du myocarde

IL : Interleukine
IGF-1: *insulin-like growth factor-1*
IM : Intramusculaire
IPS : Index de pression systolique
IRC : insuffisance rénale chronique
IV : Intraveineuse
LASCA : *Laser speckle contrast analysis*
LDL : *Low density lipoprotein*
Ly : Lymphocytes
LDPI : Imagerie de perfusion laser Doppler
MACs : *Myeloid Angiogenic Cells*
M-CSF : *Macrophage-Colony stimulating factor-1*
MEC (ou ECM) : Matrice extracellulaire
MCAM : *Melanoma adhesion molecule (CD146)*
MCP-1 : *Monocyte chemoattractant protein-1*
MMPs : Métalloprotéinases
MNCs : *Mononuclear Cells*
MO : moelle osseuse
MSCs : *Mesenchymal Stem Cells* (cellules souches mésenchymateuses)
NF- κ B : *nuclear factor kappa B*
NO : Monoxyde d'azote
NOs : NO synthase
PAS : Pression artérielle systolique
PAD : Pression artérielle diastolique
PB-MNCs : *Peripheral blood- Mononuclear Cells*
PDGF : *Platelet-derived growth factor*
PECAM-1 : *Platelet endothelial cell adhesion molecule -1 (CD31)*
PHD : *Propyl-hydroxylase*
PIGF : *Placental growth factor*
PNN : Polynucléaire neutrophile
PTC (ou CTP) : Produit de thérapie cellulaire
ROS : *Reactive oxygen species*
sc : sous-cutané
SCF : *Stem cell factor* (ou c-Kit ligand)

sKitL : *soluble Kit Ligand*

TA : Tissu adipeux

TASC : *Transatlantic Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease*

TcPO₂ : Pression transcutanée en oxygène

TGF : *Transforming growth factor*

TIMPs : *Tissue inhibitor of metalloproteinases*

TNF : *Tumor necrosis factor*

THBS2 : *Thrombospondin-2*

VCAM : *Vascular cell adhesion molecule (CD106)*

VEGF : *Vascular endothelial growth factor*

VEGFR-s : récepteurs au VEGF (VEGFR-1 ou flt-1 ; VEGFR-2 ou KDR ; VEGFR-3 ou flt-4)

Sommaire :

I. L'ARTERIOPATHIE OBLITERANTE DES MEMBRES INFERIEURS...21

A. Introduction générale	21
B. Epidémiologie	21
C. Facteurs de risque	22
D. Classification	25
1. Phase asymptomatique	25
2. Ischémie d'effort ou claudication intermittente.....	25
3. Ischémie de repos : stade ultime	27
E. Diagnostic.....	29
1. Examen clinique	29
2. Index de pression systolique (IPS)	30
3. Périmètre de marche	31
4. Pression transcutanée en oxygène	31
5. Echographie Doppler.....	32
6. Angiographie	32
F. Marqueurs de l'évolution.....	33
G. Prise en charge.....	33
1. Prévention : amélioration du mode de vie et réduction des facteurs de risque 34	
2. Prise en charge médicamenteuse	35
3. Intervention chirurgicale	36
4. Amputation	40
H. Physiopathologie de l'athérosclérose	40

II. MODELES MURINS D'ISCHEMIE DES MEMBRES INFERIEURS44

A. Choix du modèle expérimental.....	44
B. Choix de l'espèce	46
C. Choix de la technique chirurgicale	46
D. Choix de la souche	49
E. Age et comorbidités associées	50
1. Age.....	50
2. Comorbidités associées	50
F. Durée de suivi des animaux.....	51

III. CELLULES SOUCHES ET PROGENITRICES.....52

A. Cellules souches hématopoïétiques (HSCs).....	53
B. Les Progéniteurs endothéliaux cellulaires (EPCs)	55
1. EPCs précoces ou <i>Early EPCs</i>	55
2. EPCs tardifs ou <i>Late EPCs</i>	56
C. Les Cellules souches mésenchymateuses (MSCs).....	58
1. Origine, amplification <i>in vitro</i> et immunophénotypage	59
a) Origine des MSCs et amplification <i>in vitro</i>	59
b) Immunophénotypage.....	60
2. Différenciation <i>in vitro</i> des MSCs :.....	60
3. Caractéristiques immunologiques des MSCs :.....	61
4. MSCs et réparation tissulaire	62
5. Mécanisme d'action des MSCs et utilisation dans les modèles précliniques d'ischémie	62
a) Mécanisme d'action des MSCs	62
b) Etudes précliniques.....	65

IV. REVASCULARISATION POST-ISCHEMIQUE : MECANISMES

CELLULAIRES ET MOLECULAIRES71

A. Croissance et remodelage vasculaire : rôle dans la réparation des tissus ischémiés. 71

1. Différents processus régissent la croissance vasculaire post-ischémique .. 71
 - a) Vasculogénèse..... 71
 - b) Angiogénèse 72
 - c) Artériogénèse..... 73
 - d) Réseau vasculaire collatéral 73
2. Croissance vasculaire post-ischémique et remodelage tissulaire 75

B. L'hypoxie et la revascularisation post-ischémique 78

1. Les différents acteurs de la revascularisation post-ischémique..... 78
 - a) HIF 78
 - b) VEGF 80
 - c) FGF 82
 - d) PDGF 83
 - e) Monoxyde d'azote 83
 - f) Angiopoïétines..... 84
2. HIF et les acteurs clefs de la genèse vasculaire 84
3. HIF et la voie inflammatoire 85

C. Inflammation et revascularisation post-ischémique 85

1. Cellules myéloïdes et la néovascularisation 85
 - a) Les polynucléaires neutrophiles (PNN) 85
 - b) Les Monocytes/Macrophages (Mo/M) 86
2. Cellules lymphoïdes et la néovascularisation. 87
3. Mécanismes de mobilisation de la moelle osseuse vers le sang..... 88
 - a) Inhibition de la rétention au sein de la moelle osseuse 89

b) CSF (Colony-Stimulating Factor)	90
4. Tropisme des cellules pour la zone ischémisée	91
a) CCL2 / CCR2	92
b) CX3CL1 / CXCR3	92
c) CXCL12 / CXCR4.....	92
5. Roulement, arrêt et transmigration des cellules dans le tissu ischémique... 92	
a) Roulement des cellules grâce aux Sélectines	92
b) Arrêt des cellules grâce aux intégrines.....	93
c) Transmigration endothéliale	93
6. Devenir des cellules dans le tissu ischémique	93
a) Action directe : différenciation et intégration des cellules.....	94
b) Action indirecte : effet paracrine.....	95
c) Interaction avec le tissu hôte.....	95

V. THERAPIE CELLULAIRE DANS L'ISCHEMIE CRITIQUE DES

MEMBRES INFERIEURS98

A. Contexte 98

B. Thérapie par facteur de croissance..... 98

1. Thérapie génique..... 98

2. Thérapie protéique

C. Thérapie cellulaire 99

1. Cellules mononucléées issues de la moelle osseuse (BM-MNCs) ou du sang périphérique (PB-MNCs)..... 104

a) Etude pilote chez l'homme

b) Essais de Phase I/II..... 105

c) Modifications apportées au protocole initial de l'essai TACT

d) Essais randomisés

2. Cellules triées : cellules CD34 ⁺ ; CD133 ⁺ ou à activité ALDH	116
a) Cellules triées CD34 ⁺	117
b) Cellules triées CD133 ⁺	117
c) Cellules avec une haute activité ALDH	117
3. Cellules souches mésenchymateuses.....	119
4. Méta-analyses : Efficacité de la TC	122
VI. LA SPECTROSCOPIE RAMAN AU SERVICE DE L’AOMI	128
A. Altération du muscle squelettique et dysfonction mitochondriale	128
B. La spectroscopie Raman	130
C. Applications biomédicales de la spectroscopie Raman.....	133
D. L’utilisation de la spectroscopie Raman dans l’AOMI.....	135
VII. ARTICLE 1	136
VIII. ARTICLE 2	154
IX. ARTICLE 3.....	196
X. DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	231
XI. REFERENCES	239

Liste des figures :

Figure 1 : Localisation de la douleur musculaire associée au site obstrué	26
Figure 2 : Définition de l'ICMI	28
Figure 3 : Pied ischémié présentant une gangrène du gros orteil	28
Figure 4 : Index de pression systolique	30
Figure 5 : Techniques de revascularisation chirurgicale et endovasculaire	38
Figure 6 : Algorithme décisionnel pour la prise en charge des patients AOMI	39
Figure 7 : Physiopathologie de l'athérosclérose	43
Figure 8 : Différents modèles expérimentaux	45
Figure 9 : Modèle de ligature de l'artère fémorale	47
Figure 10 : Différentes techniques chirurgicales	48
Figure 11 : Les cellules de la moelle osseuse	53
Figure 12 : Représentation de la maturation des différentes lignées cellulaires dans la MO.....	54
Figure 13 : Méthodologies utilisées pour étudier les EPCs.....	57
Figure 14 : Méthodes de préparation des EPCs tardives et précoces humaines	58
Figure 15 : Les MELs forment des pseudo-tubes en Matrigel® in vitro	65
Figure 16 : Mécanismes de réparation vasculaire	72
Figure 17 : Phénomènes et mécanismes orchestrant la revascularisation	74
Figure 18 : Réparation tissulaire post-ischémique	77
Figure 19 : Rôle et mécanisme d'action de HIF1- α	79
Figure 20 : VEGF et ses récepteurs	81
Figure 21 : Les étapes cellulaires de l'angiogenèse	82
Figure 22 : Réponse inflammatoire post-ischémique	87
Figure 23 : Mobilisation des EPCs pour la revascularisation	88
Figure 24 : Mobilisation de cellules souches dérivées de la moelle osseuse	91
Figure 25 : Recrutement, infiltration et potentiel pro-angiogénique des différentes cellules inflammatoires	97
Figure 26 : Différentes sources de cellules utilisées en thérapie cellulaire	102
Figure 27 : Protocoles d'administration IM des cellules	103
Figure 28 : Différentes sources de cellules utilisées en thérapie cellulaire et leur potentiel	103
Figure 29 : Thérapie cellulaire dans l'AOMI.....	105

Figure 30 : Sources des MSCs, pouvoir de différenciation et rôle immunomodulateur	119
Figure 31 : Résultats des analyses des essais randomisés contrôlés	126
Figure 32 : Histologie muscle normal et AOMI	129
Figure 33 : Diffusion de la lumière	131
Figure 34 : Diagramme de Jablonski	132

Liste des tableaux :

Tableau I : Classification de l'AOMI selon des critères cliniques et selon les classifications de Leriche-Fontaine et Rutherford.....	25
Tableau II : Caractéristiques des MACs et des ECFCs	57
Tableau III : Essais précliniques de TC dans l'AOMI avec injection de BM-MSCs ...	67
Tableau IV : Essais précliniques de TC dans l'AOMI avec injection de MSCs issues du tissu adipeux.....	68
Tableau V : Essais précliniques de TC dans l'AOMI avec injection de MSCs issues de tissus embryonnaires ou fœtaux.....	69
Tableau VI : Essais précliniques de TC dans l'AOMI avec injection de MSCs modifiées	70
Tableau VII : Facteurs pro- et anti-angiogéniques.....	96
Tableau VIII : Quantité cellulaire injectée et pourcentage de granuleux contaminant	106
Tableau IX : Essais randomisés de TC dans l'AOMI avec injection de cellules issues de la MO.....	112
Tableau X : Résultats de l'essai randomisé BALI	114
Tableau XI : Essais randomisés de TC dans l'AOMI avec injection de cellules issues du sang périphérique.....	115
Tableau XII : Essais randomisés de TC dans l'AOMI avec injection de cellules fractionnées.....	118
Tableau XIII : Essais de TC dans l'AOMI avec injection de cellules souches mésenchymateuses.....	121
Tableau XIV : Caractéristiques des patients inclus dans les essais de TC dans l'AOMI	122

I. L'ARTERIOPATHIE OBLITERANTE DES MEMBRES INFERIEURS

A. Introduction générale

L'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI) est une maladie artérielle périphérique définie comme une maladie obstructive des vaisseaux artériels non cardiaques [1, 2]. Elle consiste en une obstruction d'origine athéromateuse des artères situées entre l'aorte abdominale et les artères digitales irriguant les membres inférieurs. L'AOMI résulte d'un processus chronique dont l'évolution (plus ou moins rapide) est la sténose puis l'oblitération complète du tronc artériel conduisant à une réduction du flux sanguin dans les membres inférieurs [3]. L'étiologie habituelle de l'AOMI est l'athérosclérose.

B. Epidémiologie

Sur la base des estimations actuelles, l'AOMI touche environ 200 millions de personnes à travers le monde [4]. Ce nombre fait de cette pathologie l'une des principales manifestations de l'athérosclérose. La prévalence de l'AOMI est estimée de 3 à 10% dans la population générale [5, 6] et augmente à 15-20% dans la population gériatrique âgée de plus de 70 ans [7, 8]. Le stade 1 de l'AOMI est asymptomatique et par conséquent, les études sur l'incidence sont assez difficiles à mettre en œuvre.

Dans l'étude Framingham, l'incidence annuelle augmente avec l'âge, de 0,4 pour mille hommes âgés de 35–45 ans à 6 pour mille hommes âgés de plus de 65 ans. La mortalité cardiovasculaire dans les 5 ans après le diagnostic de la maladie est de 11 à 23% [9]. Le risque d'amputation majeure est inférieur à 2% chez les patients ayant une AOMI stable. En revanche, la maladie peut évoluer et atteindre le stade d'ischémie critique des membres inférieurs (ICMI). A ce stade le risque d'amputation majeure au cours des douze prochains mois est porté à près de 42% [10]. Nous estimons que 250 mille amputations sont effectuées par année aux Etats-Unis et en Europe suite à l'ICMI [3].

La raison la plus probable de l'augmentation de la mortalité cardiovasculaire des patients atteints d'AOMI est le fait qu'ils souffrent également d'athérosclérose sévère dans d'autres territoires vasculaires (par exemple coronaires) [11]. Par conséquent, les patients atteints d'AOMI présentent un risque cardiovasculaire élevé des événements tels que l'infarctus du myocarde (IDM) ou un accident vasculaire cérébral (AVC) [10].

Les données épidémiologiques de la littérature concernent essentiellement les pays développés et dans une moindre mesure les pays en voie de développement. Il faut en effet garder à l'esprit que la maladie peut longtemps demeurer asymptomatique ce qui rend plus difficile la récolte des données [4].

Dans une base de données administrative américaine de plus de 9 millions de patients, la prévalence de l'AOMI symptomatique était de 10,7% et celle de l'ICMI était de 1,3% [12].

En raison d'une proportion croissante des patients plus âgés, la prévalence de l'AOMI est en hausse: entre 2000 et 2010, le nombre de cas d'AOMI a augmenté de 13% dans les pays à revenu élevé et de 29% dans les pays à revenu faible et intermédiaire [4].

C. Facteurs de risque

Les facteurs de risque athéromateux responsables du développement de l'AOMI sont communs aux autres maladies cardiovasculaires. Ces facteurs de risque ont été largement décrits dans la littérature à partir d'enquêtes épidémiologiques comme l'étude de Framingham ou « *Framingham Heart Study* » et l'étude MRFIT « *Multiple Risk Factor Intervention Trial* » [13, 14]

✓ **Age, sexe masculin :**

L'incidence et la prévalence de l'AOMI augmentent avec l'âge. L'étude de Framingham a montré que les *odds ratio* de l'AOMI étaient de 2,6 pour chaque tranche de 10 ans [15]. La prévalence de la maladie est deux fois plus importante chez les hommes ; ce qui peut s'expliquer par l'effet protecteur des œstrogènes retrouvé chez les femmes en pré ménopause [16].

✓ **Tabac :**

L'ensemble des données de la littérature concorde pour trouver que le tabagisme est le facteur le plus puissant pourvoyeur d'AOMI. Les études réalisées diffèrent dans leurs manières d'estimer le tabagisme, souvent qualifié par catégories (jamais, passé, actuel) ou bien de manière quantitative, par exemple en paquets-année. Globalement, le tabagisme multiplie par 2 à 3 le risque d'AOMI [17]. La relation tabac/AOMI est reconnue depuis plusieurs années et de nombreuses études ont démontré que la claudication intermittente touchant les patients atteints d'AOMI était 3 fois plus élevée chez les fumeurs par rapport aux non-fumeurs. Dans l'étude française multicentrique COPART (Cohorte de patients atteints d'AOMI hospitalisés), trois quarts des patients hospitalisés pour AOMI étaient ou avaient été fumeurs [18].

C'est le facteur capital d'athérome au niveau des membres inférieurs [3]. De plus les complications à l'issue d'un *bypass* chirurgical sont 3 fois plus élevées chez les patients présentant un tabagisme actif [19]. Ces complications liées au tabac peuvent être expliquées par l'existence d'une **dysfonction endothéliale** ainsi que par le développement d'un état inflammatoire et pro- thrombotique pouvant survenir suite au stress oxydatif [20].

✓ **Diabète :**

A l'image du tabagisme, le diabète est également un facteur de risque majeur dans le développement de l'AOMI et affecte essentiellement les artères infra poplitées. L'importance clinique du diabète dans l'AOMI est cruciale. En effet, le diabète augmente d'un facteur 4 la survenue d'une AOMI et accélère significativement le développement de la maladie. De plus, les patients diabétiques développent davantage de complications suite à une revascularisation chirurgicale [21]. Comme mentionné précédemment, l'ICMI est le stade ultime de la maladie. En l'absence de prise en charge adaptée, l'ICMI peut conduire à la perte du membre ischémié. La population ICMI diabétique présente 16 fois plus de risques d'amputation majeure [22]. L'augmentation d'un pourcent du taux d'hémoglobine glyquée (HbA1c) entraîne l'augmentation d'un risque de 26% de développer une AOMI [23]. Il existe une association entre la sévérité du diabète (hyperglycémie non contrôlée) et l'AOMI et ce indépendamment des autres facteurs de risque. De plus, l'AOMI se présente sous

forme plus agressive avec une évolution plus rapide dans la population diabétique qui connaît des taux d'amputations majeures plus importants [24].

✓ **Hypertension :**

Bien que l'hypertension soit un facteur de risque moins fatal que le tabac ou le diabète, elle est tout de même associée à un risque plus élevé de développer une AOMI. En effet, chaque hausse de 10 mmHg de la pression artérielle systolique (PAS) entraîne une élévation du risque de 25% [24]. L'étude de Framingham a identifié qu'une pression systolique supérieure à 160 mmHg et diastolique supérieure à 95 mmHg augmentent de 4 fois le risque de développer une claudication intermittente [25].

✓ **Autres facteurs :**

L'hypercholestérolémie-LDL (*Low density lipoprotein*) est modérément impliquée dans le développement de l'AOMI bien que certaines données de la littérature soient divergentes à ce sujet. Concernant le risque lié à l'hypertriglycéridémie, les résultats sont également contradictoires, mais plusieurs études sont en faveur d'un lien significatif entre ce facteur de risque et l'AOMI [26].

L'obésité est un facteur de risque faisant débat dans l'AOMI. Les études ayant investigué la liaison obésité - AOMI ont mis en évidence des résultats souvent opposés [17]. Cela peut en partie être expliqué par la coexistence d'autres maladies chroniques chez les sujets âgés, générant ainsi des facteurs confondants qui ne peuvent pas toujours être parfaitement contrôlés dans les modèles statistiques multivariés. Le manque d'exercice, directement lié à l'ischémie d'effort, peut être pourvoyeur d'obésité [27].

D. Classification

La sévérité de l'AOMI est déterminée selon la classification de Leriche Fontaine ou plus récemment selon celle de Rutherford (**Tableau I**) [28].

Clinique / hémodynamique		Leriche et Fontaine		Rutherford		
Stade	Clinique	Grade	Clinique	Grade	Catégorie	Clinique
1	asymptomatique	I	asymptomatique	0	0	asymptomatique
2	ischémie d'effort	II A	claudication intermittente, >200m	I	1	claudication légère
		II B	claudication intermittente, <200m		2	Claudication moyenne
					3	Claudication sévère
3	ischémie de repos	III	douleur de décubitus	II	4	Douleur de repos
		IV	troubles trophiques	III	5	Perte mineure de substance
				IV	6	Perte majeure de substance

Tableau I : Classification de l'AOMI selon des critères cliniques et selon les classifications de Leriche-Fontaine et Rutherford. [29]

1. Phase asymptomatique

Jusqu'à 75% des patients sont initialement asymptomatiques et sont fortuitement diagnostiqués suite à la découverte d'un index de pression systolique (IPS) inférieur à 0,9. Cependant, même si elle est asymptomatique, l'AOMI est significativement corrélée à une augmentation des risques cardiovasculaires.

2. Ischémie d'effort ou claudication intermittente

A l'image de l'angine de poitrine provoquée par un débit coronaire insuffisant, un apport insuffisant de sang aux membres inférieurs provoque des douleurs et une altération fonctionnelle du membre plus connue sous le nom de claudication intermittente. Elle a longtemps été considérée comme le marqueur principal de l'AOMI. De nombreux questionnaires aux patients ont été développés afin de la distinguer d'autres douleurs (Rose Questionnaire ou "World Health Organization Questionnaire")

puis le questionnaire d'Edinburgh) [30, 31]. La claudication intermittente est caractérisée par une douleur de type crampe musculaire survenant **à la marche** et se développant au fil des années avec une réduction progressive de la distance de marche sans douleur (ou périmètre de marche ; Stade II A : périmètre de marche supérieur à 200 mètres; Stade II B : périmètre inférieur à 200 mètres).

La localisation de la douleur dépend des sites artériels touchés. Les artères infra inguinales sont plus communément concernées et par conséquent les douleurs se situent surtout dans le mollet (en distal par rapport au site sténosé) (**Figure 1**). La douleur est fortement ressentie en montée et elle est soulagée par le repos. Les obstructions plus proximales impliquant les artères fémorales communes et iliaques peuvent respectivement causer des douleurs dans la cuisse ou la fesse. Les douleurs bilatérales sont évocatrices d'une atteinte aortique.

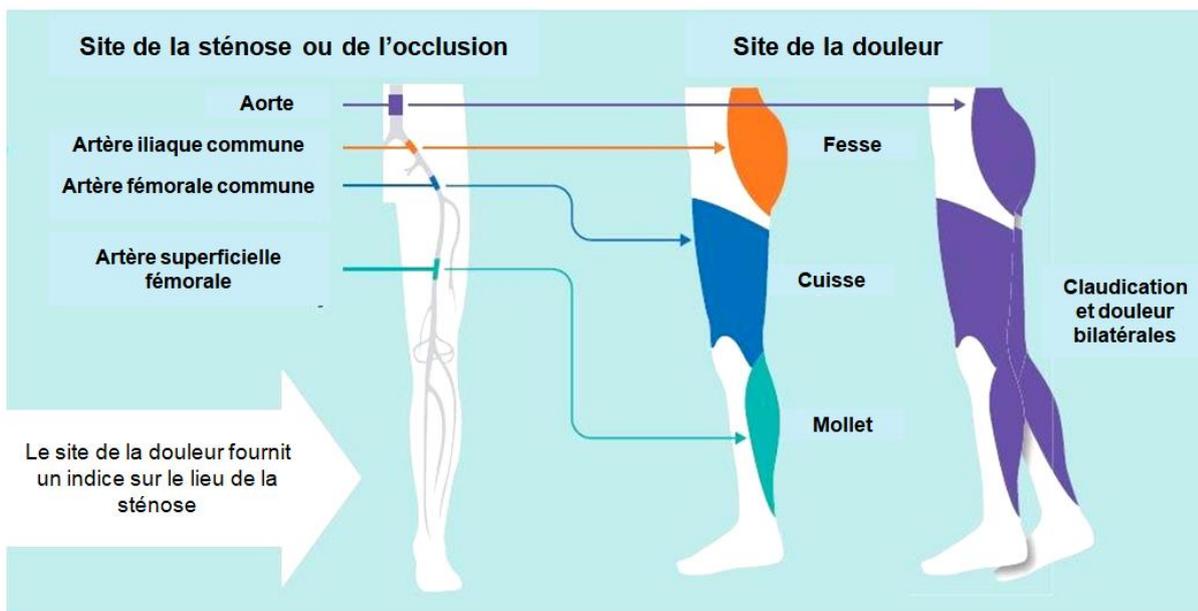


Figure 1 : Localisation de la douleur musculaire associée au site obstrué [32]

L'obstruction ou la sténose aortique provoquent une douleur bilatérale et généralisée sur l'ensemble des groupes musculaires des membres inférieurs (violet). L'affection de l'artère iliaque commune génère des douleurs proximales dans la fesse du côté touché (orange). Une obstruction de l'artère fémorale commune induit des douleurs dans la cuisse du côté obstrué (bleu foncé). Les douleurs localisées au mollet sont dues à des obstructions touchant l'artère superficielle fémorale (bleu clair).

3. Ischémie de repos : stade ultime

✓ ***Douleurs décubitus :***

Au fur et à mesure de son évolution, notamment en l'absence de prise en charge adaptée, les douleurs finissent par apparaître au repos et notamment en position couchée particulièrement la nuit au lit. Les patients souffrant de douleurs en décubitus sont forcés de laisser leurs jambes pendre hors du lit afin d'atténuer la douleur. Cette technique, permettant d'améliorer la perfusion du membre, est efficace seulement quelques jours. Les douleurs de décubitus signalent le développement d'un stade ischémique sévère, qui nécessite une prise en charge urgente.

✓ ***Ischémie critique des membres inférieurs (ICMI) :***

L'ICMI est le stade ultime de l'AOMI et se manifeste par l'apparition de troubles trophiques associés à un processus de dégénérescence aboutissant à la destruction des tissus. Les troubles trophiques peuvent se manifester sous la forme d'ulcères artériels au niveau du tiers inférieur de la jambe, du pied ou des orteils, ou sous la forme de gangrène (mort des tissus suite à l'arrêt de l'irrigation sanguine). Les ulcères artériels sont des lésions cutanées qui sont classiquement petits, creusant et douloureux. Ils surviennent spontanément ou suite à un traumatisme mineur. Ils peuvent constituer une porte d'entrée à des infections locales, voire systémiques. Ces pertes de substances exposent le membre atteint à une menace importante d'amputation. Sans revascularisation chirurgicale ou endovasculaire, l'ICMI conduit inévitablement à l'amputation. Il existe des situations d'urgence vitale chez des patients AOMI où l'infection du membre peut conduire à choisir l'amputation (**Figure 2** et **Figure 3**).

- ✓ Le "*Transatlantic Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease*" (TASC II) suggère de définir le stade ICMI atteint si un patient artériopathe présente une douleur persistant au-delà de deux semaines ou des ulcères associés ou non à une gangrène [3].
- ✓ Le diagnostic de l'ICMI est aussi établi pour un IPS inférieur à 0,5. Il faut garder à l'esprit que les calcifications vasculaires fréquemment retrouvées chez les

diabétiques et les patients en insuffisance rénale chronique (IRC), peuvent interférer dans la mesure.

En conclusion, le terme ICMI représente surtout l'urgence de revasculariser un membre afin d'éviter l'amputation. Les patients atteints d'ICMI font aussi face à un risque cardiovasculaire très élevé ; près de 50% d'entre eux décèdent dans l'année qui suit le diagnostic de complications cardiovasculaires associées.

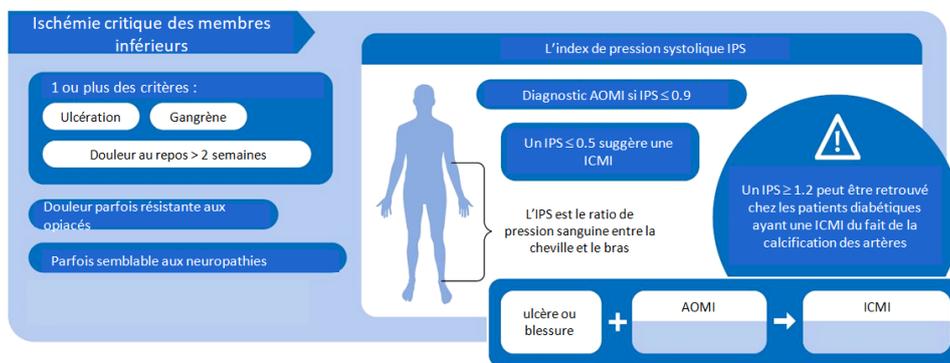


Figure 2 : Définition de l'ICMI [32]



Figure 3 : Pied ischémié présentant une gangrène du gros orteil [33]

E. Diagnostic

1. Examen clinique

Pour la plupart des patients asymptomatiques, l'AOMI est diagnostiquée fortuitement au cours d'un bilan systématique de routine. Les patients souffrant de claudication intermittente ou plus rarement de douleurs nocturnes ou de troubles trophiques consultent plus tardivement et le diagnostic d'AOMI est posé à cette occasion.

La maladie de Buerger devra être éliminée. En effet cette maladie, aussi appelée "thromboangéite oblitérante", est une pathologie rare et sévère caractérisée par une oblitération segmentaire et inflammatoire des vaisseaux de moyens et petits calibres d'origine non athéroscléreuse.

Une fois l'AOMI diagnostiquée, un examen complet doit être réalisé afin de détecter d'autres signes évocateurs d'une atteinte cardiovasculaire :

- ✓ Les **pouls périphériques** au-dessus des membres inférieurs sont recherchés et la pression sanguine est contrôlée. L'élément clef d'un examen vasculaire périphérique est la palpation des pouls périphériques. Tous les trajets artériels superficiels doivent être explorés de façon bilatérale et symétrique :
 - artère fémorale, au scarpa
 - artère poplitée, au creux poplité
 - artère tibiale postérieure, en arrière de la malléole interne
 - artère pédieuse (tibiale antérieure), au milieu du cou-de-pied
 - artères du membre supérieur (artère axillaire, artère humérale, artère radiale)
- ✓ Le rythme cardiaque est surveillé et l'abdomen est examiné afin d'éliminer ou d'identifier un anévrisme aortique abdominal.
- ✓ Une attention toute particulière est portée aux patients diabétiques notamment concernant la forme et l'aspect de leurs pieds (mal perforant plantaire, pied diabétique) [34].

2. Index de pression systolique (IPS)

Il est important dans le diagnostic et le suivi de l'AOMI. L'interprétation de la douleur étant subjective et corrélée au mode de vie du patient, la mesure de la pression systolique à la cheville a été proposée au début des années 1950 [35]. Ceci a conduit au développement de l'IPS (*Ankle brachial index – ABI*) afin de diagnostiquer l'AOMI. L'IPS est le ratio de pression systolique entre la cheville et le bras (**Figure 4**).

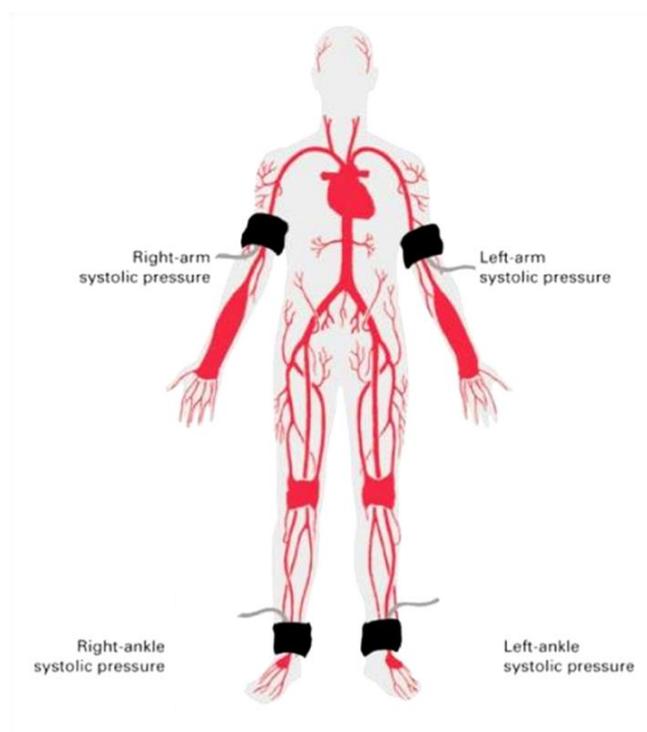


Figure 4 : Index de pression systolique [36]

Les brassards sont placés sur les bras et les chevilles. Les PAS sont mesurées au niveau de l'artère brachiale et de l'artère dorsale à l'aide d'un doppler échographique. Deux mesures sont prises de chaque bras et jambe, puis enregistrées en moyenne. L'IPS est ratio entre la PAS dans la cheville divisée par la PAS dans le bras.

Une valeur anormalement basse de ce ratio est indicatrice d'obstructions athéroscléreuses dans les membres inférieurs. En clinique, une valeur inférieure ou égale à 0,9 est recherchée pour le diagnostic de l'AOMI symptomatique ou non. Deux études ont comparé le diagnostic de l'AOMI par l'IPS à celui par l'angiographie qui est considéré comme le « *gold standard* ». L'IPS a permis de diagnostiquer l'AOMI avec une sensibilité de 97% et une spécificité de 100% [37, 38]. Chez les patients

symptomatiques présentant un **IPS < 0,9, l'AOMI est diagnostiquée** avec une sensibilité de 95% [34]. Comme évoqué précédemment, les artères calcifiées des patients IRC et diabétiques augmentent artificiellement la valeur de l'IPS. Dans cette population, l'IPS au pouce rapporté au bras est utilisé. Le seuil diagnostique retenu se situe à 0,7. Cependant, l'IPS présente l'inconvénient d'être opérateur dépendant [39]. Des recommandations concernant le protocole à suivre pour mesurer l'IPS ont été publiées en 2012 par l' « *American Heart Association* » (AHA) [40].

La mesure de l'IPS requiert une sonde Doppler à ultrasons (8 MHz) et se réalise chez le patient en décubitus dorsal. Le diagnostic de l'AOMI par la mesure de l'IPS est donc une approche non invasive, sensible et efficace. Selon les recommandations de l'« *American Diabete Association* » (ADA), la mesure de l'IPS doit être effectuée en routine chez les patients diabétiques de plus de 50 ans [41].

3. Périmètre de marche

L'IPS présente quelques limites notamment chez des patients avec une claudication intermittente mais présentant un IPS normal au repos. Ces patients ont généralement des lésions sténosantes ne provoquant pas de diminution de la pression sanguine dans les membres inférieurs au repos. En revanche, au cours d'un exercice physique, les demandes métaboliques et le débit sanguin étant augmentés, de telles lésions ont un retentissement hémodynamique plus significatif. L'exercice sur tapis roulant permet de mesurer la distance maximale parcourue par le patient avant l'apparition de douleur. Cette distance est nommée **périmètre de marche**. Une diminution de l'IPS de 15 à 20% suite à un exercice d'effort permet de diagnostiquer l'AOMI [3].

4. Pression transcutanée en oxygène

La mesure de la pression transcutanée en oxygène (TcPO₂) est une méthode non invasive permettant de quantifier l'oxygénation cutanée. Elle s'avère utile dans les stades avancés d'AOMI afin d'évaluer la probabilité de guérison des ulcères ischémiques. Une TcPO₂ inférieure à 30 mmHg est associée à une faible probabilité de cicatrisation de l'ulcère. Concernant le pied diabétique, une TcPO₂ inférieure à 20 mmHg est impliquée dans un retard voire un échec de la cicatrisation [42]. Cependant, la TcPO₂ n'est pas une technique très largement adoptée car elle est considérée

comme peu reproductible du fait qu'elle mesure la pression cutanée en oxygène et non la pression artérielle. Elle dépend donc des mécanismes de diffusion de l'oxygène au travers de la peau qui sont assez variables d'un individu à l'autre.

5. Echographie Doppler

L'objectif principal des techniques d'imagerie est de visualiser les sites de lésions artérielles candidats à la revascularisation. Ils permettent aussi de confirmer les diagnostics d'AOMI. Cette méthode non invasive permet d'étudier la direction, la vitesse et la turbulence du flux sanguin à travers un vaisseau. Cela fournit une évaluation objective de l'hémodynamique locale, de la gravité et de l'étendue de l'AOMI.

L'échographie doppler est une technique non invasive, facilement disponible, et ayant une sensibilité (88-90%) et une spécificité (96-99%) élevées. Pour ces raisons, elle a été promue par l'institut NICE (« *National Institute for Health and Clinical Excellence* ») comme imagerie de première intention au Royaume-Uni pour tous les patients dont une revascularisation est envisagée [43, 44]

6. Angiographie

L'angiographie est considérée comme étant le « *gold standard* » en imagerie de l'AOMI. L'angiographie peut être réalisée par scanner (angioscanner) ou par résonance magnétique (angioIRM).

- ✓ L'angioscanner est une technique non invasive permettant de visualiser tout l'arbre vasculaire. Cependant, elle requiert l'injection intraveineuse (IV) d'un produit de contraste le plus souvent iodé (pouvant représenter un risque néphrotoxique) et expose le patient aux radiations.
- ✓ L'angioIRM n'expose pas le patient aux radiations ni aux produits de contraste iodés mais au Gadolinium qui peut être néphrotoxique et formellement contre indiqué avec la prise de metformine (risque d'acidose lactique nécessitant donc d'arrêter le médicament 48 heures avant l'injection du produit) [34].

F. Marqueurs de l'évolution

Comme l'athérosclérose est une maladie inflammatoire, il n'est pas surprenant que les marqueurs de phase aiguë de l'inflammation tels que la protéine C réactive (CRP), le fibrinogène ou des cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine-6 (IL-6) et l'interleukine-18 (IL-18) soient associés à une aggravation de l'athérosclérose [34]. De nombreuses études ont défini des biomarqueurs prédictifs ou pronostics de l'AOMI.

✓ CRP :

La concentration sérique de CRP est plus élevée chez les patients atteints d'AOMI par rapport à une population témoin appariée. Des études ont corrélé les concentrations sanguines de CRP à **la sévérité** de la maladie montrant une relation avec les fonctions hémodynamiques futures et les événements cardiovasculaires [45]. Son rôle en tant que marqueur indépendant de l'ampleur de l'athérosclérose chez les patients AOMI est encore élué.

✓ Fibrinogène :

Le fibrinogène est également considéré comme un marqueur **prédictif de mortalité cardiovasculaire** [46]. Son élévation est de mauvais pronostic chez les patients atteints d'AOMI [47].

✓ D-Dimères :

Les D-Dimères sont des produits de dégradation de la fibrine. Leurs concentrations plasmatiques augmentent parallèlement avec l'âge des individus. Ils sont potentiellement considérés comme un marqueur prédictif du risque d'AOMI. L'élévation des D-dimères est corrélée à une réduction de l'IPS [48].

G. Prise en charge

La prise en charge doit avoir pour objectif : d'améliorer les symptômes et le périmètre de marche, d'empêcher l'amputation et de prévenir l'apparition d'autres comorbidités cardiovasculaires. Elle peut être divisée en trois grandes catégories :

- Prévention : amélioration du mode de vie et réduction des facteurs de risque
- Thérapie médicamenteuse
- Intervention chirurgicale

1. Prévention : amélioration du mode de vie et réduction des facteurs de risque

La prévention est en effet très importante, puisqu'il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement permettant de résorber la plaque d'athérome. Celle-ci repose sur l'éducation des patients à risque cardiovasculaire élevé et se compose de conseils hygiéno-diététiques, d'un arrêt du tabagisme, d'un encouragement à un exercice physique régulier, d'une perte de poids si nécessaire.

✓ **Tabagisme :**

Comme évoqué précédemment, le tabac est reconnu comme étant le facteur de risque principal dans le développement de l'athérosclérose dans l'AOMI. De plus, il réduit significativement le taux de succès des interventions chirurgicales et augmente le risque d'amputation. L'arrêt du tabac et le recours aux substituts nicotiniques sont fortement recommandés aux patients atteints d'AOMI.

✓ **Conseils hygiéno-diététiques :**

Dans le cas des patients atteints de la forme symptomatique de la maladie, les mêmes conseils hygiéno-diététiques seront recommandés mais dans le but de ralentir la progression de plaque d'athérome, donc de la maladie. En effet si la diminution de la lumière de l'artère est suffisamment lente, l'ischémie subie par les tissus activera le développement de vaisseaux collatéraux en amont de l'obstacle et permettra la mise en place d'un réseau artériel secondaire pour suppléer l'artère dont le flux est déficient.

✓ **Activités physiques :**

L'activité physique privilégiée sera donc une marche régulière de 30 à 45 minutes trois fois par semaine, sans atteindre le seuil douloureux.

2. Prise en charge médicamenteuse

Elle dépend du stade de la maladie. Dans tous les cas, le traitement est celui de la maladie athéromateuse cardio-vasculaire générale et de ses facteurs de risque.

✓ **Agents antiagrégants plaquettaires**

Les antiagrégants plaquettaires tentent à supprimer ou à réduire l'hyperactivité des plaquettes retrouvées dans le processus athérosclérotique qui conduit à la formation du thrombus. La méta-analyse « *Antithrombotic Trialists' Collaboration* » a identifié les antiplaquettaires, en particulier l'aspirine, comme responsables d'une réduction majeure de 23% des événements cardiovasculaires chez les patients atteints d'AOMI [49]. L'essai clinique CAPRIE « *Clopidogrel versus Aspirin in Patients at Risk of Ischaemic Events trial* » a permis de comparer l'efficacité de l'aspirine et du clopidogrel. Le clopidogrel a démontré une réduction relative de 24% du risque d'apparition d'évènements cardiovasculaires (AVC, IDM) supérieure à celle observée avec l'aspirine. Le clopidogrel est l'antiagrégant le plus fréquemment prescrit aux patients atteints d'AOMI seul ou en association avec l'aspirine [50].

✓ **Hypoglycémiant :**

De manière générale, l'optimisation du contrôle de la glycémie dans la population diabétique est cruciale. Compte tenu du rôle important de l'hyperglycémie dans l'athérogenèse, il faut essayer d'optimiser le contrôle du diabète chez les patients atteints d'AOMI. Les directives de l'ADA recommandent une HbA1c inférieure à 7% comme valeur cible pour tous les patients diabétiques en général en complément de conseils hygiéno-diététiques [51].

✓ **Hypolipémiant :**

Il existe de solides preuves en faveur de l'utilisation de statines, réduisant la cholestérolémie-LDL, dans l'AOMI. L'étude « *Heart Protection* » a montré que la prise de 40 mg de simvastatine a permis de réduire de 17% la mortalité cardiovasculaire et de 16% le recours à une revascularisation [52]. Le recours aux statines dans la prise en charge médicamenteuse de l'AOMI est donc indispensable, d'autant plus qu'elles semblent impliquées dans la stabilisation des plaques d'athérome ; toujours en complément des recommandations hygiéno-diététiques.

✓ Antihypertenseurs :

Le contrôle strict de la PA confère une réduction de 50% du risque d'AOMI [44]. Les directives sur l'hypertension recommandent un objectif de moins de 140/90 mmHg chez tous les patients présentant de l'athérosclérose et de moins de 130/80 mmHg lorsque le patient est diabétique [53]. L'étude HOPE (« *Heart Outcomes Prevention Evaluation* ») a révélé que l'inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, le ramipril, a permis la réduction des événements cardiovasculaires de 22% chez les patients atteints d'AOMI. Par conséquent, chez les patients hypertendus atteints d'AOMI, le ramipril devrait être considéré comme un traitement de première intention [54].

3. Intervention chirurgicale

Les interventions chirurgicales de revascularisation peuvent être réalisées par des techniques de chirurgies « ouvertes » (pontage) ou endovasculaires (angioplastie) (**Figure 5**). Elles sont indiquées principalement en cas d'ICMI ou dans le cas où la prise en charge classique n'a pas permis de limiter la claudication intermittente.

La chirurgie vise à restaurer la circulation principale tronculaire, en faisant appel à 3 modalités :

- La technique de **dilatation endo-luminale** : elle peut traiter des lésions (occlusion ou sténose) courtes sans aborder chirurgicalement les artères, par dilatation au ballonnet de l'artère après ponction artérielle percutanée.
- L'**endartériectomie** : elle enlève le séquestre athéromateux et l'intima (le plan de clivage passant dans la média).
- Le **pontage** :
 - il court-circuite la zone oblitérée,
 - la greffe veineuse (autogreffe) est le matériau de choix ; son utilisation est quasi formelle pour les pontages distaux (calibre adapté, passage "en souplesse" des plis de flexion) ;

- les prothèses synthétiques (Dacron® de polyester ou PTFE polytétrafluoroéthylène) sont surtout utilisées pour les pontages des vaisseaux proximaux (étage aorto-iliaque).

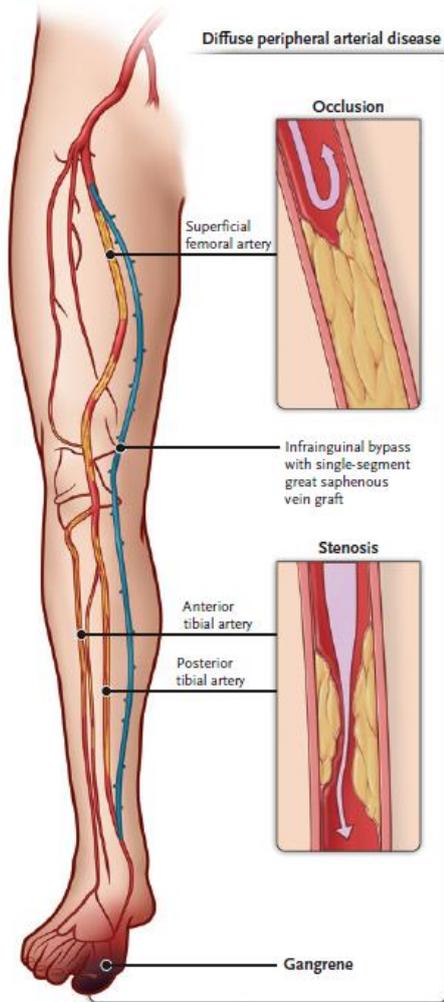
Les séries contemporaines démontrent qu'environ 20% des procédures de revascularisation des membres inférieurs sont effectuées chirurgicalement, et 80% sont endovasculaires [55, 56]. Les procédures sont réalisées par des spécialistes en chirurgie vasculaire, cardiologie, radiologie ou angiologie interventionnelles. Une limitation majeure de la revascularisation est la resténose ou la thrombose avec un échec subséquent de la procédure, aboutissant à des taux de perméabilité moyens de 56% à 77% à 1 an et de 39 à 80% à 5 ans en fonction de la méthode de revascularisation et de la localisation de la sténose [3]. Les patients présentant une claudication intermittente ont souvent qu'un seul axe touché et c'est la raison pour laquelle l'angioplastie avec ou sans stent est particulièrement indiquée [57].

En revanche pour les patients au stade ICMI, les dégâts artériels sont davantage disséminés et concernent plusieurs segments. Il est donc nécessaire d'effectuer des pontages bien que ces dernières années de nouvelles techniques endovasculaires voient le jour.

L'étude BASIL (« *Bypass versus Angioplasty in Severe Ischaemia of the Leg* ») a comparé le taux d'amputation à un an après une revascularisation par angioplastie ou par pontage. Cette étude, publiée 2005, n'a trouvé aucune différence significative entre ces deux techniques [58]. L'arrivée de nouveaux cathéters performants en chirurgie endovasculaire pourrait remettre en question les conclusions de cette étude.

En pratique, le choix de la technique dépend intimement de l'état du patient. Le document TASC II a décrit ses propres recommandations de traitement en fonction du site et de la morphologie de la lésion [3] (**Figure 6**).

A Surgical revascularization



B Endovascular revascularization

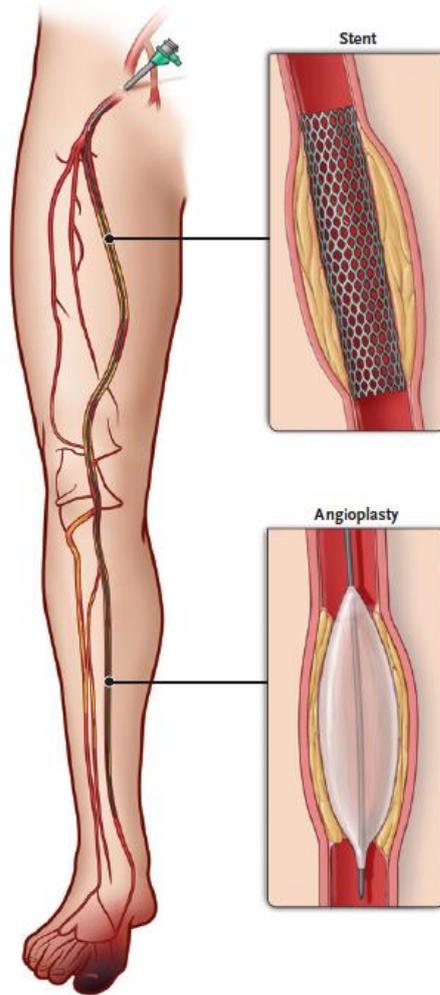


Figure 5 : Techniques de revascularisation chirurgicale et endovasculaire [33]

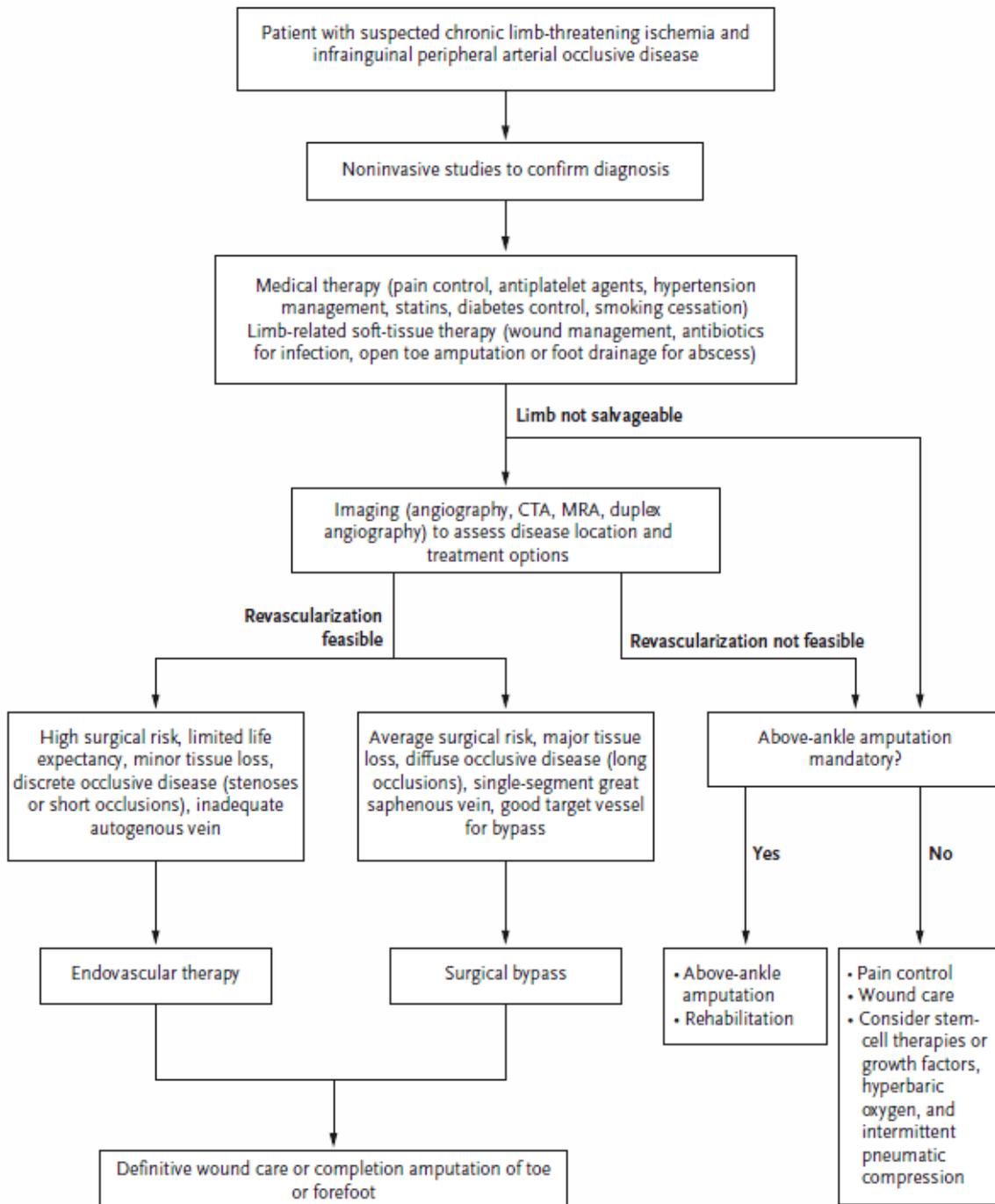


Figure 6 : Algorithme décisionnel pour la prise en charge des patients AOMI [33]

4. Amputation

La nécrose cutanée évolue rapidement et conditionne le pronostic fonctionnel du membre concerné ainsi que le pronostic vital du patient. L'amputation constitue l'ultime recours lorsque la revascularisation chirurgicale n'est plus envisageable. En effet, certains patients ne sont, d'emblée, pas éligibles aux techniques conventionnelles de revascularisation. Ce sont les patients « *NO-option* » qui souffrent généralement de plaques d'athérosclérose trop diffuses et de facteurs de risque cardiovasculaires trop importants. Ils sont fatalement prédisposés au risque d'amputation. Ils représentent 20 à 30% des patients atteints d'ICMI [3]. L'amputation doit être pratiquée en zone saine et correctement oxygénée. L'oxygénation des tissus est évaluée par la mesure de la TcPO₂. Il faut également tenir compte lors de l'amputation des appuis lors de la marche et des possibilités d'appareillage par prothèse du moignon. Les amputations sont donc surtout des amputations d'orteils, transmétatarsienne ou au niveau du genou. Le taux d'amputation, qui peut atteindre 40% après 6 mois d'évolution de l'ICMI, est associé à une dégradation importante de la qualité de vie des patients ainsi qu'à un taux de mortalité de 20% [3].

H. Physiopathologie de l'athérosclérose

Au cours de l'AOMI, la sténose des artères provoquée par l'athérosclérose induit une diminution graduelle du débit sanguin en aval. Ceci provoque ainsi retentissement hémodynamique et une ischémie tissulaire du membre concerné.

1. Au départ, beaucoup de patients sont **asymptomatiques** car le développement progressif d'une circulation collatérale de suppléance compense les conséquences de la ou des sténose(s) artérielle(s).
2. Ces patients ne manifestent qu'une **claudication intermittente**.
3. En l'absence de prise en charge adaptée, et avec l'aggravation de la sténose oblitérant davantage l'artère; l'ICMI s'installe [11].

L'athérosclérose est caractérisée par des lésions affectant l'**intima** appelées **plaques d'athéromes**. Ces dernières font nettement saillie dans la lumière artérielle : le centre de la lésion athéromateuse se compose de lipides et de nombreux débris cellulaires (bouillie athéromateuse). La plaque évolue vers des complications à type de

calcifications de la paroi artérielle, sténose de la lumière, ulcération dans la lumière et thrombose au contact de la plaque. Ces dernières sont à l'origine d'occlusions aiguës du tronc artériel ou d'embolies en aval, de fragilisation pariétale (anévrismes).

Les plaques obstruent la lumière des vaisseaux et fragilisent également **la média** sous-jacente [34]. L'athérosclérose est un processus global au cours duquel les plaques sténosantes sont disséminées de manière systémique dans l'arbre artériel associant d'autres complications et des comorbidités cardiovasculaires [11].

La physiopathologie de l'athérosclérose dépend de 3 composantes :

- 1) l'environnement biologique (à savoir les facteurs de risques),
- 2) les facteurs hémodynamiques (*shear stress* sur les parois vasculaires au niveau des zones de bifurcation),
- 3) les prédispositions génétiques.

Les processus clefs de l'athérosclérose (**Figure 7**) sont l'épaississement de l'intima et l'accumulation de lipides dans les artères de moyens et de grands calibres. Ils entraînent une **dysfonction endothéliale** à l'origine d'une perméabilité accrue aux LDL s'accumulant dans la paroi intimale. Ces derniers sont oxydés par les radicaux libres et capturés par les macrophages (M), les cellules endothéliales (ECs) et les cellules musculaires lisses (CML) [34]. Les LDL oxydés libres entraînent l'expression à la surface endothéliale de molécules d'adhésion telles que la « *Vascular cell adhesion molecule-1* » (VCAM-1) et la P-selectine sur lesquelles s'attachent les monocytes (Mo) circulants [59]. Les Mo migrent vers l'intima par diapédèse attirés par un gradient de chimiokines telle que la « *Monocyte chemoattractant protein-1* » (MCP-1). Au sein de la tunique intimale, ils se différencient en macrophages, internalisent les LDL oxydés et deviennent des **cellules spumeuses** [60]. Des cytokines pro-inflammatoires telles que le « *Tumor necrosis factor alpha* » (TNF α) et l'IL-1 beta libérées par les macrophages augmentent l'expression endothéliale du récepteur aux LDL [61].

Un cercle vicieux se met en place amplifiant la boucle inflammatoire et la capture des LDL ainsi que des cellules spumeuses dans la paroi vasculaire. Les LDL oxydés sont à l'origine de la libération de facteurs de croissance (FC) incluant le « *Platelet-derived growth factor* » (PDGF), le « *Fibroblast growth factor basic* » (FGFb) et le « *Transforming growth factor* » (TGF β) qui sont à l'origine de la migration des CML

depuis la média vers l'intima où elles vont proliférer. Ceci va générer une matrice extracellulaire (MEC) qui va recouvrir les stries lipidiques et former une chape fibreuse épaisse protégeant contre les lésions [34]. Il en résulte une plaque d'athérome obstruant la lumière du vaisseau et provoquant une diminution graduelle du flux sanguin en aval.

L'adaptation physiologique à la diminution du flux sanguin et à l'ischémie est le développement d'un **réseau collatéral** en augmentant le diamètre et le nombre de vaisseaux (**angiogenèse**). Le réseau collatéral est bien souvent suffisant pour subvenir aux besoins du membre ischémié au repos ; en revanche ce réseau s'avère insuffisant en cas d'activité [62].

La chape fibreuse peut être fragilisée par le « *shear stress* » ou les forces hémodynamiques exercées. En cas de rupture d'une plaque vulnérable des composants de la MEC comme le collagène sont exposés aux éléments figurés du sang en particulier aux plaquettes et aux facteurs de la coagulation. Les plaquettes subissent donc successivement une adhésion au sous-endothélium, une activation permettant la libération de substances de ses granules (ATP, ADP, sérotonine, Ca^{2+} , facteurs plaquettaire 3 et 4, facteurs de la coagulation, ...) et une agrégation aboutissant à la formation du thrombus blanc ou clou plaquettaire. La cascade de la coagulation s'active secondairement avec la formation d'un réseau de fibrine ou thrombus aggravant le rétrécissement de la lumière du vaisseau. Des fragments du thrombus ou embolie peuvent se détacher et se localiser dans des vaisseaux distaux de plus faible calibre. Dans ce cas, une exacerbation rapide de la symptomatologie se met en place et peut être le signe indicateur d'une nouvelle occlusion artérielle dont l'origine est la **rupture d'une plaque athéroscléreuse** située dans les membres inférieurs ou dans l'aorte.

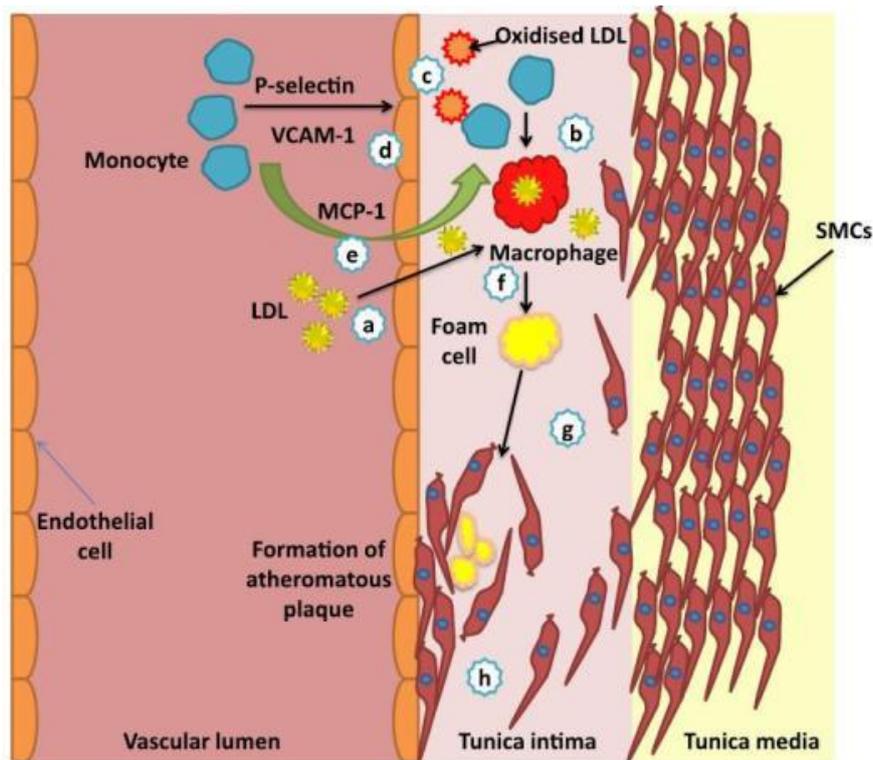


Figure 7 : Physiopathologie de l'athérosclérose [34]

- (a) Accumulation de LDL dans l'intima
- (b) Oxydation de ces LDL par les radicaux libres produits par les ECs, les macrophages, et les cellules musculaires lisses (CML).
- (c) Les LDL oxydées induisent une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion à la surface des ECs (P-sélectine, VCAM-1)
- (d) VCAM-1 facilite la margination des monocytes circulants à l'endothélium vasculaire
- (e) Les monocytes migrent vers l'intima via MCP-1
- (f) Différenciation des monocytes en macrophages qui phagocytent les LDL oxydées et deviennent des cellules spumeuses
- (g) Migration des CML à partir de la média vers l'intima sous l'influence de FC (PDGF, FGFb, TGFβ)
- (h) Prolifération des CML et formation de matrice extracellulaire autour des cellules spumeuses formant ainsi une plaque d'athérome contre la paroi vasculaire interne

II. MODELES MURINS D'ISCHEMIE DES MEMBRES INFERIEURS

Les symptômes de l'ischémie dans l'AOMI sont dépendants de nombreux facteurs tels que la localisation et l'étendue des obstructions ou des sténoses. De plus, le développement des collatérales est affecté par de nombreux facteurs hémodynamiques [63].

Contrairement à un modèle *in vitro*, un modèle *in vivo* est plus représentatif de la maladie humaine car il tient compte de l'anatomie vasculaire du muscle squelettique, de la diversité cellulaire composant les vaisseaux (ECs, CML, péricytes, monocytes/macrophages) et de la composition de la MEC. La néovascularisation requiert des interactions complexes entre tous ces éléments au sein de leur microenvironnement.

A. Choix du modèle expérimental

Le choix du modèle expérimental est crucial. Dans la mesure du possible, les modèles expérimentaux choisis doivent se rapprocher des pathologies humaines.

- **Modèle d'ischémie aiguë du membre inférieur (« *Hind Limb Ischemia Model* » - HLIM)**

Le modèle HLIM induit une interruption soudaine du flux sanguin par la ligature de l'artère fémorale (**Figure 8 A**) [64, 65]. Le modèle HLIM mimant l'ICMI est imparfait car l'ischémie provoquée est aiguë et d'emblée très sévère alors que le développement de l'ICMI humaine se construit selon un processus chronique requérant la croissance de plaques d'athérosclérose au fil des années. (**Figure 8 C**).

- **Modèles d'occlusion artérielle graduelle**

Les processus de l'angiogenèse, la vasculogenèse et de l'artériogenèse contribuent progressivement à la croissance d'un réseau collatéral de vaisseaux, permettent de répondre à l'ischémie provoquée par la sténose. D'autres techniques plus récentes préconisent l'utilisation d'un anneau (ou constricteur améroïde) placé sur l'artère

fémorale se resserrant progressivement et générant une ischémie chronique (Figure 8 B).

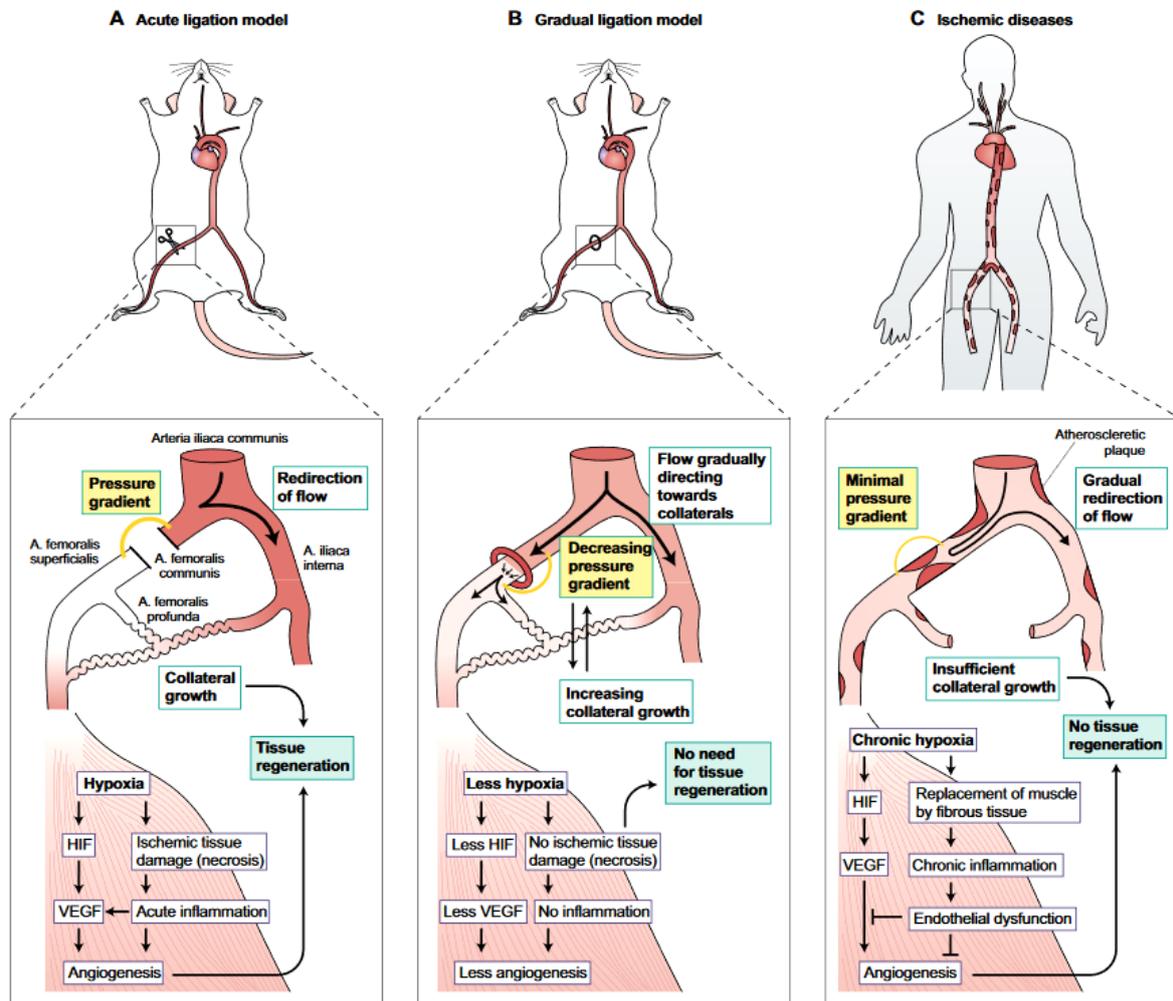


Figure 8 : Différents modèles expérimentaux [66]

Les réponses aux deux techniques chirurgicales, aiguë *versus* occlusion graduelle, sont très différentes [67, 68]. Dans l'ischémie aiguë, le retour du flux sanguin dans la patte ischémisée est obtenu à 84% 35 jours post ligation. Le *Gastrocnemius* est atteint de nécrose. Ceci représente bien l'ischémie aiguë humaine mais représente moins l'ICMI au cours de laquelle les ulcérations et la perte de substances est le plus souvent confinée au pied [69]. Dans l'ischémie chronique seulement 68% du flux initial est retrouvé mais sans nécrose du *Gastrocnemius*. En effet les techniques induisant une ischémie graduelle permettent de stimuler moins fortement le développement du lit collatéral. Ceci peut s'expliquer par une pression plus faible exercée en amont de l'occlusion (cette pression étant maximale en cas de ligation complète) [70].

Malgré ces limites, le modèle HLIM reste le plus utilisé dans les études précliniques de thérapies innovantes (thérapies génique, protéique et cellulaire) mimant le stade ultime de l'AOMI.

B. Choix de l'espèce

Les rongeurs (souris, rats) présentent l'avantage d'être disponibles en grande quantité (faible durée de gestation), à moindre coût et d'exister sous différentes souches (consanguine, non consanguine, transgénique...). Le modèle HLIM a surtout été développé chez les rongeurs mais d'autres espèces de plus grande taille ont été testées avec succès : lapin, chien, porc et primate [71-74].

Cependant, ces modèles présentent des limites ; par exemple les rongeurs disposent de réseaux vasculaires qui miment imparfaitement l'anatomie humaine. Le rat présente par ailleurs des mécanismes compensatoires à l'ischémie par sa capacité à développer des shunts artério-veineux [75]. Le choix de l'espèce sera dicté par le *design* de l'étude préclinique : volume d'injection intramusculaire (IM), nombre d'injection(s) IM, prélèvements sanguins itératifs, exploration du système cardiovasculaire...

C. Choix de la technique chirurgicale

Le choix de la technique chirurgicale du modèle HLIM doit avoir pour objectif de respecter un équilibre entre une chirurgie assez sévère pour ne pas permettre une récupération trop rapide, et une chirurgie trop sévère ayant pour conséquence l'installation d'une nécrose rapide et d'un taux d'amputation élevé.

- **Technique chirurgicale peu sévère mimant le stade de claudication intermittente**

Chez les rongeurs et plus précisément chez la souris, la ligature de l'**artère fémorale commune** induit une ischémie aiguë et s'obtient selon le protocole suivant. Une incision cutanée courte et longitudinale est réalisée au niveau de la zone inguinale.

Les tissus sous cutanés sont disséqués afin d'exposer le paquet vasculo-nerveux sous inguinal. Le nerf est séparé très délicatement puis l'artère et la veine sont séparées à l'aide d'une pince courbe. Une ligature est réalisée autour de l'artère fémorale commune afin de créer l'ischémie. Cette méthode épargne les collatérales de l'arbre vasculaire irriguant le membre inférieur [76]. Cette première technique permet d'obtenir chez la souris une ischémie symptomatique représentative de l'AOMI humaine. En effet, une claudication intermittente est observée chez ces animaux (**Figure 9**).

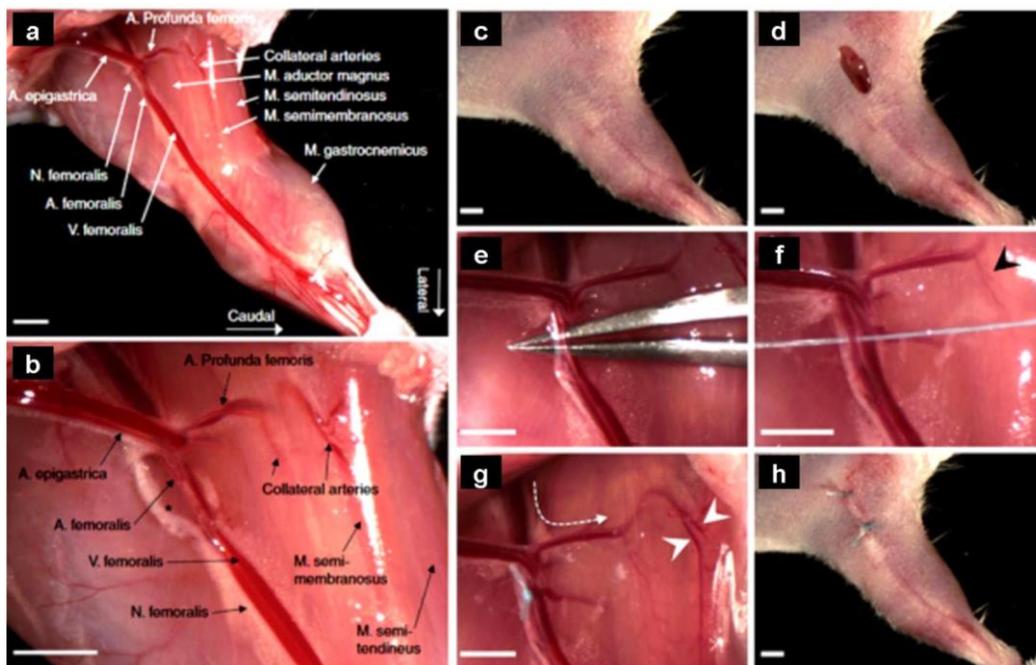


Figure 9 : Modèle de ligature de l'artère fémorale [76]

- **Technique chirurgicale sévère mimant le stade ICMI**

Une seconde ligature localisée 5 mm en distal de la première et une excision de la portion artérielle intermédiaire provoquent une ischémie plus sévère. L'arbre collatéral est également sacrifié ce qui signifie que la restauration du flux sanguin nécessitera non seulement un mécanisme d'angiogenèse mais également d'artériogenèse. Dans ces conditions seulement, un tiers du flux peut être restauré dans les 7 jours chez la souris de souche C57BL/6 [76]. Cette seconde technique plus sévère se rapproche davantage du stade ICMI [77] (**Figure 10**).

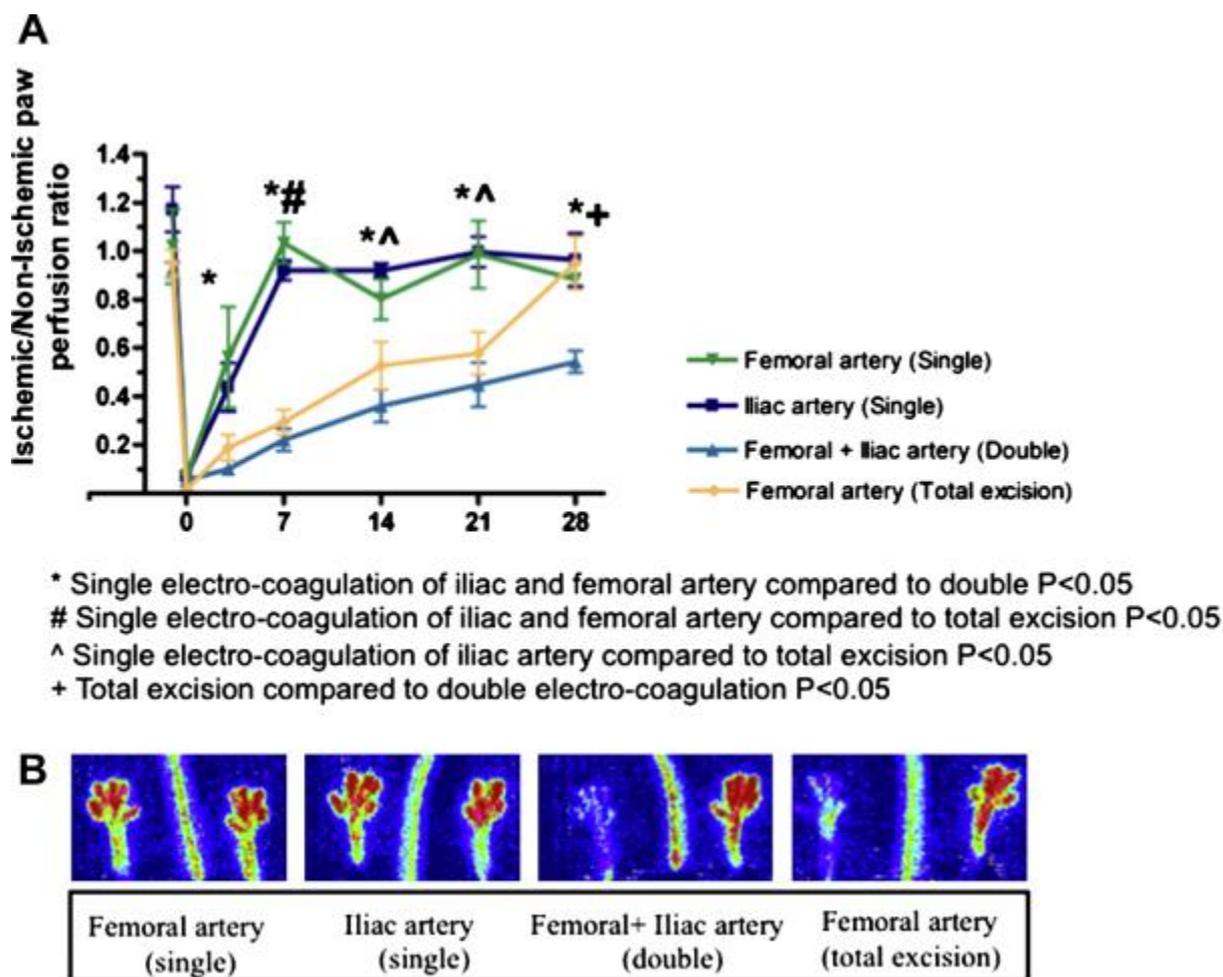


Figure 10 : Différentes techniques chirurgicales [78]

Restauration du flux sanguin dans le membre postérieur des souris C57BL/6.

A. Récupération du flux sanguin après une seule électrocoagulation de l'artère fémorale (niveau anatomique distal) ($n = 3$, ligne verte) ou une seule électrocoagulation de l'artère iliaque (niveau anatomique proximal) ($n = 9$, ligne noire) ou une double électrocoagulation des deux artères fémorales et de l'artère iliaque ($n = 9$, ligne bleue) ou l'excision totale de l'artère fémorale ($n = 6$, ligne orange). Surveillance par imagerie de perfusion laser Doppler (LDPI). Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart type. * # ^ + $P < 0,05$ (test ANOVA)

B. Images LDPI des pattes au 7^{ème} jour post-interventions chirurgicales

Certains utilisateurs ligaturent d'emblée l'artère et la veine, ce qui ne peut pas être considéré comme représentatif de l'ICMI car l'occlusion artérielle et veineuse coexistent et majorent l'ischémie selon des mécanismes indépendants éloignant ainsi ce modèle de l'ICMI humaine [79]. D'autres techniques plus complexes et plus sévères

ont été décrites comme l'excision simultanée de l'artère et de la veine iliaque externe ainsi que de l'artère fémorale et de ses branches et de la veine fémorale. Cette technique provoquant une ischémie trop sévère présente l'inconvénient de générer de nombreuses nécroses et des auto amputations.

D. Choix de la souche

- **Variabilité intra-souche**

Afin de limiter le nombre de souris par lot, les souches consanguines (C57BL/6 et BALB/c) homogènes sur le plan génétique sont préférentiellement choisies dans le modèle HLIM [80]. Cependant, Il existe des variations considérables quant à l'organisation de l'arbre collatéral irriguant les membres inférieurs entre les individus au sein de la même souche. Ceci est observable chez la souche BALB/c qui offre des réponses variables 24 heures post ligature [81]. Ces variations impactent la réponse de l'organisme à la maladie athéroscléreuse. Cela est le résultat de composantes génétiques et environnementales encore peu comprises [82].

- **Variabilité inter-souche**

Ces variations sont plus importantes lorsque l'on compare les souches entre elles. La souche C57BL/6 jouit d'un réseau collatéral plus développé que la souche BALB/c [83]. Le retour du flux sanguin à la normale est donc plus lent chez la souche BALB/c et fait de cette souche le modèle le plus représentatif de l'ICMI humaine. De même cette souche est plus sensible à la nécrose [84]. Les souris BALB/c et C57BL/6 expriment aussi des réponses différentes à l'inflammation. L'inflammation étant un stimulus majeur dans le déclenchement de l'angiogenèse, cette dernière a été étudiée chez ces souris suite à l'application d'un implant sous-cutané (sc) de polyuréthane [85]. Cet implant a révélé que la souche BALB/c a sécrété davantage de « *Vascular endothelial growth factor* » (VEGF) que la souche C57BL/6. Ceci signifie que l'angiogenèse est plus active chez la souche BALB/c. Cependant, considérant les résultats de récupération de flux sanguin incomplets chez cette souche, ceci indique que l'artériogenèse, moins active chez la souris BALB/c, semble être la plus impliquée dans la récupération d'un flux sanguin optimal. En effet, l'angiogenèse permet d'obtenir des vaisseaux aux parois fines et peu efficaces [86]. Considérant l'ensemble

de ces informations, il semble que la souche BALB/c soit la plus adéquate pour représenter l'ICMI alors que la C57BL/6 soit plus adaptée pour mimer la claudication intermittente. La souche *Nude*, athymique est également sensible à l'ischémie.

E. Age et comorbidités associées

1. Age

L'ICMI est une maladie atteignant essentiellement des personnes âgées dont les capacités régénératives de leur organisme sont devenues limitées. Considérant le modèle animal, une souris de 3 ans serait équivalente à un humain de 80 ans [87, 88]. Cependant, la majorité des essais précliniques utilisent des souris jeunes dont les capacités de régénération sont beaucoup plus importantes que les souris âgées. En effet, les études ayant utilisé des souris âgées ont mis en évidence un retour du flux sanguin plus lent et incomplet [89]. Il semble que le potentiel de l'artériogénèse soit diminué chez les souris âgées laissant ainsi le recouvrement du flux sanguin s'opérer essentiellement par l'angiogénèse laquelle n'étant pas assez efficace [90]. Cette capacité de régénération limitée chez les souris âgées s'expliquerait par une déficience en facteur de transcription « *Hypoxia inducible factor-1 α* » (HIF-1 α) limitant ainsi la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques et le recrutement de cellules progénitrices [91].

2. Comorbidités associées

Les patients atteints d'AOMI sont âgés avec de nombreuses comorbidités associées (diabète, hypertension ou hypercholestérolémie LDL) [3]. Ces comorbidités ont comme point commun qu'elles induisent un terrain pro-inflammatoire générant une dysfonction endothéliale et une artériogénèse altérée.

La plupart des études précliniques utilisent des animaux sans comorbidités associées.

- **Souris diabétique de type 2**

La souris db/db résistante à la leptine est le modèle de diabète de type 2 le plus utilisé [92].

Un régime alimentaire, en excès, riche en glucides et en acides gras, peut induire une obésité associée à une dyslipidémie ainsi qu'une résistance à l'insuline. Suite à la ligation de leur artère fémorale, le retour du flux sanguin dans la patte ischémisée est altéré et ceci s'explique par la formation de vaisseaux plus petits et par un moindre recrutement de progéniteurs endothéliaux (EPCs pour « *Endothelial progenitor cells* ») [93]. Ces résultats sont semblables à ceux retrouvés chez l'homme [94]. De plus, il semble que des facteurs pro-angiogéniques tels que le PDGF et le VEGF soient sous exprimés chez les souris diabétiques [95].

- **Souris hypercholestérolémique : Modèle murin d'athérosclérose**

Pour simuler les effets de l'athérosclérose, des souris déficientes en ApoE (ApoE^{-/-}) ou n'exprimant pas le récepteur du LDL (LDLR^{-/-}) sont le plus communément utilisées. Les souris C57BL/6 ApoE^{-/-} développent des plaques d'athérome dans l'aorte ascendante, la carotide et les artères fémorale et poplitée [96]. Ces dernières démontrent un recouvrement du flux sanguin altéré, lent et non optimal avec une réponse moindre aux thérapies pro-angiogéniques telles que l'utilisation de cellules mononucléées d'origine médullaire (BM-MNCs) [97]. Les souris hypercholestérolémiques sous expriment HIF1- α et le récepteur du FGF ce qui altère également l'artériogénèse [98]. Le modèle murin se rapprochant le plus de la pathologie humaine serait l'utilisation de souris âgées et ApoE^{-/-}. Cependant, il faut garder à l'esprit que les plaques d'athérosclérose chez la souris sont moins à risque de rupture et de thrombose que les plaques humaines [99].

F. Durée de suivi des animaux

La durée de suivi des animaux dans les essais précliniques publiés est limitée à une trentaine de jours. Le retour à l'état basal survient dans les 7 jours chez les souris de souche C57/BL6 (ayant un réseau collatéral bien développé) ou dans les 4 semaines chez les souris de souche BALB/c. En revanche la souche *Nude*, athymique, est plus sensible à l'ischémie et nécessite davantage de temps [78].

III. CELLULES SOUCHES ET PROGENITRICES

Alors que les cellules souches embryonnaires possèdent une capacité de se différencier en tous les types de cellules matures et de former des organes de différentes natures, les cellules souches adultes présentent un niveau plus faible de plasticité et un phénotype presque déjà différencié. Les cellules souches adultes sont une population hétérogène de cellules incluant non seulement des cellules immatures mais aussi des cellules avec différents stades de maturation. Au cours de l'ischémie, les zones de lésions recrutent des cellules « vasculogènes » qui sont impliquées dans la restauration du flux sanguin. Les organes tels que le cerveau, le foie, le pancréas, le cœur ou les vaisseaux sanguins semblent être des réservoirs contenant des cellules souches et des progéniteurs au potentiel « vasculogène ».

- La moelle osseuse (MO) contient une variété de cellules souches adultes et fut longtemps considérée comme la source principale de cellules souches et progénitrices. De nombreuses études précliniques et cliniques utilisant des cellules mononucléées issues de la MO (BM-MNCs pour « *Bone Marrow – Mononuclear Cells* »)

, pour le traitement de maladies ischémiques, attestent du caractère pro-angiogénique de ces cellules.

La MO abrite (**Figure 11**) :

- **Les cellules souches hématopoïétiques** (HSCs pour « *Hematopoietic stem cell* »)
- **Les progéniteurs endothéliaux** (EPCs pour « *Endothelial progenitor cells* ») ou angioblastes
- **Les cellules souches mésenchymateuses** (MSCs pour « *Mesenchymal stem cells* »)

Les HSCs sont définies par le marqueur de surface CD34⁺ chez les humains et par c-kit⁺/Sca1⁺/Lin⁻ chez les souris. Les HSCs permettent d'obtenir toutes les cellules du sang. La MO contient aussi des EPCs qui peuvent se différencier en cellule endothéliale (ECs) et qui ont longtemps été caractérisées par les marqueurs CD34⁺

CD133⁺ et VEGFR-2⁺ (« *Vascular endothelial growth factor receptor-2* ») mais dont l'identification fait encore débat sur la scène scientifique [100]. Une population de cellules stromales, les MSCs, réside également au sein de la MO. Cette population de cellules souches non hématopoïétiques est caractérisée en culture du reste de la fraction cellulaire mononucléée médullaire par son aptitude à adhérer au plastique. Les MSCs présentent un fort potentiel de différenciation.

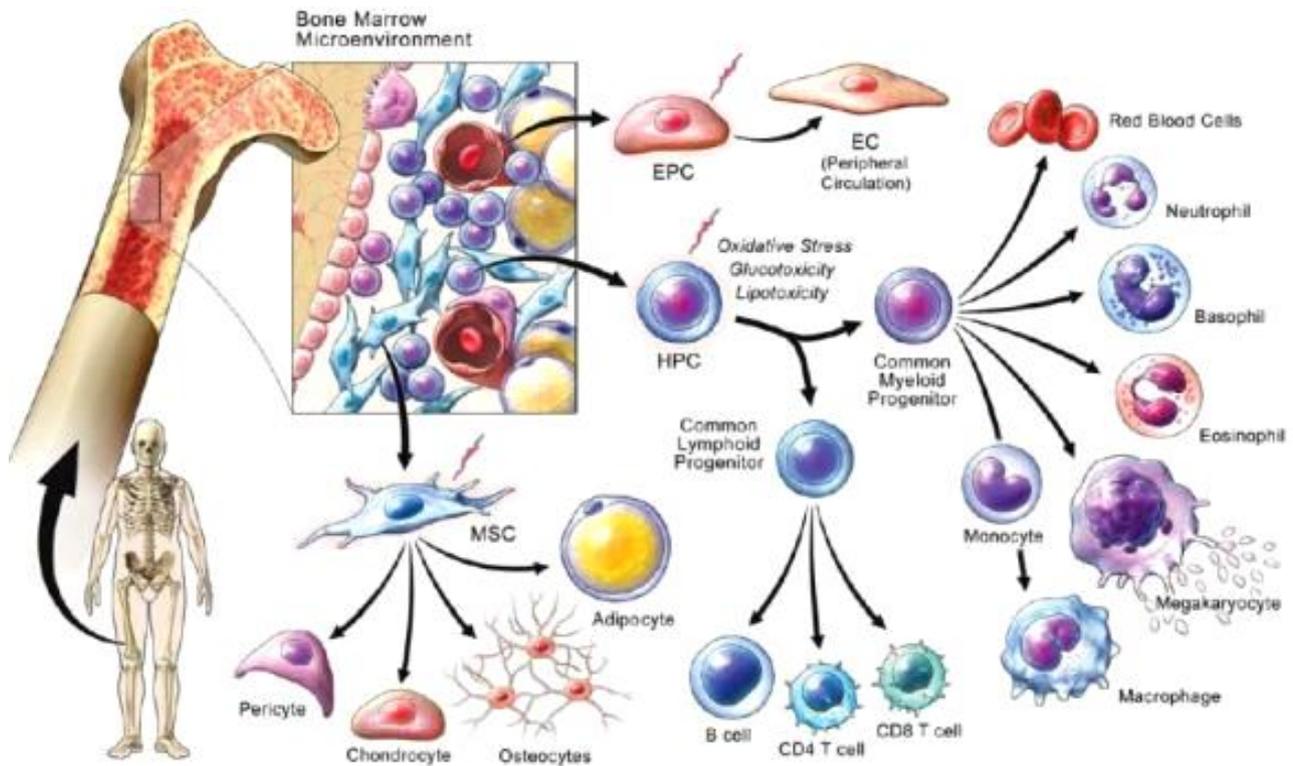


Figure 11 : Les cellules de la moelle osseuse [101]

La MO humaine est un riche réservoir abritant les HSCs, les EPCs ou les MSCs. Les HSCs sont les précurseurs des lignées lymphoïdes et myéloïdes et permettent donc d'obtenir l'ensemble des cellules du sang. Les EPCs sont les précurseurs des ECs. Les MSCs sont capables de se différencier en péricyte, chondrocyte, ostéocyte et adipocyte.

EC: Endothelial Cell – EPC: Endothelial Progenitor Cell – HPC: Hematopoietic Progenitor Cell – MSC: Mesenchymal Stem Cells

A. Cellules souches hématopoïétiques (HSCs)

A l'âge adulte, la MO est située dans les cavités centrales des os plats. Elle est composée de tissus hématopoïétiques et adipeux vascularisés. La MO est le siège de

l'hématopoïèse ; le tissu hématopoïétique est composé d'une variété de cellules incluant les éléments figurés du sang (érythrocytes, granulocytes, monocytes, lymphocytes et plaquettes) ainsi que leurs précurseurs. L'érythropoïèse permet d'obtenir les cellules de la lignée rouge (les érythrocytes), la leucopoïèse permet d'obtenir les cellules de la lignée blanche et la thrombocytopoïèse donne naissance aux plaquettes. Les HSCs, présentent les caractéristiques particulières suivantes [102] :

- capacité d'auto renouvellement afin de maintenir le pool de HSCs
- multipotence puisqu'elles peuvent donner naissance à toutes les cellules de l'hématopoïèse
- faible nombre
- quiescence

Dans la MO des supposés **hémangioblastes** se différencie d'une part en angioblastes puis en ECs, et d'autre part en HSCs (**Figure 12**).

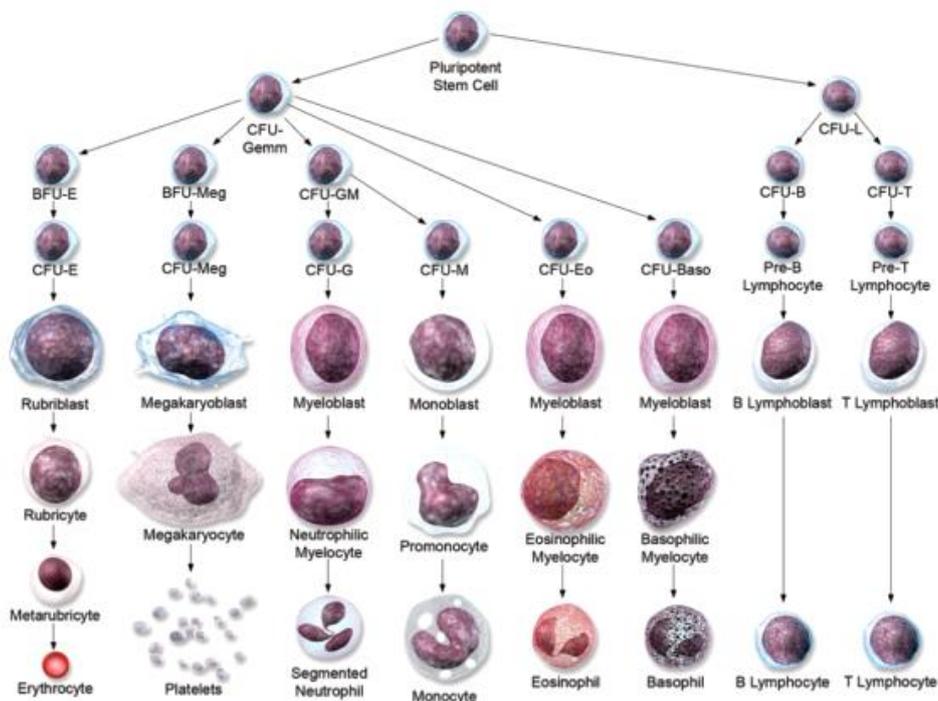


Figure 12 : Représentation de la maturation des différentes lignées cellulaires dans la MO.

CFU : colony forming unit; E : erythyroid; Meg : megakaryocyte; Gemm : granulocytic, erythyroid, monocyte-macrophage, megakaryocytic; GM : granulocyte/monocyte; G : granulocyte; M : monocyte; Eo : eosinophil; Baso : basophil; L : lymphocyte [102]

B. Les Progéniteurs endothéliaux cellulaires (EPCs)

Les EPCs sont définis comme des cellules étant capables de se différencier en ECs et de contribuer à la formation de nouveaux vaisseaux. Cette définition est source de confusions sur le plan scientifique [103]. En effet, dans la littérature, les EPCs regroupent un large spectre de cellules hétérogènes, ce qui génère des résultats conflictuels dans les études translationnelles et cliniques. Certains décrivent une incorporation au réseau vasculaire, d'autres une absence d'incorporation [104]. Les premiers EPCs « *putative* » ont été isolées en 1997 par Asahara *et al.* à partir de la fraction mononucléée du sang périphérique (PB-MNCs pour « *Peripheral blood mononuclear cells* ») et exprimaient les marqueurs CD31⁺, VEGFR-2⁺ et CD34⁺ et pouvaient capter le LDL ce qui est une propriété des ECs [105]. Afin de comprendre la terminologie des EPCs, il faut savoir qu'il existe deux approches pour les caractériser : la cytométrie en flux (CMF) et la culture cellulaire (**Figure 13**).

La CMF peut s'effectuer sur des prélèvements sanguins ou médullaires. Les EPCs sont les cellules de la fraction mononucléée exprimant le CD34⁺ et le VEGFR-2⁺. Cependant, pour bien les différencier des ECs matures, le marqueur d'immaturité endothéliale CD133⁺ a été introduit dans la caractérisation des EPCs [106].

En culture, considérant leur vitesse d'apparition, il faut distinguer deux sous populations d'EPCs, les EPCs précoces (*early EPCs*) et les EPCs tardifs (*late EPCs*).

1. EPCs précoces ou *Early EPCs*

Le nom « cellules angiogénique circulante » (CAC) est fréquemment employé pour identifier les EPCs précoces [107]. Bien que cette nomenclature permette d'intégrer la notion que ces cellules circulent dans le sang périphérique, il n'existe actuellement aucun moyen de le prouver *in vivo*. Actuellement, la notion de CAC ou d'EPCs précoces ne peut être liée qu'aux conditions de culture. C'est ainsi que Medina *et al.* préconisent depuis 2017 de les nommer cellules myéloïdes angiogéniques (CMA ou MACs pour « *Myeloid angiogenic cells* »). Ainsi les MACs sont caractérisées par le phénotype suivant : CD45⁺, CD14⁺, CD31⁺ et CD146⁻, CD133⁻, Tie2⁻ [108]. Les MACs ne peuvent pas se différencier en ECs mais peuvent favoriser l'angiogenèse par des mécanismes paracrines [109].

Il existe deux manières de cultiver les EPCs précoces :

- la première méthode développée par Asahara *et al.* consiste à cultiver la fraction mononucléée de la MO sur une matrice de gélatine ou de fibronectine enrichie en FCs pro-angiogéniques tels que le VEGF. Les EPCs précoces adhèrent à la matrice dans ces conditions et sont comptés entre 4 à 7 jours après l'initiation de la culture.
- La seconde méthode développée par Hill *et al.*, en 2003 consiste à identifier et compter les colonies de la fraction mononucléée n'ayant pas adhéré. Les colonies (CFU-ECs) ainsi formées présentent toutes les caractéristiques des EPCs précoces ou MACs [100].

2. EPCs tardifs ou *Late EPCs*

Un second sous type d'EPCs peut être obtenu en culture [110]. Ces EPCs nommés tardifs sont des colonies adhérentes apparaissant au bout d'une à trois semaines de culture de la fraction mononucléée de la MO (ou à partir du sang de cordon ombilical ou du sang périphérique). Elles présentent un fort pouvoir de prolifération. Il est préférable de nommer ces cellules ECFCs (« *Endothelial colony forming cells* »). Les ECFCs constituent une population présentant un fort pouvoir pro-angiogénique et un haut potentiel de reconstruction vasculaire [111]. Ces cellules expriment le phénotype suivant : CD31⁺, VE-Cadhérine⁺, facteur von Willebrand⁺, CD146⁺, VEGFR-2⁺ et CD45⁻, CD14⁻ [112, 113]. Elles expriment aussi le CD34 même si l'expression de ce marqueur décroît au cours de l'expansion *in vitro*. Il est difficile de les différencier des ECs matures phénotypiquement mais les ECFCs ont été caractérisées par leur capacité à former des pseudo-tubes en Matrigel *in vitro*. Les nouvelles recommandations préconisent également de classer les ECFCs en deux sous catégories en fonction de l'activité de leur aldéhyde déshydrogénase : faible activité (Ald-low) ou forte activité (Ald-High). Les Ald-low ECFCs jouissent d'un pouvoir de réparation vasculaire supérieur aux Ald-high ECFCs [114] (**Tableau II**) (**Figure 14**).

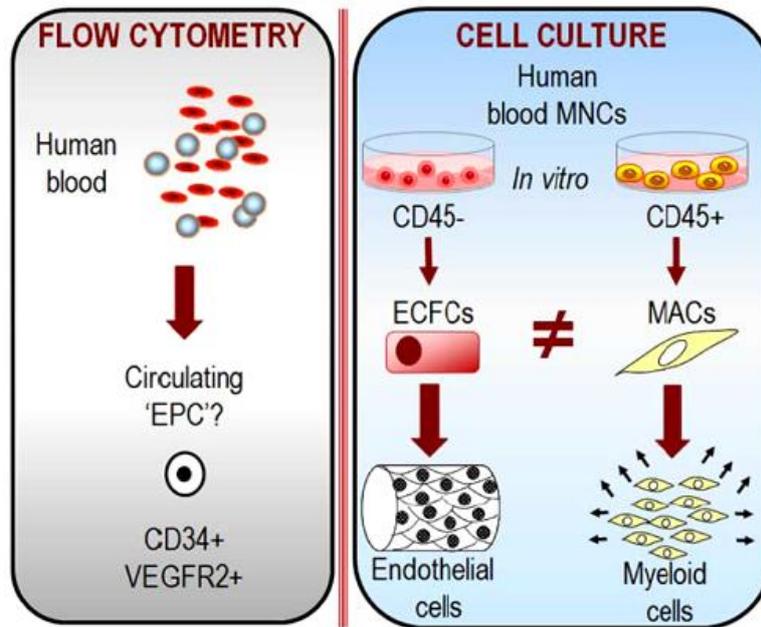


Figure 13 : Méthodologies utilisées pour étudier les EPCs

La numération des EPCs circulants dans le sang est faite grâce à la CMF. La culture cellulaire permet d'isoler deux sous types cellulaires à savoir les ECFCs et les MACs. Les ECFCs appartiennent à la lignée endothéliale alors que les MACs expriment un phénotype similaire aux Macrophages M2.

ECFCs; endothelial colony forming cells; EPC: endothelial progenitor cell; MACs: myeloid angiogenic cells; VEGFR-2: vascular endothelial growth factor receptor-2 [100]

MACs	ECFCs
✓ CD45+ CD14+ CD31+	✓ CD31+ CD105+ CD146+
✓ CD146- CD34-	✓ CD45- CD14-
→ Conditioned media enhances endothelial network formation <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> .	→ Intrinsic tube forming capacity <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> .
→ MACs-derived paracrine factors as stimulants of angiogenesis.	→ ECFCs as building blocks for new blood vessel formation or vascular repair

Tableau II : Caractéristiques des MACs et des ECFCs

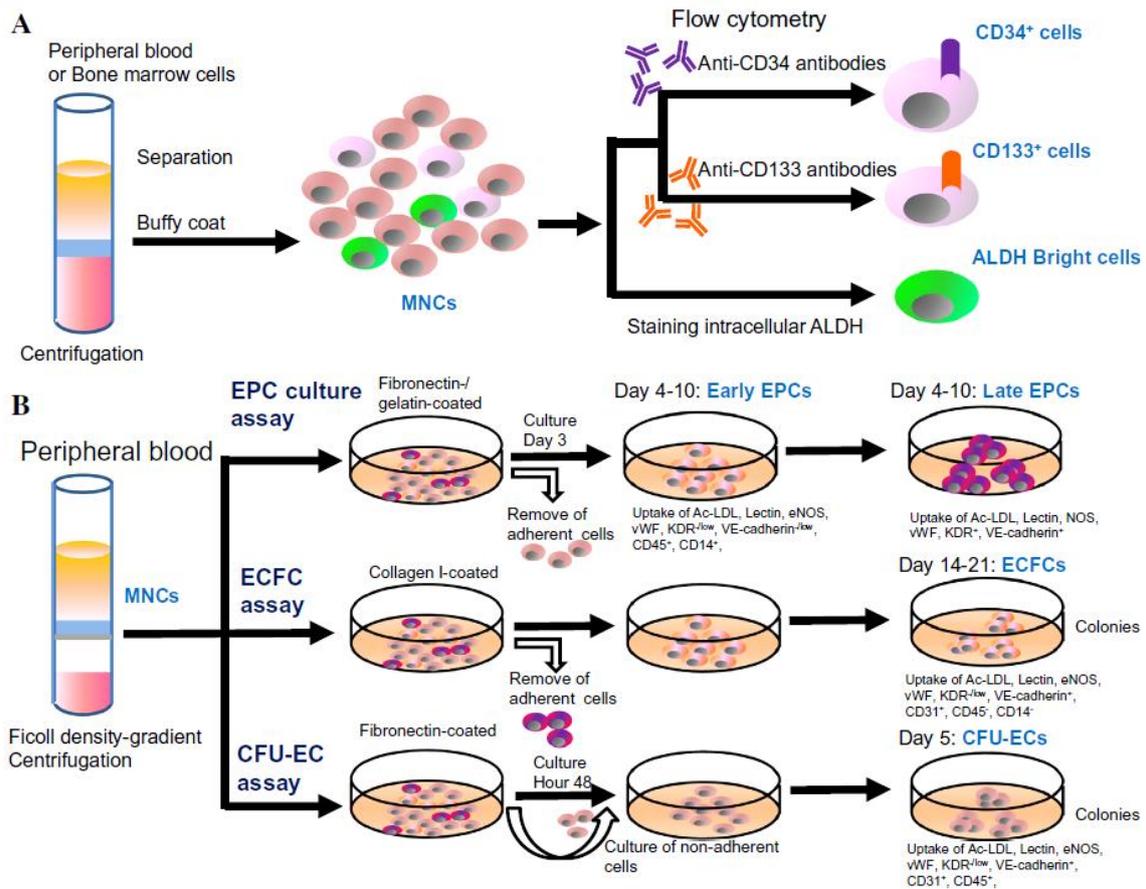


Figure 14 : Méthodes de préparation des EPCs tardives et précoces humaines [115]

C. Les Cellules souches mésenchymateuses (MSCs)

La présence de cellules souches non hématopoïétiques résidant dans la MO a été suggérée par le biologiste allemand Cohnheim il y a 130 ans [116]. Son travail a fait la lumière sur la possibilité que la MO soit une source de cellules fibroblastiques pouvant sécréter du collagène au cours des processus de régénération. Cette hypothèse fut étayée en 1976 par les travaux de Friedenstein *et al.*, [117] qui mirent en évidence, au sein de la MO, la présence d'une population de cellules à aspect fibroblastique et pouvant adhérer au plastique. Cette population semblait assez hétérogène et quiescente durant 2 à 4 jours puis commençait à se multiplier et à s'homogénéiser à partir de 4 jours de culture. Les observations de Friedenstein *et al.*, ont mis en évidence la capacité étendue de différenciation de ces cellules : ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes ce qui leur a valu la dénomination cellules souches mésenchymateuses car pouvant donner naissance aux cellules de la lignée mésenchymateuse [118-120].

1. Origine, amplification *in vitro* et immunophénotypage

a) Origine des MSCs et amplification *in vitro*

Les MSCs humaines (hMSCs) sont isolées à partir des BM-MNCs [121]. Les MSCs peuvent être identifiées au sein de ces BM-MNCs grâce à leur capacité à former des colonies adhérentes *in vitro*. Ainsi, elles ont été désignées comme CFU-F (« *Colony forming unit fibroblast* ») [117].

La fréquence des MSCs au sein des BM-MNCs est généralement d'une à deux pour 100 000 cellules. De plus, ce contingent de MSCs diminue avec l'âge. Par conséquent, une culture prolongée est souvent nécessaire pour obtenir une population importante de MSCs. Ces cellules ont en général une forte capacité de prolifération et sont relativement faciles à cultiver. Un certain nombre de formulations de milieux de culture commerciaux ont été introduits sur le marché au cours des dernières années. Ces formulations permettent aux laboratoires de travailler selon des protocoles standardisés [122].

La culture des MSCs peut se réaliser selon trois méthodes : le test CFU-F, l'analyse du stroma de la MO et la culture de lignées de MSCs [123]. Le test CFU-F ; c'est une technique de culture *in vitro* en milieu liquide permettant de cloner les MSCs qui se multiplient en formant des colonies. Le nombre de colonies obtenu dépend du nombre de cellules initialement planté suggérant ainsi que chaque MSC présente initialement une forme de colonie *in vitro*. L'essai CFU-F permet par exemple de multiplier les MSCs issues des BM-MNCs dans un milieu contenant 10% de sérum de veau fœtal grâce à l'adhésion des MSCs au plastique. Le reste des BM-MNCs est donc éliminée au cours des lavages successifs. Après une phase de latence, les MSCs finissent par se multiplier rapidement avec un temps de doublement dépendant du donneur.

Les hMSCs dérivées de la MO et du tissu adipeux (TA) peuvent être cultivées en continu *in vitro* pendant environ 20 passages. Il est difficile de savoir combien de passages peuvent être effectués avant que ces cellules ne développent une instabilité chromosomique ou ne perdent leur multipotence [124]. Certaines études ont montré que les cultures de hMSCs maintiennent un caryotype normal jusqu'au 20^{ème} passage [125, 126]. Cependant, il a été démontré que suite à une culture prolongée, les MSCs perdent progressivement leur propriété d'auto-renouvellement et leur potentiel de différenciation multilinéaire se réduit [122].

Les MSCs peuvent être isolées de la MO mais aussi du TA, du liquide amniotique, du périoste, du sang de cordon, de la gelée de Wharton et des tissus fœtaux [127-130]. Dans le cas d'une origine du TA, elles sont nommées ADSCs (« *Adipose tissue derived stem cells* »).

b) Immunophénotypage

Concernant les caractéristiques phénotypiques des MSCs, elles expriment un large panel de marqueurs dont aucun n'est complètement spécifique. Il est admis que les hMSCs adultes n'expriment pas les marqueurs hématopoïétiques CD45, CD34, CD14 ou CD11 ni les molécules de co-stimulation CD80, CD86 ou CD40, ni les marqueurs d'adhésion CD31 (ou PECAM-1 « *Platelet endothelial cell adhesion molecule -1* »), CD18 (ou LFA-1 antigène leucocytaire) ou CD56. En revanche les MSCs expriment CD105 (SH2), CD73 (SH3/4), CD44, CD90 (Thy-1), CD71 et Stro-1 et le marqueur d'adhésion CD106 (ou VCAM), CD166 (ou ALCAM, molécule d'adhésion cellulaire leucocytaire), ICAM-1 et CD29 [131-134]. Les MSCs d'autres espèces n'expriment pas forcément les mêmes marqueurs que les hMSCs [135].

Les hMSCs adultes expriment le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe 1 mais n'expriment pas les molécules du groupe HLA (CMH de classe II) [136].

Les hMSCs fœtales expriment plus faiblement les molécules de classe I que les hMSC adultes [137].

Sur la base des critères retenus par la société internationale de thérapie cellulaire (ISCT pour « *International society of cellular therapy* ») les MSCs doivent exprimer les marqueurs suivants : CD105 (SH2), CD73 (SH3) et CD90 et ne doivent pas exprimer les marqueurs suivants : CD45, CD34, CD14, ou CD11b, CD79 ou CD19 ni les molécules de surface HLA-DR [138]

2. Différenciation *in vitro* des MSCs :

Les capacités de différenciation des MSCs sont un élément supplémentaire utile à l'identification de cette population cellulaire. En effet, elles ont la capacité de se différencier en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes *in vitro*.

- **Différenciation en ostéoblastes**

La différenciation en ostéoblastes requiert une couche confluente de MSCs à incuber avec de l'acide ascorbique, de la β -glycérophosphate et de la dexaméthasone durant 2 à 3 semaines. Les MSCs vont former des agrégats ou des nodules, vont augmenter l'expression de la phosphatase alcaline. Une accumulation de calcium sera visible [133].

- **Différenciation adipocytaire**

La différenciation adipocytaire est réalisée dans un milieu contenant de la dexaméthasone, de l'indométacine, de l'insuline et de l'isobutyl-méthyle xanthine. Une accumulation de lipide intracellulaire se met en place, ainsi que l'expression des récepteurs PPAR γ 2 (« *Peroxisome proliferator-activated γ 2* »), de la lipoprotéine lipase [133].

- **Différenciation chondrogénique**

Afin de promouvoir la différenciation chondrogénique, les MSCs sont centrifugées puis cultivées en présence de TGF- β [139].

3. Caractéristiques immunologiques des MSCs :

Le phénotype immun des MSCs (MHC I⁺, MHCII⁻, CD40⁻, CD80⁻, CD86⁻) peut être considéré comme non immunogène. Le CMH de classe I devrait activer les lymphocytes T (Ly T) mais étant donné l'absence des molécules de co-stimulation la suite du signal ne peut être engagée laissant les Ly T anergiques. De nombreuses études ont aussi rapporté que les MSCs ont un rôle immunosuppresseur et peuvent donc moduler les fonctions des Ly T [140, 141].

Les MSCs présentent aussi des propriétés immunomodulatrices altérant la maturation et la fonction des cellules dendritiques. *In vitro*, elles sont capables d'inhiber la prolifération et la différenciation des lymphocytes B (Ly B) [142].

Les MSCs sont administrées chez l'homme en cas de transplantation allogénique pour améliorer le résultat de la prise de greffe hématopoïétique [143] et pour entraver la maladie du greffon contre l'hôte [144].

Le rôle immunomodulateur des MSCs est actuellement mis à l'étude dans de nombreuses maladies auto-immunes.

4. MSCs et réparation tissulaire

Le fort potentiel de différenciation des MSCs et leur profil immunologique en font une source intéressante de cellules souches à mettre à profit dans la réparation tissulaire et la médecine régénérative. De nombreuses études précliniques ont démontré que les MSCs présentaient la capacité d'être recrutées sur les sites de lésions [145, 146]. D'autres groupes ont mis en évidence une augmentation de la néoangiogenèse dans le myocarde à proximité du site de transplantation de MSCs [147]. Les MSCs ont pu se différencier en cardiomyocytes, ECs et CML vasculaires démontrant leur fort pouvoir de différenciation et la bonne prise de greffe des MSCs. Par ailleurs les MSCs exercent un effet paracrine sur l'artériogenèse et l'angiogenèse *via* la sécrétion de FCs incluant le VEGF, le FGFb et le SDF-1 α (« *Stromal cell derived factor-1 α* ») [148].

De plus, les MSCs, du fait de leur rôle immunomodulateur, peuvent inhiber la prolifération des cellules immunitaires : Ly T ou Ly B, cellules NK (*Natural Killer*), cellules dendritiques [149, 150] et activer les Ly T régulateurs [151]. De cette manière, la voie allogénique s'ouvre aux MSCs.

5. Mécanisme d'action des MSCs et utilisation dans les modèles précliniques d'ischémie

a) Mécanisme d'action des MSCs

(1) Effet paracrine

Le milieu dans lequel sont cultivées les MSCs peut favoriser l'angiogenèse *in vitro* et la migration [152]. Les MSCs issues du TA sécrètent davantage de VEGF, de TGF et de HGF (« *Hepatocyte growth factor* ») que celles issues de la MO [153]. De même, le milieu dans lequel sont cultivées les MSCs issues du TA semble aussi plus riche en métalloprotéases 3 et 9 (MMP3 et MMP9) [154]. Le pré-conditionnement des MSCs permet d'augmenter leur pouvoir pro-angiogénique *in vivo* [155]. Dans des conditions

de culture hypoxiques (1% d'O₂), les MSCs issues de la MO produisent davantage de VEGF qu'en conditions normoxiques (21% d'O₂). La transplantation de telles cellules augmentent le réseau vasculaire *in vivo* dans la patte ischémisée de souris [152].

In vivo, le mode d'action des MSCs n'est pas encore parfaitement élucidé en ce qui concerne une éventuelle différenciation ou une action exclusivement paracrine. En effet, une petite proportion de cellules se greffe transitoirement sur le site ischémié suite à leur administration par voie intraveineuse (IV). Dans un modèle murin d'IDM, la majorité des MSCs (83%) a été retrouvée dans le poumon dans l'heure suivant l'administration IV [156]. Cependant, il existe des preuves selon lesquelles les MSCs peuvent acquérir des propriétés endothéliales et myogéniques.

(2) Différenciation myogénique

Les MSCs, quelle que soit leur origine, peuvent induire une réparation musculaire [157]. Un conditionnement hypoxique augmente ce pouvoir [158]. Les MSCs peuvent aussi se différencier en cardiomyocytes ; une prédifférenciation de ces cellules permet d'augmenter leur pouvoir régénérant au niveau du cœur en comparaison aux MSCs indifférenciées [159]. De plus, les MSCs issues de la MO ou du TA peuvent se différencier en CML [160].

(3) Différenciation endothéliale *in vitro* et activité pro-angiogénique *in vivo*

De nombreuses études ont mis en évidence le pouvoir de différenciation endothéliale des MSCs issues de la MO ou du TA [160-163]. Il faut garder à l'esprit que les MSCs expriment quelques récepteurs endothéliaux tels que Stro-1 [164] ou CD105 (plus connue sous le nom endogline) [165] mais leur implication dans la transdifférenciation endothéliale des MSCs demeure inconnue à ce jour.

- **Transfection stable :**

Une manipulation *ex vivo* des MSCs induisant la surexpression de l'éphrine B2 (protéine impliquée, entre autre, dans l'angiogenèse et la différenciation des cellules souches) provoque une différenciation endothéliale précoce de ces cellules réduisant ainsi le pouvoir de différenciation ostéogénique [166]. Nous pouvons également citer des études similaires ayant induit la surexpression de facteurs pro-angiogéniques (HGF, HIF-2 α , PDGF-BB, FGF-2) par transfection

stable [167-169] et ayant démontré, *in vivo*, la supériorité pro-angiogénique de telles cellules par rapport aux MSCs indifférenciées.

- **Pré-conditionnement hypoxique :**

D'autre part, des études se sont intéressées au pré-conditionnement hypoxique des MSCs et ont mis en évidence une augmentation de l'activité pro-angiogénique de ces cellules *in vivo* [170].

- **Simvastatine :**

Les patients atteints d'AOMI présentent dans la plupart des cas une hypercholestérolémie-LDL et sont donc traités par statine. Des études précliniques ont montré que la simvastatine n'affectait pas la viabilité des MSCs [171] et permettaient d'en augmenter le potentiel pro-angiogénique [172].

- **Milieu de culture enrichi en FCs :**

Par ailleurs, la différenciation endothéliale des MSCs peut être obtenue par culture avec des FCs tels que le VEGF [162, 163, 173]. En effet, même si les MSCs ne possèdent pas de récepteur au VEGF, il semblerait que l'action de ce FC serait due à sa liaison aux PDGF-Rs (α [174] et β [175]) présents à la surface des MSCs. Une telle manipulation permet d'éviter toute modification génétique des MSCs [176]. Dans ce contexte, des *endothelial-like* MSCs (MELs) ont été décrites dans la littérature et peuvent être obtenues par culture des MSCs dans un milieu enrichi en FC pro-angiogéniques [177]. Ces cellules présentent le même phénotype que les MSCs indifférenciées mais, en cas de culture avec des composés de la MEC, peuvent se transdifférencier en ECs. *In vitro*, les MELs forment des pseudo-tubes plus importants que ceux formés par les MSCs (**Figure 15**) [177-179]. Dans un modèle de Matrigel plug *in vivo*, elles induisent la formation de vaisseaux fonctionnels [179].

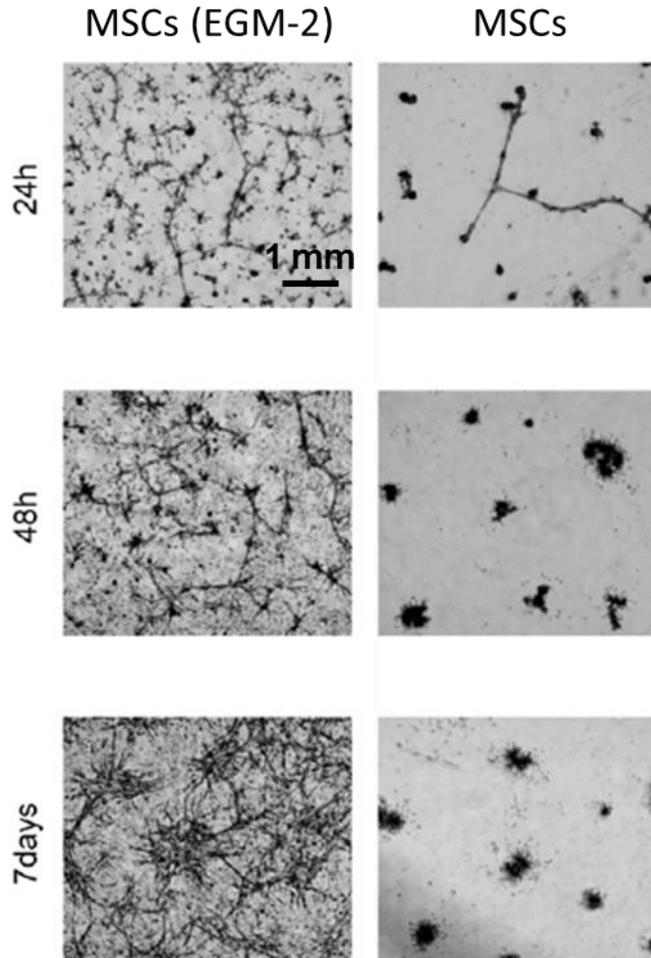


Figure 15 : Les MELs forment des pseudo-tubes en Matrigel® *in vitro* [177]

b) Etudes précliniques

- **Origine tissulaire des MSCs**

Le pouvoir pro-angiogénique des MSCs *in vivo* dépend de leur origine. Les MSCs issues du TA (ADSCs) semblent promouvoir davantage la revascularisation que les MSCs issues de la MO [154, 160]. Comme expliqué précédemment, le conditionnement des MSCs a été exploré *in vivo*.

- **Potentialisation des MSCs**

De nombreuses approches ont été mises en évidence afin d'augmenter l'efficacité thérapeutique des MSCs [180]. Les **Tableau III à VI** représentent une liste non

exhaustive des essais précliniques ayant exploité des MSCs dans des modèles animaux de HLIM.

- **Design de l'étude**

A ce jour, une variété de doses a été utilisée dans le modèle rongeur. La dose fréquemment retenue est de l'ordre du million de cellules chez les rongeurs afin d'obtenir un effet bénéfique significatif (**Tableaux III à VI**). Peu d'équipes ont étudié un effet dose [181] ; or ce point est un facteur important à prendre en considération lors des études cliniques.

De même, le mode d'administration le plus utilisé est la voie IM. Le *timing* d'administration est aussi important à définir ; la majorité des équipes administre les cellules 24 heures après l'induction de l'ischémie. Le site d'injection se situe dans un ou des muscles du membre ischémié (*Gastrocnemius*, antérieur tibial, semimembraneux, adducteur). A ces facteurs variables concernant les études précliniques, vient s'ajouter la notion de critère de jugement principal afin d'apprécier l'efficacité des cellules injectées. La majorité des études se focalisent sur l'étude du flux sanguin par Laser Doppler (LDPI : « *Laser doppler perfusion imaging* ») ou par technologie LASCA (« *Laser speckle contrast analysis* ») et l'exploration de critères fonctionnels *in vivo* (tels que l'étude de la marche et l'analyse des nécroses) et l'analyse histologique et immuno-histologique des nécroses.

	Source de MSCs	Animal	Intervention	Nbre d'injection(s)	Résultats cliniques
Amin AH <i>et al.</i> , 2010	mBM-MSCs	Souris Diabétiques db/db	0,6x10 ⁶ MSCs injectées en IM 0j post-HLIM + EGF en sc	3 sites	<ul style="list-style-type: none"> Perfusion sg dans la jambe ↗ Densité capillaire ↗
Kinnaird T <i>et al.</i> , 2004	mBM-MSCs	Souris	1x10 ⁶ MSCs injectées en IM 1j post-HLIM	6 sites	<ul style="list-style-type: none"> Densité vasculaire ↗ Atrophie musculaire et fibrose ↘ Taux d'amputation ↘
Zhang D <i>et al.</i> , 2011	mBM-MSCs ± Zinc	Souris	5x10 ⁶ MSCs injectées en IM 0j post-HLIM	5 sites	<ul style="list-style-type: none"> Perfusion sg dans la jambe ↗ Densité capillaire ↗
Zhang Y <i>et al.</i> , 2012	mBM-MSCs ± Simvastatine	Souris	2x10 ⁶ MSCs injectées en IM 0j post-HLIM	5 sites	<ul style="list-style-type: none"> Perfusion sg dans la jambe ↗ Densité capillaire ↗
Li Y <i>et al.</i> , 2010	mBM-MSCs ± Simvastatine	Souris	5x10 ⁶ MSCs injectées en IM 0j post-HLIM	5 sites	<ul style="list-style-type: none"> Perfusion sg dans la jambe ↗ Densité capillaire ↗
Ishii M <i>et al.</i> , 2009	mBM-MSCs ± Prostaglandin synthase	Souris	1x10 ⁶ MSCs injectées en IM 0j post-HLIM	6 à 8 sites	<ul style="list-style-type: none"> Perfusion sg dans la jambe ↗ Densité capillaire ↗ Taux d'amputation et nécrose ↘
Murphy MP <i>et al.</i> , 2008	mMSCs dérivées de l'endomètre	Souris	1x10 ⁶ MSCs injectées en IM 0j, 2j et 4j post-HLIM		<ul style="list-style-type: none"> Nécrose ↘
Al-Khaldi A <i>et al.</i> , 2003	rBM-MSCs	Rat	5x10 ⁶ MSCs injectées en IM 2/1j post-HLIM		<ul style="list-style-type: none"> Perfusion sg dans la jambe ↗ Densité capillaire ↗
Iwase T <i>et al.</i> , 2005	rBM-MSCs ou rBM-MNCs	Rat	1x10 ⁶ ou 5x10 ⁶ MSCs injectées en IM 0j post-HLIM	5 sites	<ul style="list-style-type: none"> Perfusion sg dans la jambe ↗ Taux d'amputation et nécrose ↘ Densité vasculaire ↗ Differenciation endotheliale et en CML vasculaire
Ishikane S <i>et al.</i> , 2008	rBM-MSCs ou MSCs dérivées de membrane foetale de rat(allogénique)	Rat	5x10 ⁶ MSCs injectées en IM 1j post-HLIM		<ul style="list-style-type: none"> Perfusion sg dans la jambe ↗ Densité capillaire ↗
Piao W <i>et al.</i> , 2010	rBM-MSCs ± Angiopoïétine-1	Rat	5x10 ⁶ MSCs injectées en IM 0j post-HLIM	2 sites	<ul style="list-style-type: none"> Perfusion sg dans la jambe ↗ Densité capillaire ↗
Li Q <i>et al.</i> , 2011	rBM-MSCs ± Netrin-1	Rat	1x10 ⁶ MSCs injectées en IM ? post-HLIM		<ul style="list-style-type: none"> Taux d'amputation et nécrose ↘ Densité capillaire ↗ Score angiographique ↗

Tableau III : Essais précliniques de TC dans l'AOMI avec injection de BM-MSCs

m : souris ; h : homme ; r : rat

	Source de MSCs	Animal	Intervention	Nbre d'injection(s)	Résultats cliniques
Nakagami H <i>et al.</i> , 2006	mAT-MSCs	Souris	1x10 ⁶ MSCs injectées en IM 10j post-HLIM	3 sites	<ul style="list-style-type: none"> Perfusion sg dans la jambe ↗
Iwashima S <i>et al.</i> , 2009	hAT-MSCs	Rat	1x10 ⁷ MSCs injectées en IM 0j post-HLIM		<ul style="list-style-type: none"> Perfusion sg dans la jambe ↗ Densité capillaire ↗
Rehman J <i>et al.</i> , 2004	hAT-MSCs	Souris	5x10 ⁵ MSCs injectées en IV 1j post-HLIM	Non applicable	<ul style="list-style-type: none"> Perfusion sg dans la jambe ↗ Taux d'amputation et nécrose ↘
Moon MH <i>et al.</i> , 2006	hAT-MSCs	Souris	5x10 ⁵ MSCs injectées en IM 1 ou 7j post-HLIM	3 sites	<ul style="list-style-type: none"> Perfusion sg dans la jambe ↗ Densité capillaire (7j > 1j) Taux d'amputation ↘
Bhang SH <i>et al.</i> , 2011	hAT-MSCs ± culture en sphéroïdes	Souris	1x10 ⁷ MSCs injectées en IM 1j post-HLIM		<ul style="list-style-type: none"> Perfusion sg dans la jambe ↗ Densité capillaire ↗ Taux d'amputation et nécrose ↘
Kang Y <i>et al.</i> , 2010	hAT-MSCs	Souris	1x10 ⁶ MSCs injectées en IM 0j post-HLIM	3 sites	<ul style="list-style-type: none"> Perfusion sg dans la jambe ↗ Densité capillaire ↗ Taux d'amputation et nécrose ↘ Différenciation myogénique ↗
Bhang SH <i>et al.</i> , 2009	hAT-MSCs dans un gel de fibrine ± FGF2	Souris	5x10 ⁶ MSCs injectées en IM 1j post-HLIM		<ul style="list-style-type: none"> Perfusion sg dans la jambe ↗ Taux d'amputation et nécrose ↘ Fibrose et dégradation musculaire ↘ Durée de survie des MSCs ↗
Cho HH <i>et al.</i> , 2009	hAT-MSCs ± Granulocyte chemoattractant protein-1	Souris	1x10 ⁶ MSCs injectées en IM 1j, post-HLIM	3 sites	<ul style="list-style-type: none"> Perfusion sg dans la jambe ↗
Kim Y <i>et al.</i> , 2007	hAT-MSCs et hBM-MSCs	Souris	1x10 ⁶ MSCs injectées en IM 1j post-HLIM	3 sites	<ul style="list-style-type: none"> Perfusion sg dans la jambe ↗ Dégradation musculaire ↘

Tableau IV : Essais précliniques de TC dans l'AOMI avec injection de MSCs issues du tissu adipeux

TA : Tissu adipeux ; m : souris ; h : homme ; FC : facteurs de croissance

	Source de MSCs	Animal	Intervention	Nbre d'injection(s)	Résultats cliniques
Laurila JP <i>et al.</i> , 2009	hMSCs dérivées de cellules embryonnaires	Rat	0,5x10 ⁶ MSCs injectées en IM 1j post-HLIM	5 sites	• Densité capillaire ↗
Kim HG <i>et al.</i> , 2011	hMSCs dérivées de la membrane amniotique	Souris	1x10 ⁶ MSCs injectées en IM 1j post-HLIM	3 sites	• Perfusion sg dans la jambe ↗ • Densité capillaire ↗
Prather WR <i>et al.</i> , 2009	hPD-MSCs	Souris	1x10 ⁶ MSCs injectées en IM 5h post-HLIM	2 sites	• Perfusion sg dans la jambe ↗ • Densité capillaire ↗ • Tests fonctionnels ↗ • Stress oxydant et inflammation ↗
Nishishita T <i>et al.</i> , 2004	hPD-MSCs	Souris	1x10 ⁶ MSCs injectées en IM 7j post-HLIM	5 à 6 sites	• Perfusion sg dans la jambe ↗
Bhang SH <i>et al.</i> , 2011	hUCB-MSCs dans un gel de fibrine ± FGF2	Souris	2x10 ⁶ MSCs injectées en IM 1j post-HLIM		• Perfusion sg dans la jambe ↗ • Durée de survie des MSCs ↗ • Fibrose et dégradation musculaire ↗
Kim SW <i>et al.</i> , 2006	hUCB-MSCs	Souris	1,3x10 ⁶ MSCs injectées en IM 0j post-HLIM	?	• Perfusion sg dans la jambe ↗ • Taux d'amputation et nécrose ↗
Koponen JK <i>et al.</i> , 2007	hUCB-MSCs	Souris	1x10 ⁶ MSCs injectées en IM 0j post-HLIM	8 à 10 sites	• Régénération musculaire ↗ • Densité capillaire →
Choi M <i>et al.</i> , 2013	hWJ-MSCs + - Milieu DMEM-LG : VEGF, EGF, hydrocortisone - Milieu EGM-2 MV : EGF, VEGF, bFGF, IGF-1, Ac ascorbique, Hydrocortisone, Héparine	Souris	5x10 ⁵ MSCs injectées en IM 0j post-HLIM	?	• Perfusion sg dans la jambe ↗ • Densité capillaire ↗ • Sécrétome des WJ-MSCs
Lee EJ <i>et al.</i> , 2013	hBM-MSCs ± Milieu : Forskolin, bFGF, PDGF-AA, heregulin-β1	Souris nude	5x10 ⁴ MSCs injectées en IM 0j post-HLIM	?	• Perfusion sg dans la jambe ↗ dans le groupe MSCs cultivées dans le milieu enrichi
Smadja D <i>et al.</i> , 2012	hBM-MSCs de patients atteints d'ICMI (n=11) versus hBM-MSCs témoins appariés en âge (n=4)	Souris nude	1x10 ⁶ MSCs injectées en IV 0j post-HLIM	Non applicable	• Perfusion sg dans la jambe (CLI-MSCs) > PBS • Perfusion sg dans la jambe (CLI-MSCs) = Control-MSCs

Tableau V : Essais précliniques de TC dans l'AOMI avec injection de MSCs issues de tissus embryonnaires ou fœtaux

h : homme ; UCB : Umbilical cord-blood ; WJ : Wharton's Jelly ; PD : *Placenta-derived*

	Source de MSCs	Animal	Intervention	Nbre d'injection(s)	Résultats cliniques
Su GH <i>et al.</i> , 2013	BM-MSCs transfectées avec le gène HGF	Rat	5x10 ⁶ MSCs injectées en IM 7j post-HLIM	5 sites	<ul style="list-style-type: none"> Densité capillaire ↗ Expression cytokines proangiogéniques (VEGF) ↗ Nbre de cellules transfectées viables à 7 j ↗
Lu W <i>et al.</i> , 2017	rMSCs transfectées avec le gène HIF2 α	Rat	5x10 ⁶ MSCs injectées en IM 0j post-HLIM	6 sites	<ul style="list-style-type: none"> Perfusion sg dans la jambe ↗ Densité capillaire ↗ Tests fonctionnels ↗
Yim T <i>et al.</i> , 2015	hPD-MSCs transfectées avec les gènes FGF2 et PDGF-BB	Lapin	5x10 ⁶ MSCs injectées en IM 7j post-HLIM	?	<ul style="list-style-type: none"> Score angiographique ↗
Rosova I <i>et al.</i> , 2008	hBM-MSCs en préconditionnement Hypoxique (1% O ₂) versus Normoxique (21% O ₂)	Souris	5x10 ⁵ MSCs injectées en intraventriculaire 1j post-HLIM	Non applicable	<ul style="list-style-type: none"> Perfusion sg dans la jambe ↗
Leroux L <i>et al.</i> , 2010	mBM-MSCs en préconditionnement Hypoxique (1% O ₂) versus Normoxique (21% O ₂)	Souris	0.5x10 ⁶ MSCs injectées en IM 2j post-HLIM	Multi-sites	<ul style="list-style-type: none"> Perfusion sg dans la jambe ↗ Densité capillaire ↗ Régénération musculaire ↗
Han KH <i>et al.</i> , 2017	hUCB-MSCs en préconditionnement Hypoxique (1% O ₂) versus Normoxique (21% O ₂)	Souris	1x10 ⁵ MSCs injectées en IM 0j post-HLIM		<ul style="list-style-type: none"> Perfusion sg dans la jambe ↗ Densité capillaire ↗ Score d'ischémie ↗
Rosova I <i>et al.</i> , 2010	hMSCs + shRNA de cMét en préconditionnement Hypoxique (1% O ₂)	Souris	1x10 ⁶ MSCs injectées en IM 1j post-HLIM	3 sites	<ul style="list-style-type: none"> Perfusion sg dans la jambe ↗
Lian Q <i>et al.</i> , 2010	hBM-MSCs ou iPS-MSCs humaines	Souris	3x10 ⁶ MSCs injectées en IM 0j post-HLIM	4 sites	<ul style="list-style-type: none"> Perfusion sg dans la jambe ↗ Taux d'amputation et nécrose ↘ Tests fonctionnels ↗ Différenciation endothéliale et en CML vasculaire Fibrose et inflammation ↘

Tableau VI : Essais précliniques de TC dans l'AOMI avec injection de MSCs modifiées

m : souris ; h : homme ; r : rat ; PD : *Placenta-derived*

IV. REVASCULARISATION POST-ISCHEMIQUE : MECANISMES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES

A. Croissance et remodelage vasculaire : rôle dans la réparation des tissus ischémiés.

1. Différents processus régissent la croissance vasculaire post-ischémique

Plusieurs processus différents et complémentaires sont impliqués dans la formation d'un réseau vasculaire fonctionnel.

a) *Vasculogenèse*

Au cours de la vie embryonnaire, la vasculogenèse permet d'initier la formation du plexus vasculaire dont l'origine est le mésoderme. Ce processus permet d'obtenir des vaisseaux sanguins primitifs à partir de la différenciation d'EPCs. Ces derniers issus de la MO [105], sont recrutés sous l'influence de cytokines et de FC qui permettent aussi leur différenciation en ECs. Seuls 8 à 11% des ECs composant les néovaisseaux sanguins proviennent d'EPCs différenciés en ECs [182].

La vasculogenèse est donc le nom donné aux événements cellulaires initiaux, commençant par la prolifération d'EPCs qui se différencient pour former localement des tubules d'ECs (tubules primitifs). Ces tubules se joignent ensemble, il en résulte un plexus vasculaire indifférencié avec peu ou pas d'organisation (pas d'artérioles ou veinules) dans lequel le flux sanguin reste chaotique et non fonctionnel.

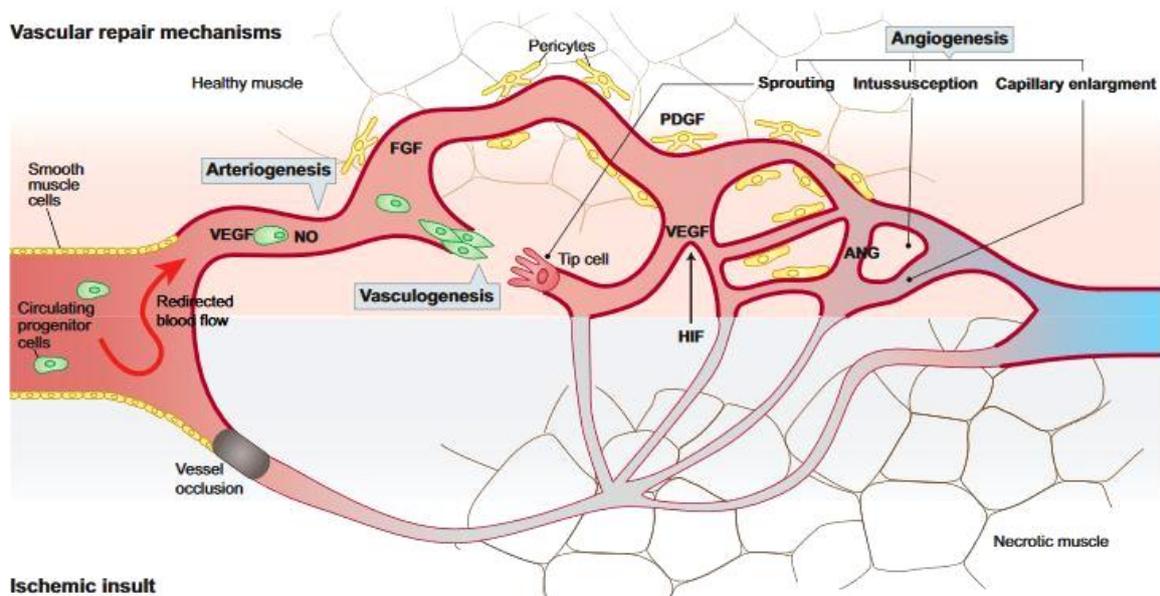


Figure 16 : Mécanismes de réparation vasculaire

Lors d'une occlusion artérielle, l'artériogénèse (c'est-à-dire la croissance collatérale) est induite par la réorientation du flux sanguin, entraînant une augmentation de la contrainte de cisaillement et une production ultérieure de cytokines dans l'endothélium vasculaire. Des facteurs tels que le VEGF et le NO sont responsables de l'élargissement et de la croissance des collatérales, tandis que des facteurs tels que le PDGF et le FGF interviennent dans la stabilisation des vaisseaux en recrutant des péricytes. Le tissu hypoxique distal par rapport à l'occlusion exprime des facteurs de transcription tels que HIF, ce qui induit la production de protéines angiogéniques telles que le VEGF et l'Angiopoïétine, impliquées dans la modulation du système vasculaire distal (angiogénèse). L'angiogénèse peut inclure la germination, l'intussusception ou l'élargissement capillaire. La vasculogénèse pourrait également contribuer à la réparation vasculaire post-ischémique par l'incorporation de cellules progénitrices endothéliales circulantes dans les structures vasculaires en formation [66].

b) Angiogénèse

L'angiogénèse contribue au développement d'une microvasculature plus élaborée et permet la formation de nouveaux vaisseaux (« *daughter vessels* ») à partir de vaisseaux préexistants (« *mother vessel* ») (**Figure 16**). Ce phénomène se déroule en quelques jours selon trois mécanismes différents [183] :

- ✓ Le bourgeonnement ou « *sprouting* » d'ECs à partir de vaisseaux préexistants après activation de FC. Ce mécanisme se fait à partir d'ECs spécialisées : les « *Tip cells* »
- ✓ L'« *intussusception* » qui correspond à l'élargissement d'un vaisseau préexistant et à l'invagination de la paroi pour former deux vaisseaux. Les ECs sécrètent alors les composants nécessaires à la formation de la MEC

- ✓ Le « *bridging* » est provoqué par la division de vaisseaux préexistants en vaisseaux secondaires

L'angiogenèse est donc le processus par lequel ce plexus se différencie et s'organise en un réseau de capillaires fonctionnels. Cette étape implique essentiellement le démarrage d'ECs des extrémités et des parois du tubule endothélial primitif préexistant.

Ces étapes initiales, vasculogenèse suivie par l'angiogenèse, entraînent la formation d'un réseau capillaire étroit (<10 µm de diamètre) de microvaisseaux.

c) *Artériogenèse*

Lorsque ces deux dernières phases sont achevées, l'artériogenèse se met en place. Elle correspond à la formation de structures plus larges (artéριοles, veinules, anastomoses artério-veineuses), suivies par la production de CML (myogenèse) ainsi que l'apparition de MEC consolidant les parois des structures vasculaires et la formation de **péricytes** autour des vaisseaux.

La résistance artérielle ainsi que la conductance sont générées par le développement de leur media ainsi que de l'adventice. Pendant ce temps, les CML conservent un phénotype sécrétoire : ils synthétisent des FC (qui seront détaillés dans la suite du manuscrit) et des composants de la MEC. Les propriétés contractiles de ces cellules se développent plus tardivement. L'ensemble de ces événements depuis la myogenèse jusqu'à la différenciation en péricytes font partie d'un processus nommé l'artériogenèse.

d) *Réseau vasculaire collatéral*

De plus, une croissance des collatérales s'établit, celles-ci forment des connexions entre les artères principales et sont responsables de la majorité du flux sanguin « régional ». La circulation collatérale, dont le débit est physiologiquement bas, peut se développer en réseau vasculaire fonctionnel. Dans des conditions favorables, ces collatérales peuvent assurer une bonne perfusion « régionale » en cas d'occlusion d'une artère majeure protégeant ainsi les tissus environnants d'ischémie nécrasante.

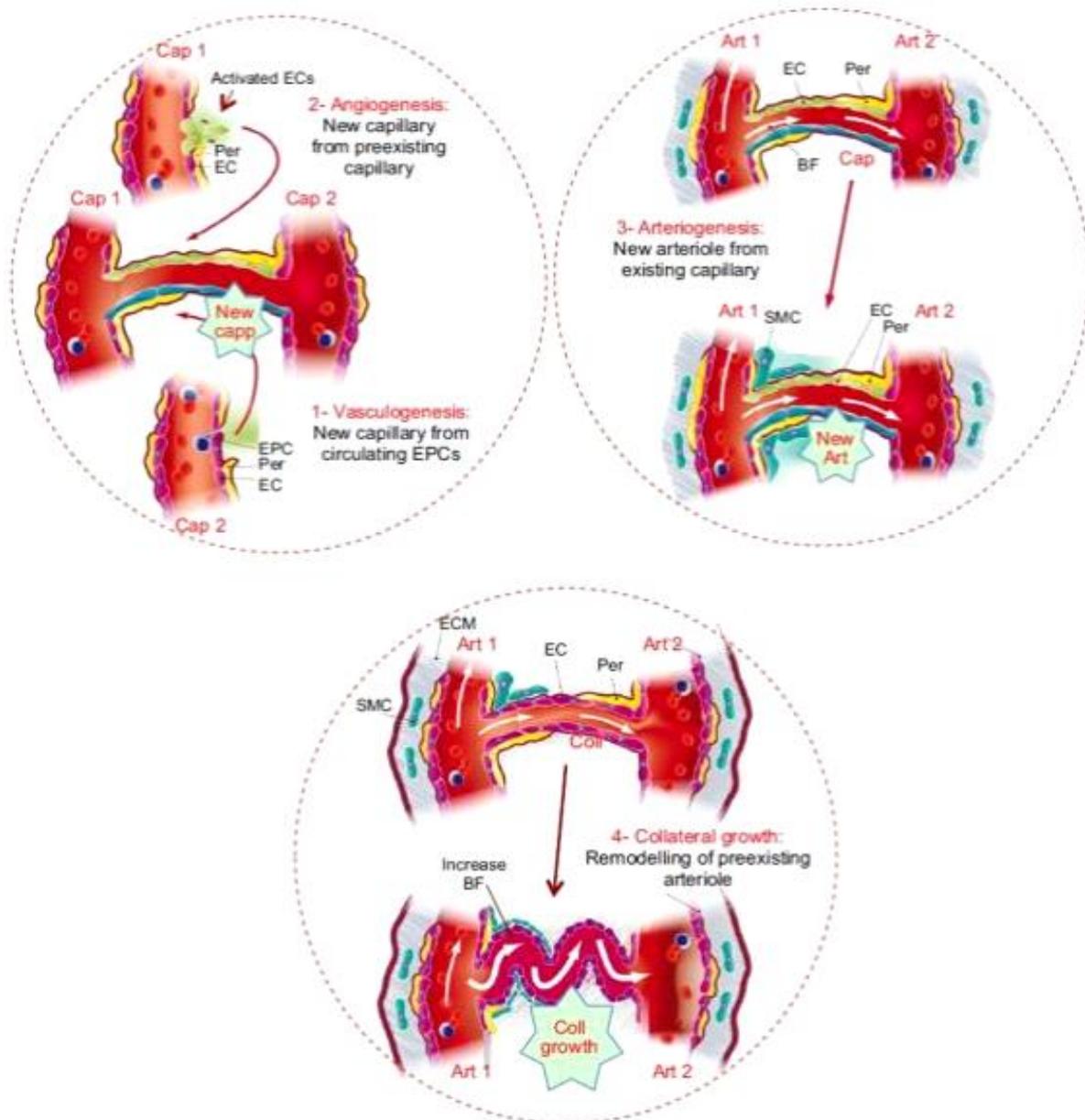


Figure 17 : Phénomènes et mécanismes orchestrant la revascularisation [184]

Des processus distincts mais complémentaires gouvernent la revascularisation post-ischémique.

1. *La vasculogénèse fait référence à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'EPCs.*
2. *L'angiogénèse correspond au bourgeonnement de capillaires (Cap) à partir de capillaires existants.*
3. *L'artériogénèse est l'étape de stabilisation de ces néovaisseaux grâce aux CML et aux péricytes (Per) formant de nouvelles artérioles (Art).*
4. *La croissance des collatérales (Coll) correspond à la croissance et au remodelage des artérioles préexistantes qui initialement avaient un flux sanguin (FS) faible.*

Il faut garder à l'esprit que l'artériogénèse et la croissance des collatérales sont deux notions différentes :

- ✓ l'artériogénèse étant l'apparition de nouvelles structures artériolaires
- ✓ la croissance des collatérales induit le remodelage et le développement d'anastomoses artérielles déjà présentes mais ayant un flux sanguin bas afin d'obtenir un réseau vasculaire étant capable de satisfaire la perfusion nécessaire des tissus concernés (**Figure 17**).

Ces multiples processus complexes requièrent la coordination et la régulation précises de nombreux facteurs activateurs et /ou inhibiteurs interagissant avec des cellules vasculaires ou extra vasculaires. Ces mécanismes de régulation diffèrent d'un tissu ou d'un organe à l'autre et permettent d'obtenir des réseaux vasculaires hautement différenciés. A titre d'exemple, il existe de nombreuses différences anatomiques, histologiques et fonctionnelles entre les architectures vasculaires du foie, du poumon, du rein, du cerveau ou de la peau.

2. Croissance vasculaire post-ischémique et remodelage tissulaire

Ces différents processus sont initiés durant l'embryogénèse mais peuvent aussi être induits à l'âge adulte dans des situations physiologiques ou pathologiques. Dans ce contexte, l'homéostasie vasculaire joue un rôle majeur dans le remodelage des tissus en ischémie et peut s'avérer être une cible thérapeutique intéressante pour le rétablissement de la fonctionnalité d'organes ou de tissus ischémiques dans des pathologies telles que l'ischémie des membres inférieurs. Effectivement, suite à l'ischémie, le muscle squelettique subit une cascade d'évènements moléculaires, cellulaires et extracellulaires.

De manière générale, la cicatrisation tissulaire peut se diviser en trois grandes phases :

- 1) Après la formation d'un thrombus occlusif induisant une **hypoperfusion** et une **ischémie**, des modifications métaboliques apparaissent entraînant la nécrose ou l'apoptose des cellules touchées.
- 2) Une seconde **phase inflammatoire** est caractérisée par le « *homing* » de polynucléaires neutrophiles (PNN), Monocytes (Mo) et Ly et leur migration vers les sites de nécrose afin de « nettoyer » les débris cellulaires.

- 3) Il s'ensuit une **phase de régénération** et de **remodelage** caractérisée par la migration et la différenciation de myofibroblastes et le dépôt de protéines de la MEC (avec parfois l'apparition de tissu cicatriciel permettant de remplacer le tissu nécrosé). Durant la dernière phase, des néovaisseaux se forment ou des vaisseaux préexistants se remodelent sous le contrôle d'un programme pro-angiogénique local, d'une balance immuno-inflammatoire et de cellules progénitrices vasculaires circulantes.

Dans ce contexte, la vasculogénèse, l'angiogénèse, l'artériogénèse et la croissance des collatérales sont orchestrées dans le temps et l'espace afin d'établir un réseau vasculaire fonctionnel dans les sites ischémiques. L'artériogénèse et le remodelage de vaisseaux préexistants permettent probablement d'accroître le flux sanguin. Le développement de nouveaux capillaires (*via* la vasculogénèse et angiogénèse), il permet d'empêcher une destruction tissulaire massive. Bien que les stimuli initiaux soient différents, la vasculogénèse, l'angiogénèse, l'artériogénèse et la croissance des collatérales nécessitent les mêmes FC, les mêmes cytokines ainsi que les mêmes protéases qui activent de manière différente mais interdépendante ces quatre mécanismes (**Figure 18**).

L'élucidation des mécanismes gouvernant la néovascularisation spontanée et le développement de stratégies thérapeutiques pro-angiogéniques représentent un enjeu majeur de santé publique.

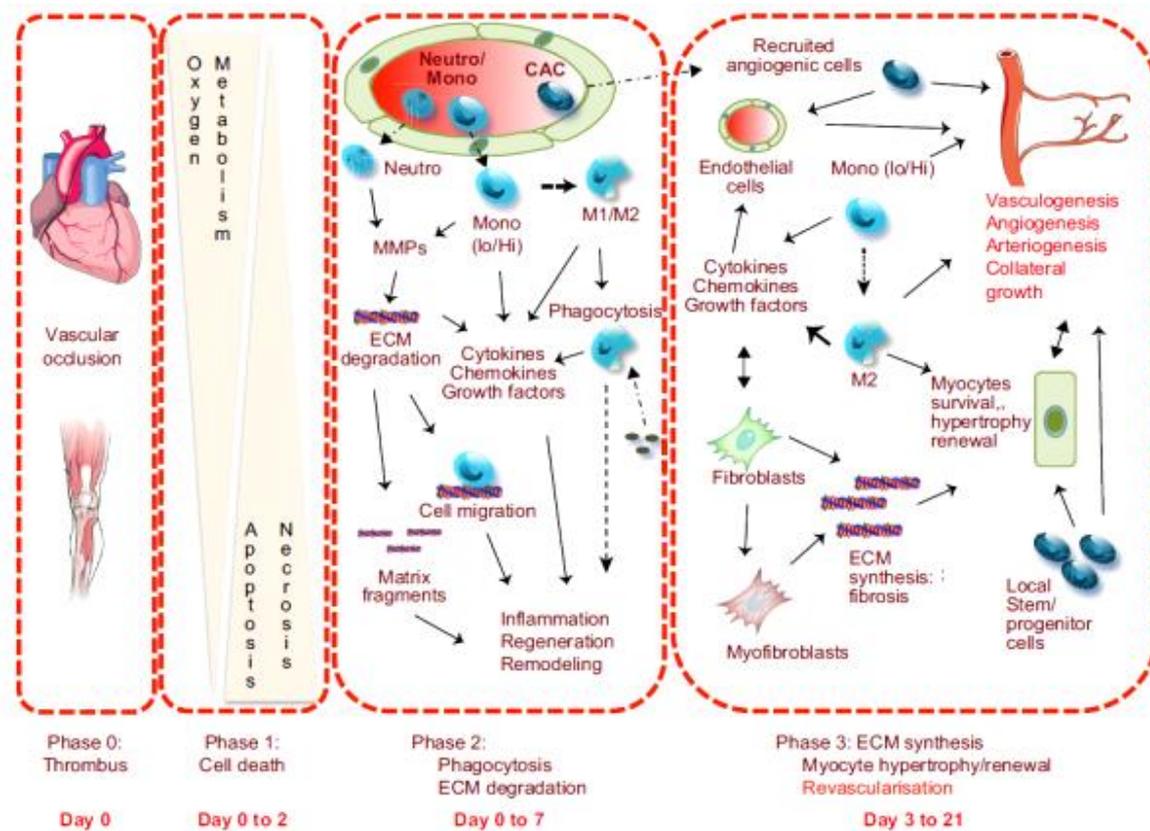


Figure 18 : Réparation tissulaire post-ischémique [184]

- ✓ **Phase 0 : Thrombus**
- ✓ **Phase 1 :** suite à un thrombus initial, il se produit des évènements ischémiques (hypoxie, hypoperfusion, dysrégulation métabolique). Les cellules endommagées subissent une apoptose ou une nécrose.
- ✓ **Phase 2 :** la phase inflammatoire où entrent en jeu les PNN (neutro), les Monocytes (Mono) et les Lymphocytes afin de retirer les débris cellulaires accumulés lors de la première phase.
- ✓ **Phase 3 :** phase de remodelage et de régénération associée à la migration et à la différenciation des myofibroblastes. Cette phase correspond aussi à la synthèse de la MEC pouvant éventuellement aboutir à de la fibrose. Durant cette phase de nouveaux vaisseaux se forment sous le contrôle de FC. de progéniteurs (progénit.) locaux ou à partir du recrutement des EPCs. Les quatre processus de revascularisation sont orchestrés simultanément. L'artériogénèse et le remodelage des vaisseaux pré existants conduisent à une augmentation plus importante du flux sanguin. La vasculogénèse et l'angiogénèse permettant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins empêchant la dégradation massive de tissu hypoxique. Ces mécanismes sont interdépendants et associés sous le contrôle des mêmes chimiokines, signaux pro-angiogéniques, cellules inflammatoires et protéases (M1/M2, macrophage type 1 and 2; MMPs, Métalloprotéinases)

B. L'hypoxie et la revascularisation post-ischémique

L'apport en O₂ et en nutriments aux $\approx 10^{14}$ cellules de notre organisme est régulé dans les conditions physiologiques par la circulation sanguine. L'hypoxie tissulaire est définie par un déséquilibre entre l'apport et la demande en O₂. Durant l'ischémie, la perfusion sanguine étant réduite, les besoins métaboliques ne sont pas satisfaits. La principale voie de signalisation induite par l'hypoxie nécessite l'activation du facteur de transcription HIF qui permet l'activation d'un set de gènes notamment celui codant pour le principal facteur de croissance pro-angiogénique VEGF. Des souris invalidées pour HIF-1 décèdent rapidement en conditions d'hypoxie [185]. HIF est un facteur de transcription ubiquitaire dirigeant une réponse adaptative suite à l'hypoxie dans toutes les cellules nucléées. Il est non fonctionnel à l'état basal dans les cellules « oxygénées » et devient actif en cas de stress hypoxique.

1. Les différents acteurs de la revascularisation post-ischémique

a) *HIF*

Le principal déclencheur de la néogenèse vasculaire est l'hypoxie tissulaire qui s'exprime par la voie de signalisation dépendante de HIF. Les HIFs sont des facteurs de transcription qui induisent l'expression de nombreux gènes qui jouent un rôle dans la revascularisation post-ischémique. Il existe deux types de HIFs régulés par l'hypoxie, HIF-1 et HIF-2, dont l'expression est variable et présentent une sensibilité différente à l'oxygène.

HIF-1 semble être le facteur de transcription le plus dépendant de l'oxygène et le plus impliqué dans la régénération vasculaire post-ischémique. Le facteur HIF-1 est une unité protéique composée de sous unités α et β . Ces sous-unités se subdivisent en sous catégories HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α pour la sous-unité α et ARNT1, ARNT2 et ARNT3 pour la sous-unité β . HIF1- α est le facteur le plus impliqué dans la vascularisation suite à l'hypoxie. L'expression de HIF-1 α est ubiquitaire et sa dégradation dépend de l'oxygène [186].

- ✓ **Dans les conditions physiologiques de normoxie**, HIF-1 α est indétectable car il est rapidement dégradé dans le protéasome.
- ✓ **En cas d'hypoxie**, HIF-1 α activé peut être transloqué dans le noyau. Dans le noyau il se dimérise avec HIF-1 β et active la transcription de nombreux gènes pro-angiogéniques en se fixant sur leur séquence HRE (« *Hypoxia regulated enhancer* ») [187]. Par des mécanismes directs ou indirects, HIF-1 α induit l'expression de plusieurs molécules pro-angiogéniques telles que le VEGF et l'eNOS (*endothelial Nitric Oxide Synthase*) (**Figure 19**).

HIF-1 α est également impliqué dans le **recrutement des cellules progénitrices** nécessaires à la vasculogénèse en conduisant à l'activation de l'expression de chimiokines telles que CXCL12 (ou SDF-1). Enfin, HIF-1 α joue un rôle dans la réaction inflammatoire en contrôlant l'infiltration et l'activation des cellules myéloïdes *via* un mécanisme dépendant du VEGF.

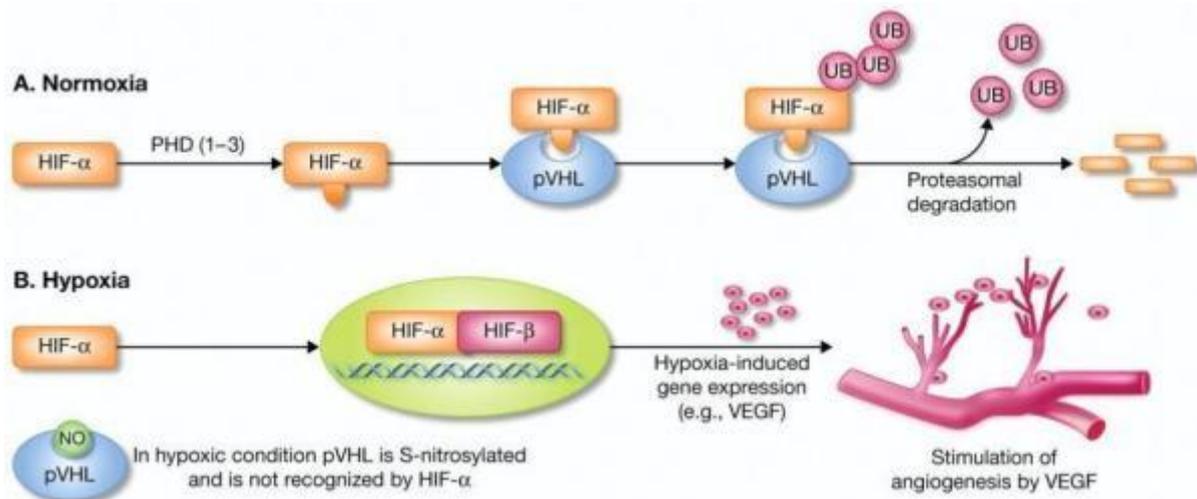


Figure 19 : Rôle et mécanisme d'action de HIF1- α [188]

- A. En présence d'oxygène**, les résidus proline de HIF1- α sont hydroxylés par PHD. Ceci permet à HIF1- α d'interagir avec la protéine pVHL (Von Hippel Lindau protéine). Cette interaction aboutit à l'ubiquitination de HIF1- α et à sa dégradation dans le protéasome.
- B. En condition d'hypoxie**, HIF-1 α n'est plus hydroxylé et il n'y a pas d'interaction entre HIF1- α et pVHL ; HIF1- α n'est donc plus dégradé. Il transloque dans le noyau, se dimérise avec HIF1- β afin de se fixer sur le domaine de régulation HRE de nombreux gènes pro-angiogéniques et d'en activer la transcription tels que celui codant pour le VEGF.

De plus, les gènes cibles de HIF sont aussi impliqués dans le métabolisme, l'érythropoïèse, l'homéostasie et l'autophagie [189]. En conditions hypoxiques HIF1- α induit une transition de la voie oxydative à la voie de la glycolyse anaérobie en activant la transcription des gènes PDK1 (*Pyruvate déshydrogénase kinase 1*) et LDHA (*Lactate déshydrogénase A*) entre autres. PDK1 phosphoryle le pyruvate empêchant sa dégradation et LDHA le convertit ainsi en lactate.

HIF1- α contrôle le processus de revascularisation post-ischémique. Dans de nombreuses études expérimentales, l'augmentation de l'activité de HIF1- α a provoqué une augmentation de la collatéralisation et de l'arbre vasculaire. L'expression de HIF1- α dans les sites de lésions provoque une mobilisation des EPCs et la revascularisation dans les tissus ischémiés [190].

b) VEGF

Étant donné la complexité du processus d'angiogenèse, il est important de souligner le rôle prédominant du facteur de croissance, VEGF. La famille du VEGF est composée de 5 homodimères (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et PlGF). VEGF-A est l'acteur principal de l'angiogenèse post-ischémique [191]. Ce dernier existe sous 5 isoformes dont la différence réside dans leur affinité aux récepteurs du VEGF et à leur périmètre d'action [192]. Le PlGF, en se fixant sur VEGFR-1 présent à la surface des ECs, permet de potentialiser l'action du VEGF-A sur son récepteur VEGFR-2 (**Figure 20**). La fixation de VEGF à un de ses récepteurs induit la dimérisation de ce dernier et sa phosphorylation [193] selon trois mécanismes différents :

- ✓ Autophosphorylation
- ✓ Phosphorylation *via* l'interaction avec le corécepteur NP1 (*Neuropiline 1*) qui permet d'augmenter l'affinité du VEGF pour VEGFR-2
- ✓ Phosphorylation « mutuelle » entre VEGFR-2 et des récepteurs de type intégrines [194]. La fixation du VEGF à son récepteur VEGFR-2 induit son activation et la phosphorylation de l'intégrine qui à son tour agit en synergie en amplifiant l'état de phosphorylation de VEGFR-2. Ceci favorise l'adhésion des ECs et leur migration dirigée le long de la MEC [194].

Le VEGF-A est indispensable et essentiel à l'activation des ECs et permet d'initier la formation de néovaisseaux par angiogenèse ou vasculogenèse [195, 196]. Concernant la vasculogenèse, il stimule la différenciation des EPCs en ECs [197]. Concernant l'angiogenèse, c'est le gradient de VEGF, mis en place grâce à la dégradation de la MEC par protéolyse, qui permet d'initier le bourgeonnement et la prolifération des ECs jusqu'au site ischémié. En diminuant l'expression des protéines de jonction, il contribue à la formation de vaisseaux immatures hyper perméables [198]. Dans le cas de l'angiogenèse et de la vasculogenèse, l'effet du VEGF-A passe par le récepteur VEGFR-2 [199].

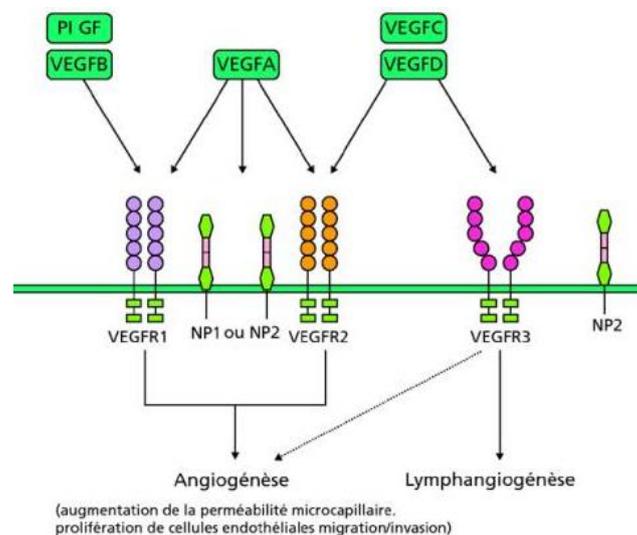


Figure 20 : VEGF et ses récepteurs [200]

Le rôle central du récepteur VEGFR-2 dans la vasculogenèse et l'hématopoïèse a été mis en évidence grâce aux souris invalidées (souris *knock-out*) pour le gène *VEGFR-2* dont les embryons meurent *in utero* dès les premiers jours du développement dû à des malformations des vaisseaux et du sang. La signalisation VEGF/VEGFR-2 inhibe l'apoptose des ECs en activant la voie de transduction *PI3K/Akt* (**PI3K** : phosphatidylinositol 3-kinase et **Akt** : protéine kinase B) qui induit l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 [195]. Le VEGFR-2 est également le médiateur principal des effets mitogénique, angiogénique et perméabilisant du VEGF.

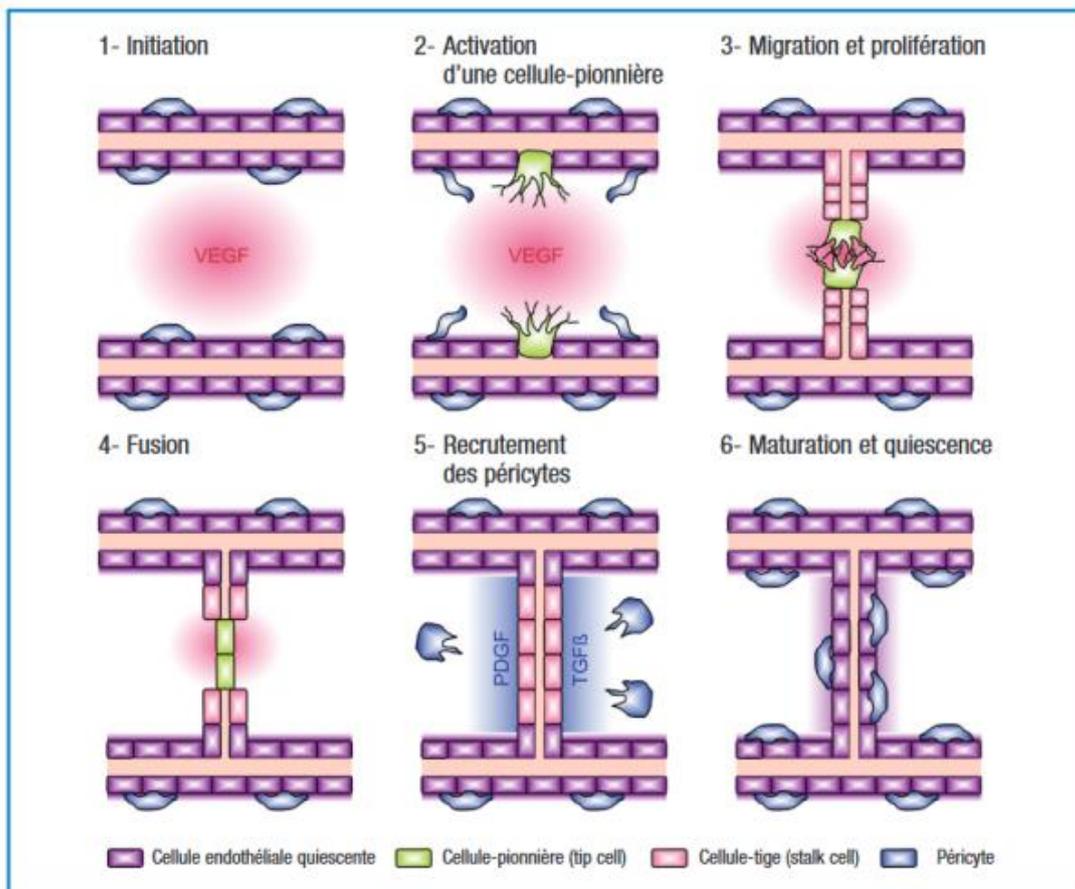


Figure 21 : Les étapes cellulaires de l'angiogenèse

La construction d'un nouveau capillaire sanguin à partir d'un réseau vasculaire préexistant nécessite deux grandes étapes complémentaires : une phase d'activation et une phase de maturation. Au cours de l'étape d'activation, des FC tels que le VEGF se lient à leurs récepteurs à la surface des ECs et induisent la sécrétion de protéases permettant la dégradation de la membrane basale du vaisseau. Ils stimulent aussi la migration des ECs et leur prolifération. Une EC s'engage vers un phénotype « tip-cell » (cellule de pointe) émettant des filopodes et migrant dans la matrice dégradée tout en « palpant » son environnement. Les cellules au contact de la « tip-cell » adoptent alors un phénotype différent, appelé « stalk-cell » (cellule organisée en tige), restant alignées et jointives derrière la « tip-cell » et allongeant progressivement le bourgeon vasculaire par le biais de divisions mitotiques.[201]

c) FGF

La famille du FGF (*Fibroblast growth factor*) a été la première décrite comme ayant un effet sur la croissance des ECs [202]. Il existe 22 isoformes du FGF [203]. Ce sont essentiellement des protéines sécrétées à l'exception de FGF-1 (acide, FGFa) et FGF-2 (basique, FGFb) qui sont exprimés à la surface des cellules et dont l'activation induit

leur relargage. Ces deux isoformes ont un fort potentiel pro-angiogénique mis à profit dans des études ou des essais cliniques pour le traitement de l'ICMI [204].

Les isoformes FGF contiennent tous un site de liaison aux glycosaminoglycane (GAG) de type héparane sulfate qui leur permet d'être séquestrés dans la MEC puis d'être libérés suite à la protéolyse de la MEC. Ce site de liaison leur permet également de se lier à leurs récepteurs FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3, FGFR-4 [205, 206]. La fixation du ligand sur le récepteur induit la dimérisation de ce dernier et son activation *via* l'autophosphorylation de ses résidus tyrosine intracellulaires [206]. Cette activation va à son tour induire une cascade de phosphorylation de protéines kinases, notamment celles impliquées dans les voies ERK, Src et Ras qui contribuent à la migration et à la différenciation des ECs [207].

d) PDGF

Les protéines de la famille du PDGF (*Platelet-derived growth factor*) sont des protéines dimériques (homodimères ou hétérodimères) composées de 4 chaînes polypeptidiques. Il existe quatre isoformes de la protéine : PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C et PDGF-D. Les récepteurs du PDGF sont le PDGFR- α et le PDGFR- β qui sont des récepteurs à tyrosine kinase. Les ligands PDGF-A, PDGF-B et PDGF-C se fixent au récepteur PDGFR- α avec une grande affinité. Les ligands PDGF-B et PDGF-D peuvent se fixer au PDGFR- β [208]. Le système ligand/récepteur PDGF-A/ PDGFR- α est retrouvé principalement dans les ECs et les cellules vasculaires musculaires lisses [209]. Il est important de noter que de son côté, le PDGF-B est surtout impliqué dans le développement des néovaisseaux par lesquels il est produit. Son récepteur, le PDGFR- β est fortement exprimé par les MSCs et les CML vasculaires en cours de développement [210] (**Figure 21**).

e) Monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) est un gaz vasodilatateur qui diffuse facilement au travers des membranes biologiques. En revanche, sa demi-vie de l'ordre de la seconde limite l'ampleur de ses effets et sa diffusion à travers les tissus. Il est synthétisé par la NO synthase (NOs) qui elle-même existe sous 3 isoformes : NOs inducible (iNOs), neuronale (nNOs), endothéliale (eNOs). La nNOs est exprimée de manière constitutive

à la surface des neurones et l'eNOs à la surface des ECs [211]. Le NO participe directement aux effets du VEGF-A et réprime les promoteurs de gènes codant pour la thrombospondine anti-angiogénique.

f) *Angiopoïétines*

Il existe 4 ligands angiopoïétines : Ang-1, Ang-2, Ang-3, Ang-4 et 2 récepteurs Tie1 et Tie2. Les 4 angiopoïétines peuvent se fixer sur Tie2. Ang-1 et Ang-2 sont les agonistes de Tie2, en revanche Ang-3 et Ang-4 agissent comme des antagonistes [212].

- ✓ L'Ang-1 est exprimée par les CML vasculaires et les péricytes de manière constitutive et contribue à la protection de l'endothélium [212].
- ✓ L'Ang-2 est très faiblement retrouvée dans les conditions physiologiques et ce exclusivement dans les ECs où elle est stockée dans les corps de Weibel Palade [212]. L'Ang-1 et l'Ang-2 agissent en quelque sorte en antagonisme sur le récepteur Tie2.
- ✓ Le récepteur Tie2 est retrouvé à la surface des ECs ainsi qu'à la surface des HSCs mais en proportion plus faible. C'est un récepteur comprenant un domaine de fixation extracellulaire et un domaine intracellulaire à type tyrosine kinase [212].

2. HIF et les acteurs clefs de la genèse vasculaire

HIF1- α contrôle l'expression de VEGF-A et de son récepteur VEGFR-1, de chimiokines telles que CXCL12 (ou SDF-1, *Stromal derived factor 1*), de l'Ang-2, du PDGF-B, et du SCF (*Stem cell factor* ou c-Kit ligand) [213].

Plus particulièrement, HIF1- α régule l'expression de VEGF-A [214] qui, une fois sécrété, se lie à ses récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2. VEGF-A pourrait activer la prolifération et la survie cellulaire *via* des mécanismes dépendants du PI3K/Akt [215]. Akt contribue à l'angiogenèse en inhibant l'apoptose et en phosphorylant l'eNOS. Ce dernier produit le NO qui participe directement aux effets du VEGF-A. De plus, le NO réprime le promoteur de nombreux gènes anti-angiogénique tel que celui codant pour la thrombospondine 2.

3. HIF et la voie inflammatoire

Il existe aussi une synergie entre la voie hypoxique contrôlée par HIF, l'induction et l'intensité de la réaction inflammatoire qui est modulée elle-même par le facteur de transcription NF- κ B (*Nuclear factor-kappa B*). L'expression de HIF est essentielle pour les fonctions inflammatoires des Mo et des PNN [216].

HIF régule la survie des PNN de manière dépendante du NF- κ B [217]. A son tour NF- κ B peut aussi augmenter les taux de HIF-1 α par des mécanismes transcriptionnels [218]. D'autres cytokines pro-inflammatoires telles que le TGF- β (*Transforming growth factor- β*) [219] et l'IL-1 β [220] amplifient l'action de HIF-1 α . A son tour HIF contrôle l'expression de CXCL12, qui joue un rôle crucial dans la réponse inflammatoire post-ischémique. De plus, l'activation indirecte de la voie HIF conduit à l'expression de nombreuses chimiokines (CCL2, CCL5, CX3CL1, CXCL12). Ces chimiokines amplifient le recrutement des monocytes-macrophages et des lymphocytes aux sites ischémiés [221]. HIF induit aussi la production de β 2-intégrine qui favorise l'adhésion leucocytaire [222]. L'activation du remodelage vasculaire se fait *via* les macrophages M2 résidant, conduisant à une augmentation du recrutement des CML et à leur prolifération.

C. Inflammation et revascularisation post-ischémique

De nombreuses cellules inflammatoires sont mobilisées sur le site ischémié où elles jouent un rôle essentiel dans la revascularisation et le remodelage vasculaire [223].

1. Cellules myéloïdes et la néovascularisation

a) Les polynucléaires neutrophiles (PNN)

Le rôle des PNN dans la revascularisation n'est pas complètement défini. Ils sont les premiers recrutés sur le site ischémié : ils s'infiltrent au bout de quelques heures et sont majoritaires 24 heures après l'ischémie. Ils sécrètent l'élastase dont l'effet est anti-angiogénique et la sérine-protéase qui induit l'apoptose des ECs [224]. Ils

représentent une source importante de ROS (*Reactive oxygen species*) pouvant occasionner des dommages cellulaires [223].

b) Les Monocytes/Macrophages (Mo/M)

Les **Mo** : le rôle des monocytes dans la revascularisation post-ischémique a été décrit par Schape *et al.*, au cours d'une étude préclinique d'ICMI chez le lapin. Ils ont constaté la présence d'un infiltrat monocytaire à proximité des vaisseaux et associé au développement de nombreux capillaires et de CML [71]. Les Mo promeuvent l'angiogenèse et la croissance des collatérales selon un mode paracrine en sécrétant divers FCs tels que le FGFb et le VEGF [225]. Ils sont aussi une source majeure de MMPs telles que la MMP-9 qui est impliquée dans la dégradation de la MEC, dans l'embranchement et l'émergence des néovaisseaux sur le réseau vasculaire [226]. Des études récentes suggèrent que les monocytes/macrophages seraient impliqués dans une fusion avec les ECs « *tip cells* » conduisant à la formation du réseau vasculaire [227].

Il existe deux sous populations de Mo :

- ✓ les CD14^{+high} CD16⁻ ainsi que les CD14^{+low} CD16⁺ [228]. Les CD14^{+high} (Mono^{high}) sont majoritaires au bout de 3 à 4 jours sur le site ischémié.
- ✓ Les CD14^{+low} (Mono^{low}) sont majoritaires au bout 5 à 7 jours.
- ✓ Les Mono^{high} sécrètent davantage de MMPs alors que les Mono^{low} davantage de VEGF.

Les Mo infiltrent le tissu ischémié dans les premiers jours et s'y différencient en macrophages. Il existe deux populations de macrophages :

- ✓ **Les M1**, plus précoces, exprimant la iNOs et des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 et IL-12)
- ✓ **Les M2**, plus tardifs, sécrétant plutôt la cytokine IL-10 anti-inflammatoire et du VEGF, ces derniers sont impliqués dans le remodelage et la régénération tissulaire [229].

2. Cellules lymphoïdes et la néovascularisation.

Les Ly T auxiliaires (CD3⁺/CD4⁺) et cytotoxiques (CD3⁺/CD8⁺) sont les acteurs clés du processus de revascularisation post-ischémique. En effet, les souris « *Nude* » athymiques, chez lesquelles les Ly T sont inexistantes, le processus de revascularisation est altéré par rapport aux souris de souches sauvages [230]. Leur effet est essentiellement paracrine *via* la sécrétion de VEGF. Ils sécrètent également des cytokines impliquées dans le recrutement des monocytes, l'activation de l'artériogénèse et le recrutement de EPCs [231]. Leur cinétique d'apparition sur le site d'ischémie semble assez précoce mais peu de données de la littérature existent à ce sujet [184]. Les Ly T reg (CD4⁺/CD25⁺) sont impliqués dans la revascularisation post-ischémique dans mesure où ils inhibent les cytokines pro-inflammatoires. Le rôle des Ly B demeure peu compris (**Figure 22**).

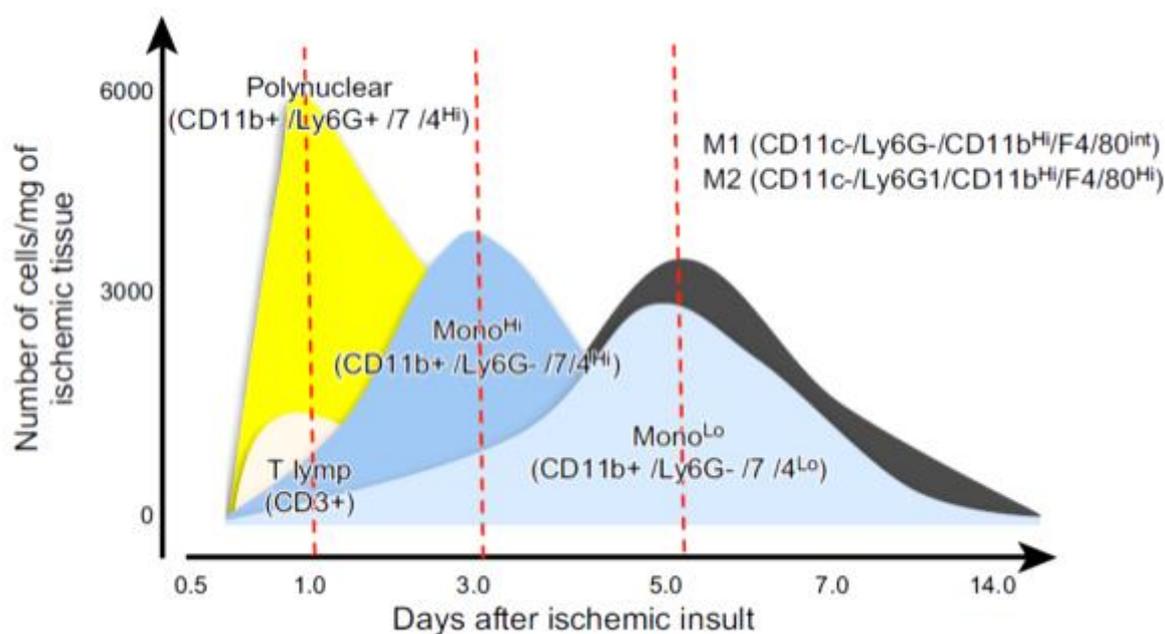


Figure 22 : Réponse inflammatoire post-ischémique [184]

Cinétique de l'infiltration du tissu ischémique par les cellules inflammatoires au cours du temps.

- Les PNN sont les premières cellules à s'infiltrer (au bout de quelques heures après l'ischémie) avec les Ly T.
- Les monocytes (Mono) s'infiltrent, d'abord les Mono^{high} puis ensuite les Mono^{low}. Les Mono se différencient en macrophages de type 1 (M1) et de type 2 (M2) au sein du tissu. Les M1 présentent des propriétés pro-inflammatoires supérieures aux M2. En effet, les M2 sont impliqués dans la phase de régénération tissulaire.

3. Mécanismes de mobilisation de la moelle osseuse vers le sang

Les cellules souches évoquées et décrites précédemment dans le chapitre II sont essentiellement localisées dans la MO au niveau des niches ostéoblastiques et périvasculaires. Elles sont mobilisées sous l'influence de nombreux FCs et cytokines permettant de les libérer de la MO, de les attirer sur le site d'ischémie et d'y permettre leur adhésion. Les différents acteurs orchestrant cette mobilisation et ce recrutement sont détaillés dans les paragraphes suivants (**Figure 23**).

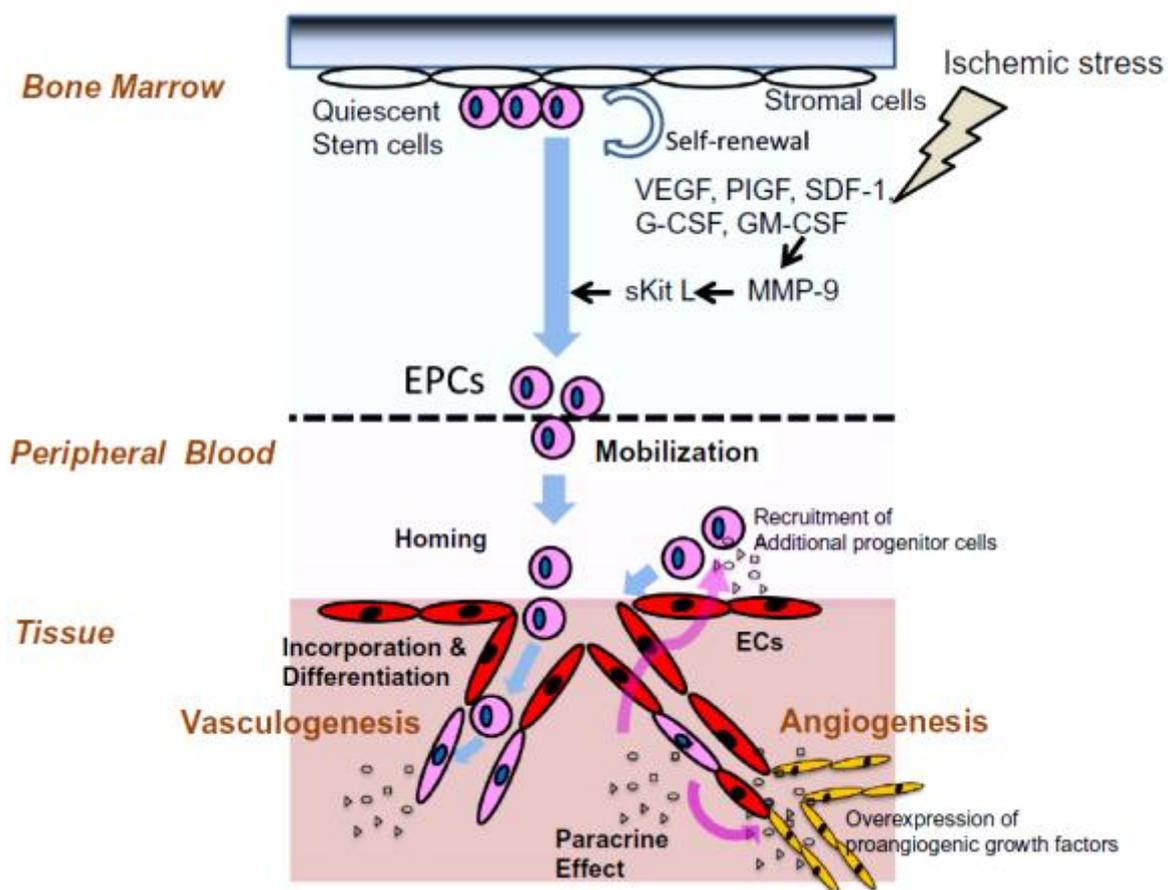


Figure 23 : Mobilisation des EPCs pour la revascularisation [115]

Sous l'influence de FCs, les EPCs circulants sont recrutés à partir de la MO puis attirés sur le site d'ischémie afin de contribuer à la néovascularisation. Leur mécanisme d'action repose sur une activité de différenciation et paracrine. Ils activent la prolifération et la survie cellulaires. Ils permettent de recruter davantage de progéniteurs locaux.

Abréviations : GM-CSF: granulocyte macrophage-colony stimulating factor; IGF-1: insulin like growth factor-1.

a) Inhibition de la rétention au sein de la moelle osseuse

La concentration d'EPCs dans le sang augmente à la suite d'un traumatisme vasculaire. Cela est lié à l'augmentation des concentrations de VEGF-A qui provoquent ainsi la mobilisation des cellules médullaires *via* le couple CXCL12/CXCR4 [232, 233].

- **Axe CXCL12 / CXCR4**

Structure moléculaire

CXCL12, également appelée SDF-1 (*Stromal cell-Derived Factor-1*) est une chimiokine qui a été découverte par l'équipe de Nagasawa en 1994 dans les cellules stromales de la MO où elle y est sécrétée de façon constitutive. CXCL12 se lie et active son récepteur membranaire CXCR4. CXCL12 possède aussi un domaine de liaison aux glycosaminoglycanes (GAG), plus précisément aux héparan-sulfates (HS).

Mode d'action - chimiotactisme

Le chimiotactisme qu'exerce CXCL12 sur les cellules CXCR4+ dépend de son gradient de concentration. Les cellules CXCR4+ migrent vers les zones les plus concentrées en CXCL12. La mobilisation des cellules CXCR4+ depuis la MO vers la circulation sanguine dépend du gradient de concentration de CXCL12 qui existe entre ces deux compartiments.

- ✓ Dans des **conditions physiologiques**, les cellules CXCR4+ sont retenues dans la MO car CXCL12 y est fortement exprimé alors qu'il est presque absent dans le sang.
- ✓ Lors **d'une ischémie**, la dégradation de CXCL12 dans la MO et l'hypoxie stimulent l'expression de CXCL12 dans le tissu ischémique [234]. Ainsi, le gradient de concentration de CXCL12 s'inverse et permet d'attirer les cellules médullaires CXCR4+ depuis la MO vers le sang puis secondairement vers la zone hypoxique. La MMP-9 dégrade le CXCL12 et permet ainsi la libération des cellules CXCR4+ de la niche hématopoïétique [235]. La MMP-9 est activé par le VEGF-A.

- **Axe c-Kit / Kit-L**

L'interaction entre leur récepteur c-Kit (CD117) et le ligand membranaire Kit-L (ou SCF : *Stem cell factor*) présent à la surface des cellules stromales permet de retenir ces cellules progénitrices au sein de la MO. La MMP-9, activée par le VEGF-A, clive Kit-L, libérant ainsi les cellules souches c-Kit⁺ en dehors de leur niche hématopoïétique où elles pourront proliférer puis migrer dans la circulation sanguine [236, 237].

- **Rôle du NO**

Le NO joue également un rôle dans la mobilisation des cellules. En effet, les ECs et certaines cellules stromales médullaires expriment VEGFR-2. L'augmentation de l'expression de VEGF due à l'hypoxie active la eNOs des cellules médullaires *via* le récepteur VEGFR-2, ce qui induit la production locale de NO qui va non seulement activer la MMP-9 mais également la prolifération et la différenciation de cellules souches [238].

b) CSF (Colony-Stimulating Factor)

Les CSF (*Colony-Stimulating Factors*) sont une famille de cytokines contrôlant la mobilisation et la différenciation des HSCs. Il existe plusieurs membres dont le G-CSF (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*) et le GM-CSF (*Granulocyte Monocyte Colony-Stimulating Factor*) qui sont les plus connus.

Le G-CSF permet également de mobiliser les cellules CD34⁺, CD133⁺ et les EPCs en augmentant indirectement la protéolyse du CXCL12. En effet, le G-CSF va stimuler la sécrétion des MMP9 par les PNN présents dans la MO [239]. L'axe CXCL12/CXCR4 régule donc de manière importante la rétention et la mobilisation des cellules CXCR4⁺ à savoir, les Monocytes/Macrophages, les Ly T et B, les plaquettes et les HSCs CD34⁺ (**Figure 24**). En cas de mauvaise mobilisation du patient par des injections sc ou voie IV de G-CSF (Filgrastim ou Lénograstim), un inhibiteur de l'axe CXCL12/CXCR4 (Plerixafor) peut être rajouté.

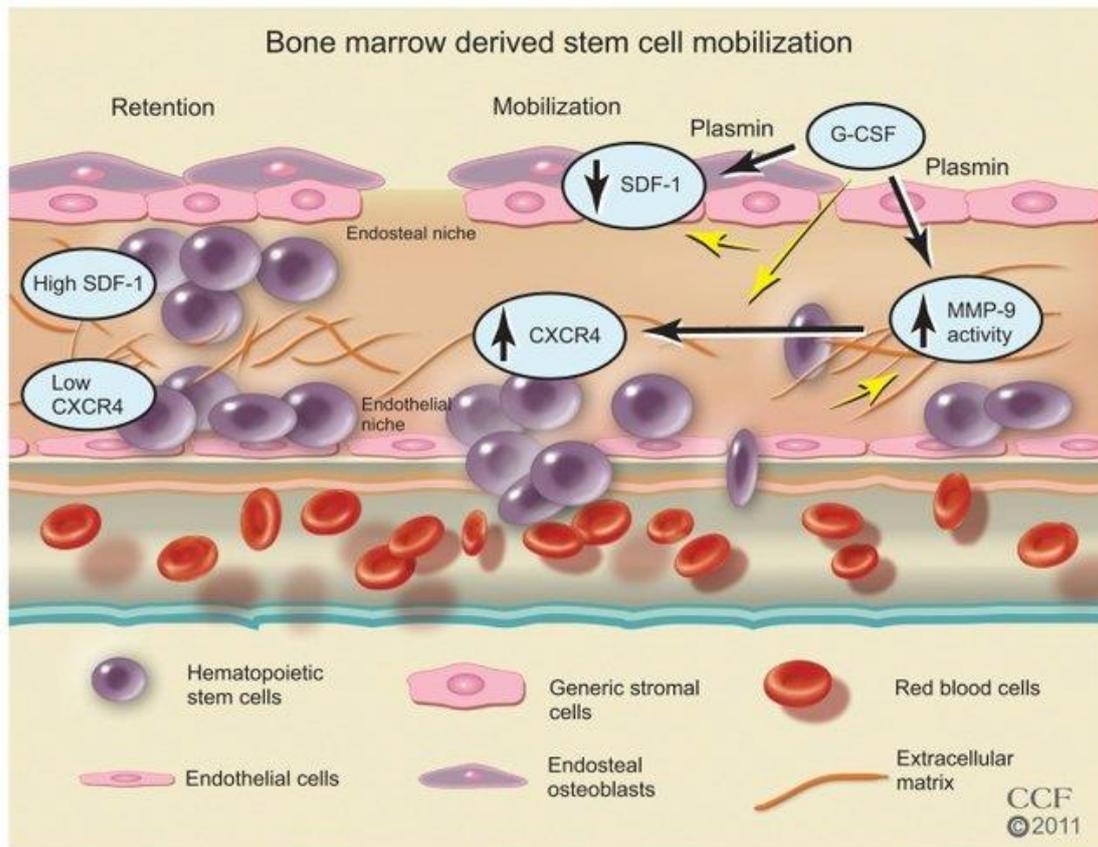


Figure 24 : Mobilisation de cellules souches dérivées de la moelle osseuse [240]

Le G-CSF stimule la sécrétion de la MMP-9 par les PNN médullaires. La MMP-9, en dégradant le CXCL12 (ou SDF-1), va permettre la libération des cellules CXCR4⁺ dans la circulation sanguine.

Abréviations : CXCR4 : récepteur C-X-C 4; G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor; MMP-9 : métalloprotéinase-9; SDF-1 : Stroma-derived factor-1

4. Tropisme des cellules pour la zone ischémisée

Les cellules ainsi mobilisées peuvent parcourir l'ensemble de l'organisme *via* la circulation sanguine. Le recrutement des cellules vers la zone ischémisée se fait essentiellement grâce aux chimiokines, et leur adhésion à l'endothélium grâce aux sélectines et intégrines.

a) CCL2 / CCR2

La CCL2 est une chimiokine fortement impliquée dans le processus de revascularisation post-ischémique. Son action pro-angiogénique s'exerce *via* son récepteur CCR2 présent à la surface des cellules progénitrices [241].

L'interaction CCL2/CCR2 participe donc à la revascularisation post-ischémique en orchestrant en partie le recrutement des cellules nécessaires à ce mécanisme.

b) CX3CL1 / CX3CR1

La CX3CL1, couramment nommée fractalkine (Fkn), est une chimiokine qui possède un domaine riche en mucines qui lui permet d'adhérer aux ECs. Elle exerce un chimiotactisme sur les monocytes/macrophages *via* son récepteur CX3CR1. De plus, les ECs expriment aussi le récepteur CX3CR1 [242].

c) CXCL12 / CXCR4

Lors **d'une ischémie**, le gradient de concentration de CXCL12 s'inverse et permet d'attirer les cellules CXCR4⁺ (MNCs, cellules NK, lymphocytes T, les lymphocytes B, les HSCs ou encore les EPCs) depuis la MO vers la zone hypoxique.

5. Roulement, arrêt et transmigration des cellules dans le tissu ischémique

Les cellules médullaires attirées sur le site de l'ischémie par chimiotactisme roulent sur l'endothélium, y adhèrent puis pénètrent dans le tissu ischémique essentiellement par transmigration endothéliale. Elles vont interagir avec le microenvironnement.

a) Roulement des cellules grâce aux Sélectines

Les sélectines sont une famille des glycoprotéines à un seul domaine transmembranaire regroupant : la L-sélectine (leucocytaire), la E-sélectine (endothéliale) et la P-sélectine (plaquettaire). Les E et P-sélectines sont exprimées à

la surface des ECs et forment de faibles liaisons avec le PSGL-1 (*P-Selectin glycoprotein ligand-1* ou CD162) présent sur les cellules médullaires. Ces faibles interactions permettent aux cellules médullaires de «rouler» le long de l'endothélium et de ralentir leur progression. La E-selectine est également présente à la surface des EPCs [243].

b) Arrêt des cellules grâce aux intégrines

Les intégrines sont des récepteurs cellulaires transmembranaires constituées de deux sous-unités α et β . Elles permettent surtout aux cellules d'adhérer à la MEC à d'autres cellules. En effet, les leucocytes, les lymphocytes et les EPCs les expriment et peuvent donc se lier aux récepteurs présents à la surface des ECs (ICAM-1, VCAM-1). Ces liaisons étant fortes et stables, elles permettent aux cellules médullaires d'adhérer et de s'arrêter à l'endothélium.

c) Transmigration endothéliale

Ayant adhéré aux ECs, les cellules médullaires traversent ensuite l'endothélium selon deux mécanismes :

- ✓ **La transmigration paracellulaire** : les cellules médullaires passent entre deux ECs. Ce mécanisme est appelé « diapedèse ». Les jonctions entre les ECs se « fragilisent » grâce à l'action du NO produit par les ECs qui perméabilise les vaisseaux. Ces jonctions sont dépendantes de nombreuses molécules d'adhésion telles que PECAM-1 (CD31) [244].
- ✓ **La transmigration transcellulaire** : les cellules médullaires traversent au travers d'une cellule endothéliale (mécanisme plus rare)

6. Devenir des cellules dans le tissu ischémique

Les cellules médullaires recrutées au niveau du tissu ischémique orchestrent la revascularisation selon trois grands mécanismes :

- ✓ Elles sont capables **de se différencier en ECs matures** pour s'intégrer au vaisseau néoformé (**action directe**),
- ✓ Elles peuvent **sécréter des facteurs pro-angiogéniques (action indirecte paracrine)**.
- ✓ Elles peuvent **interagir avec les cellules hôtes** présentes sur le site d'ischémie

A l'heure actuelle, le devenir précis de ces cellules est encore quelque peu éluif.

a) Action directe : différenciation et intégration des cellules

De nombreuses études ont mis en évidence la capacité des cellules progénitrices à se différencier en ECs et d'intégrer les vaisseaux néoformés [105].

Dans un modèle murin d'ICMI (HLIM), les EPCs injectées en IV se sont d'intégrées au réseau vasculaire néoformé et exprimaient le marqueur endothélial CD31. La co-administration d'EPCs et de cellules progénitrices musculaires a majoré le marquage CD31 des muscles [245].

De plus, dans un modèle murin d'IDM, l'injection dans la zone infarctée de cellules mononuclées de la MO (BM-MNCs) a permis d'obtenir un taux d'intégration de 30% [246].

De nombreux travaux et publications dans la littérature font la lumière sur la capacité des cellules médullaires à intégrer les néovaisseaux et à se différencier en cellules vasculaires matures. Cependant, leurs critères de différenciation restent encore mal connus et débattus. En effet, il semblerait que les cellules médullaires n'incorporeraient pas les vaisseaux en formation mais qu'elles s'accumuleraient à proximité et autour des vaisseaux collatéraux. Les hypothèses s'orientent vers la capacité de différenciation de certaines cellules des BM-MNCs en fibroblastes ou en péricytes soutenant l'idée qu'elles auraient plutôt un rôle de cellules de soutien [247].

b) Action indirecte : effet paracrine

Physiologiquement, les **cellules souches ou progénitrices** sont des événements rares (estimées à moins de 0,01%). Les MSCs, encore plus rares, peuvent sécréter de nombreuses cytokines et FCs pro-angiogéniques (VEGF, CXCL12, Ang-1, SCF, TGF- β , HGF, FGF, IGF-1, PIGF, GM-CSF, IL-6,). *In vivo*, l'amélioration de la revascularisation observée chez la souris ayant une ligature de l'artère fémorale suite à l'injection de MSCs est corrélée à une augmentation des taux de VEGF et de FGFb dans la patte ischémique, révélant le rôle crucial des facteurs sécrétés par les MSCs [148].

Les BM-MNCs sont constituées majoritairement de **cellules matures** (Granuleux, Ly, Mo, plaquettes) qui ne peuvent pas se différencier en ECs. Par contre, les cellules inflammatoires recrutées sur le site d'ischémie (Ly, Mo) possèdent un effet pro-angiogénique paracrine en sécrétant de nombreux FCs (VEGF, FGF, CCL2 ou le TNF- α) [246]. Les Mo produisaient également de nombreuses cytokines comme le VEGF, NO, CCL2 et FGFb [248].

c) Interaction avec le tissu hôte

La présence des EPCs sur le site ischémié augmente les taux circulants de BM-MNCs et leur incorporation montrant ainsi que les EPCs favorisent le recrutement d'autres cellules progénitrices [249].

Les EPCs libèrent également du NO qui accentue la perméabilité vasculaire et facilite l'extravasation des cellules sanguines. Enfin, la sécrétion de protéases comme les MMPs par les cellules médullaires favorise la migration des cellules endogènes et la formation des vaisseaux (**Figure 25**).

L'activité des cellules médullaires est modulée par le microenvironnement :

- ✓ **Favorable** : l'hypoxie, les forces de cisaillements et de nombreuses cytokines ou interleukines (IL-1b, IL-20)
- ✓ **Néfastes** : le stress oxydant, les ROS, les débris apoptotiques et d'autres interleukines (IL-10, IL-12, IL-18)

Tableau VII représente une liste non exhaustive des facteurs pro- et anti-angiogéniques.

Facteurs pro-angiogéniques	Facteurs anti-angiogéniques
<ul style="list-style-type: none"> ✓ VEGFs (VEGF-A₁₆₅) ✓ FGF-1 (FGFa) et FGF 2 (FGFb) ✓ PDGF-A & PDGF-B ✓ HGF ✓ PIGF ✓ EGF (<i>Epidermal growth factor</i>) ✓ CXCL12 (SDF1) ✓ MMP2/9 ✓ Angiopoïétines 1 et 2 ✓ Angiogenin ✓ SCF (ou KIT ligand) ✓ IGF-1 ✓ NO ✓ TGF-α et TGF-β ✓ TNFα ✓ IL-1b ✓ IL-8 ✓ IL-20 ✓ EPO (Erythropoïétine) ✓ CSFs (G-CSF, ...) ✓ Insuline ✓ Héparine ✓ Adénosine ✓ <i>Plasminogen activator</i> ✓ ... 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Thrombospondin-1 et 2 ✓ Angiostatin ✓ Endostatin ✓ TIMPs (TIMP1, 2 et 3) ✓ IL-4 ✓ IL-10 ✓ IL-12 ✓ IL-18 ✓ IFNα-β-γ ✓ Somatostatin ✓ PF4 (<i>Platelet Factor 4</i>) ✓ Thrombine (FII) ✓ ...

Tableau VII : Facteurs pro- et anti-angiogéniques

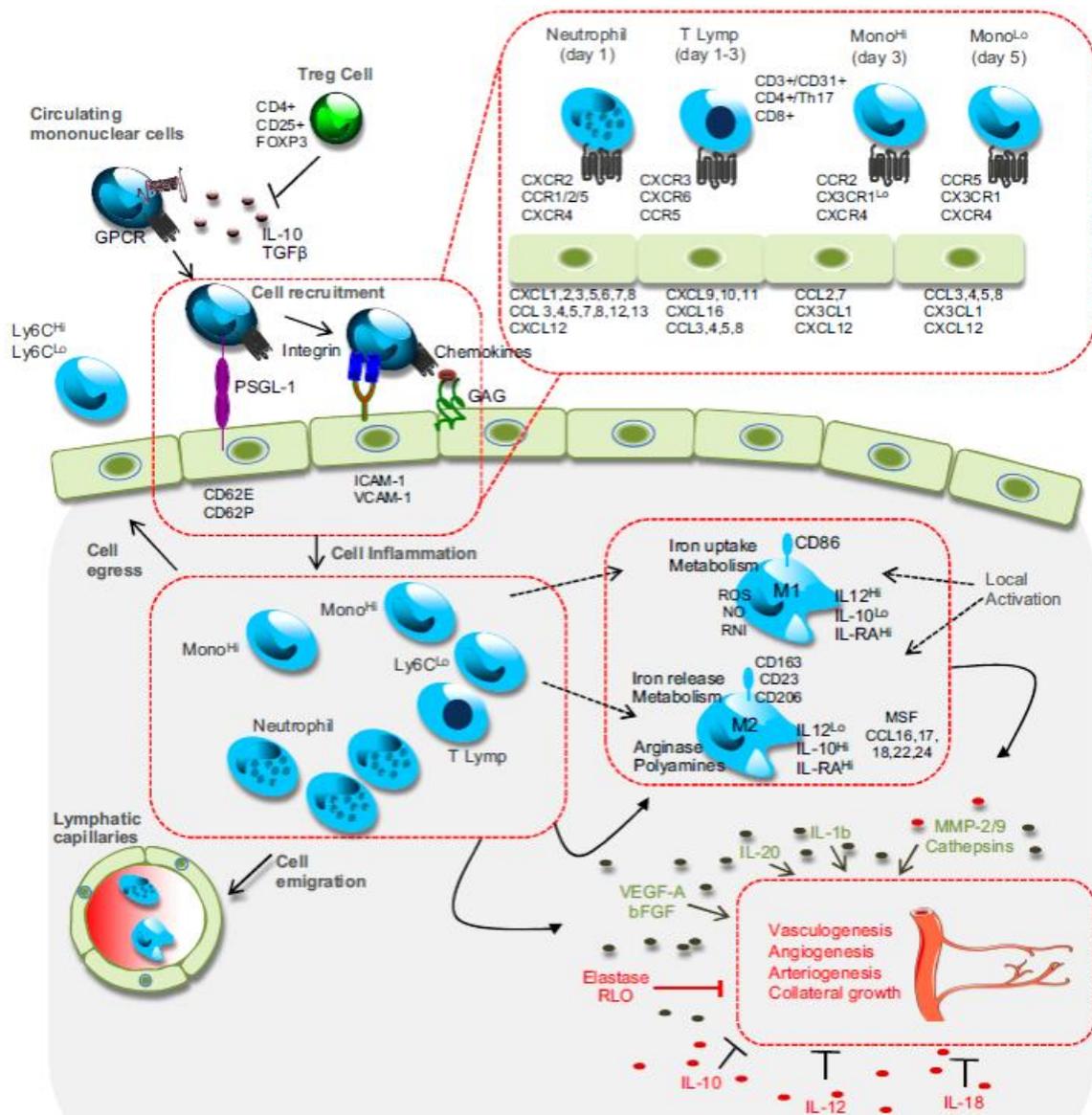


Figure 25 : Recrutement, infiltration et potentiel pro-angiogénique des différentes cellules inflammatoires [184]

Diverses interactions entre les molécules d'adhésion exprimées par les cellules myéloïdes et les lymphocytes (PSGL-1, CD26L, intégrine beta 2) avec les ECs (sélectine CD62E and CD62P, VCAM-1, ICAM-1 and -2). Ces interactions permettent les phénomènes d'attachement, de roulement et de migration trans-endothéliale des MNCs circulantes. La cinétique des cellules inflammatoires est sous le contrôle des chimiokines CC et CX dont les récepteurs sont exprimés à la surface des cellules inflammatoires. Les cellules inflammatoires ainsi infiltrées contrôlent la revascularisation post-ischémique en sécrétant un certain de FCs (VEGF-A, FGFb...), de cytokines avec un rôle pro- (IL-1, IL-20) et anti-angiogénique (IL-10, IL-12, IL-18). Ils sont aussi une source majeure de protéases (MMPs, cathepsine, élastase) qui sont impliqués dans le contrôle et l'émergence du réseau vasculaire.

V. THERAPIE CELLULAIRE DANS L'ISCHEMIE CRITIQUE DES MEMBRES INFERIEURS

A. Contexte

L'ICMI présente des retentissements considérables sur la qualité de vie des patients. Malgré une prise en charge optimale (procédures chirurgicales associées à un traitement pharmacologique), les procédures d'amputation demeurent la seule issue possible pour un grand nombre de patients qui ne sont pas éligibles aux chirurgies de revascularisation. Devant l'impasse thérapeutique de ces patients « *NO-option* », les équipes ont cherché par tous les moyens possibles de favoriser le développement d'un **réseau artériel collatéral** en stimulant l'angiogenèse thérapeutique dans les tissus ischémiés. Initialement, ils se sont inspirés des phénomènes pathologiques, tels que la néovascularisation tumorale pour étudier l'implication du VEGF. Depuis, de nombreux FCs ont été étudiés pour favoriser l'angiogenèse [250].

Aujourd'hui, trois approches thérapeutiques de revascularisation sont proposées aux patients présentant une ICMI à haut risque d'amputation :

- ✓ La thérapie génique
- ✓ La thérapie protéique
- ✓ La thérapie cellulaire (TC)

B. Thérapie par facteur de croissance

En effet, historiquement, les thérapies génique et protéique furent les premières analysées *via* l'administration de FC (sous forme protéique ou à l'aide de plasmides ou d'adénovirus).

1. Thérapie génique

La thérapie génique consiste à injecter par voie IM dans le membre ischémié des plasmides ou des adénovirus contenant les gènes codant pour des **facteurs pro-angiogéniques** tels que le VEGF, le HGF ou le FGF.

Bien que les résultats précliniques aient été encourageants, les essais cliniques sur les patients « *NO-option* » sont restés décevants. En effet, en 2003, l'étude RAVE a étudié l'administration en IM d'adénovirus contenant du VEGF et n'a montré aucune amélioration du périmètre de marche par rapport à l'administration d'un placebo [251]. L'étude TALISMAN 201 [252], le plus grand essai clinique de phase II, a étudié une quadruple administration IM de plasmides contenant du FGF. Ce traitement n'a pas montré d'amélioration du périmètre de marche, ni de la cicatrisation des ulcères mais il a permis une diminution significative du taux d'amputation à un an et une augmentation de la survie. Ces résultats très encourageants ont conduit au lancement de l'essai clinique de phase III TAMARIS [253]. Malheureusement, l'essai TAMARIS n'a pas confirmé l'effet bénéfique de la thérapie génique observée en phase II, et il a été abandonné. L'efficacité de la thérapie génique dans l'AOMI reste controversée.

2. Thérapie protéique

La thérapie protéique consiste à injecter par voie IV, intra-artérielle (IA) ou IM au niveau de la zone ischémisée des facteurs pro-angiogéniques (VEGF, HGF, FGF) sous la forme de protéines recombinantes. Les essais cliniques ont été décevants et cette stratégie a été abandonnée pour des raisons majeures :

- i. une concentration insuffisante de FC au niveau de la zone ischémisée malgré des injections à des doses supra physiologiques (10 à 100 µg/kg),
- ii. leur demi-vie très courte, nécessitant des administrations répétées,
- iii. un coût élevé,
- iv. un effet angiogénique transitoire avec un développement vasculaire incomplet ou anormal,
- v. le risque de développer une angiogenèse inappropriée au niveau de tumeur maligne et d'aggraver une rétinopathie diabétique préexistante.

C. Thérapie cellulaire

Le rationnel de la TC repose sur l'administration, chez les patients atteints d'ICMI sévère, de populations cellulaires capables d'activer des mécanismes pro-angiogéniques pouvant entraîner la formation de néovaisseaux et améliorer la

perfusion du membre ischémié. Ces effets ne sont pas nécessairement dus à l'incorporation des cellules dans le réseau vasculaire (« effet direct »), mais peuvent impliquer des mécanismes paracrines médiés par la sécrétion de médiateurs pro-angiogéniques (« effet indirect »). La TC pourrait également activer des voies cytoprotectrices et régénératives encore non identifiées pouvant améliorer la fonction des membres par des effets indépendants de la formation de néovaisseaux.

Les premières études « preuve de concept » de l'efficacité de la TC à visée angiogénique ont été menées chez l'animal dans le modèle HLIM. Des BM-MNCs [254], des PB-MNCs [255], des EPCs [256]; et des MSCs [257] ont été injectées en IM dans le membre ischémié de l'animal.

Considérant les options limitées de traitement pour les patients souffrant d'ICMI, des études ont suggéré que la TC pourrait être une nouvelle approche thérapeutique prometteuse et présentant des effets secondaires limités [258].

En clinique, le choix des cellules exploitées ou en projet d'exploitation peut présenter une origine autologue ou allogénique. Les cellules peuvent également être soit cultivées *in vitro* afin d'en augmenter la quantité, soit isolées par fractionnement cellulaire (**Figure 26** et **Figure 28**).

- **Greffe autologue :**

- Les cellules issues de la MO :

- Les **BM-MNCs** (compte tenu du contaminant granuleux présent au sein de ces cellules, certaines publications peuvent les appeler **BMCs** pour « *Bone marrow derived cells* » ou **BM-CTPs** pour « *Bone marrow cell therapy products* » ; cf. § V.C.1.b et **Tableau VIII**)
- Les **EPCs** : elles peuvent être issues des BM-MNCs après purification. Elles n'ont jamais été utilisées telles quelles en clinique mais il est possible d'en augmenter la concentration par fractionnement. En effet, des cellules CD34⁺ ou CD133⁺ ou à activité ALDH (*aldehyde deshydrogenase*) peuvent être isolées par

fractionnement cellulaire à l'aide d'anticorps spécifiques (tri cellulaire par CMF, bille magnétique).

- Les **MSCs** : elles sont amplifiées *in vitro* par culture à partir des BM-MNCs grâce à leurs propriétés d'adhésion au plastique et à leur haut potentiel de prolifération.
- Les cellules issues du sang périphérique
 - Les **PB-MNCs** (ou **PBCs** pour « *Peripheral blood derived cells* » ou **PB-CTPs** pour « *Peripheral blood cell therapy products* » ; cf. § V.C.1.b et **Tableau VIII**) : elles sont issues du sang périphérique et obtenues par cytophérèse mobilisée ou non mobilisée par du G-CSF.
 - Les **EPCs** : elles peuvent être issues des PB-MNCs mobilisées après fractionnement cellulaire (CD34⁺, CD133⁺)
- Les cellules issues du tissu adipeux :
 - **ADSCs** : elles sont amplifiées *in vitro* par culture à partir du tissu adipeux (TA)
- **Greffe allogénique** :
 - Les cellules issues du cordon ombilical : Le sang de cordon et la gelée de Wharton peuvent être source de MSCs (**UCB-MSCs** pour *Umbilical cord blood MSCs* et **WJ-MSCs** pour *Wharton Jelly MSCs*) et représentent une piste potentielle prometteuse pour la greffe de MSCs allogénique.

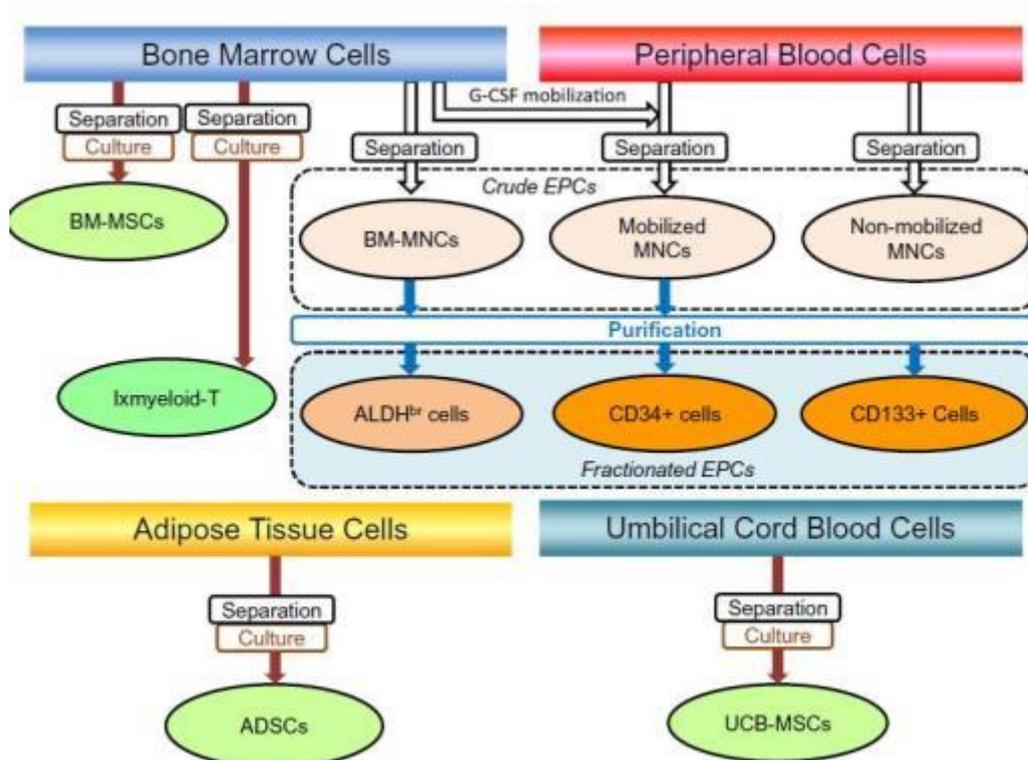


Figure 26 : Différentes sources de cellules utilisées en thérapie cellulaire [115]

L'administration locale par voie IM des cellules est préférentiellement utilisée dans les essais cliniques (30 à 60 injections IM de 1 mL). Les injections sont soit limitées au *Gastrocnemius* [259], soit étendues tous les muscles de la jambe [260] (**Figure 27**).

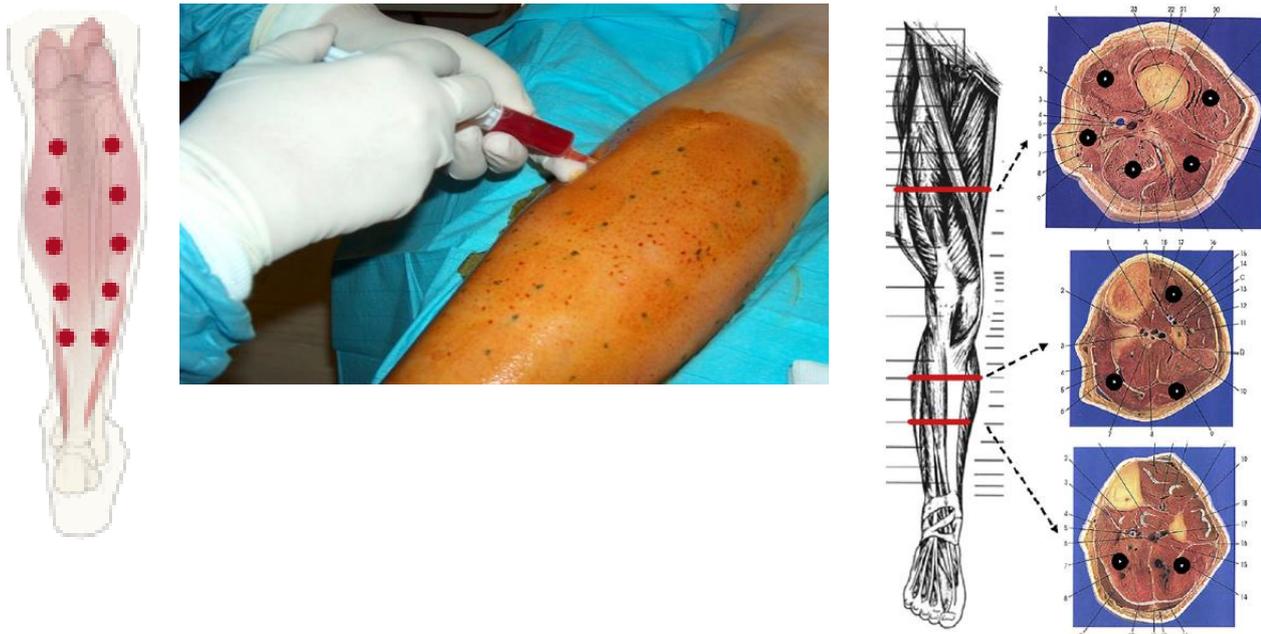


Figure 27 : Protocoles d'administration IM des cellules

Le suivi des patients est majoritairement de 6 mois à 1 an. Les suivis à long terme (3 à 5 ans) restent limités [261-263].

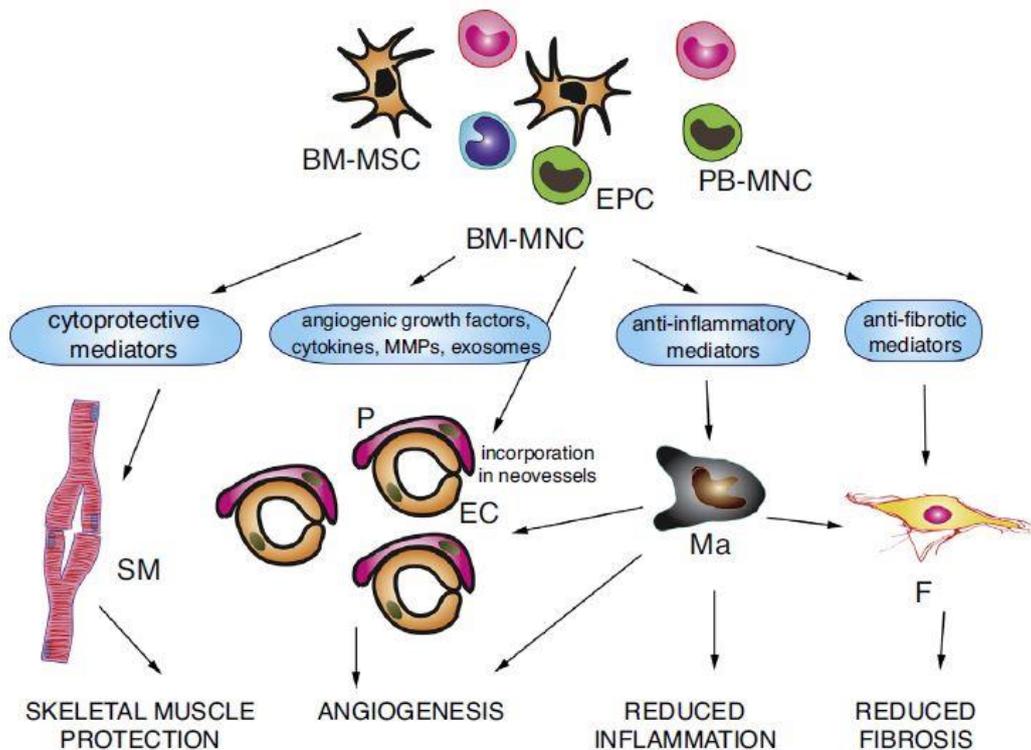


Figure 28 : Différentes sources de cellules utilisées en thérapie cellulaire et leur potentiel [264]

Dans la plupart des essais cliniques, les critères **principaux** de jugement sont :

- ✓ Taux d'amputation majeure du membre (au-dessus de la cheville) à 6 mois
- ✓ Taux de survie à 6 mois

Les critères **secondaires** de jugement sont :

- ✓ Taux d'amputation mineure du membre
- ✓ Taux de revascularisation
- ✓ Cicatrisation complète ou non de troubles trophiques (Ulcères)
- ✓ Suivi des paramètres hémodynamiques : TcPO₂, IPS
- ✓ Variations de la douleur et de la consommation d'antalgiques
- ✓ Variations du périmètre de marche
- ✓ Qualité de vie

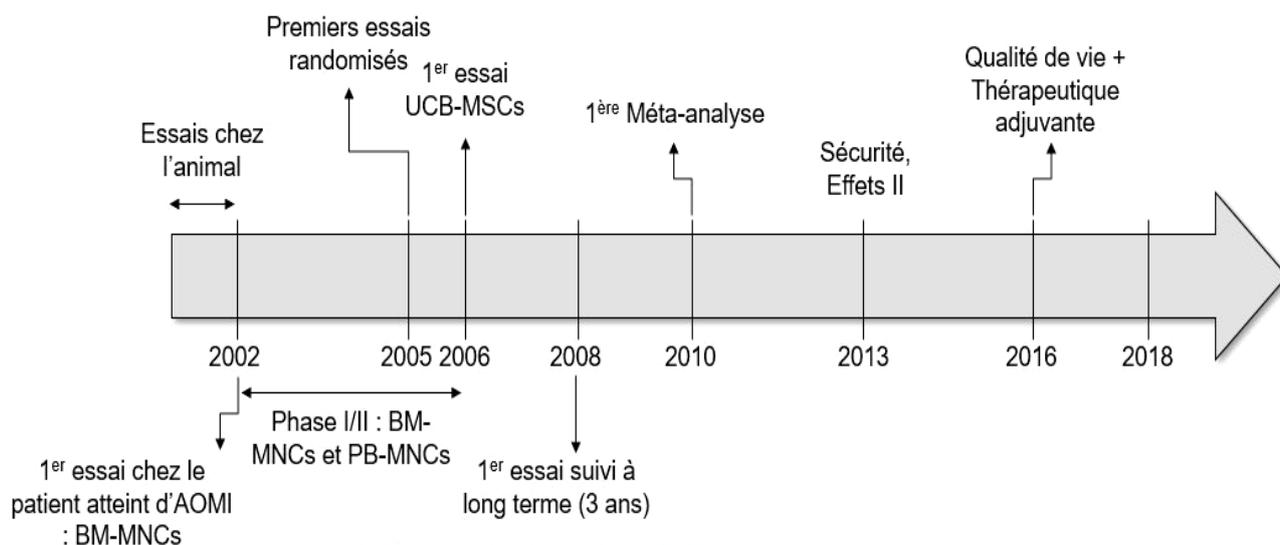
La cinétique des cytokines circulantes est régulièrement établie durant le premier mois post-injection [265-268].

1. Cellules mononucléées issues de la moelle osseuse (BM-MNCs) ou du sang périphérique (PB-MNCs)

a) *Etude pilote chez l'homme*

L'essai clinique TACT (*Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation*), publié en 2002 [269], fut l'étude pilote proposant une injection IM dans le mollet ischémié de BM-MNCs autologues aux patients présentant une ICMI à haut risque d'amputation.

L'essai TACT a inclus 25 patients présentant une ICMI unilatérale avec la présence de gangrène ou d'ulcère pour 14 d'entre eux. Il leur a été administré 10⁹ BM-MNCs autologues en quarante injections réparties dans le muscle *Gastrocnemius*. L'étude TACT a montré des résultats très favorables. Quatre semaines après l'injection, la douleur au repos, le périmètre de marche et l'IPS ont été améliorés ; huit semaines après, l'étendue des ulcères était considérablement diminuée et vingt-quatre semaines après la transplantation, les angiographies faites sur les jambes ischémiques révélaient un développement net des collatérales [269].



Une centaine d'essais cliniques depuis 2002

≅ 3200 patients traités (≅ 45 patients/essai)

Autologue +++

Origine cellulaire :

- Moelle osseuse : BM-MNCs ou concentrés médullaires (n=52 dont 9 randomisés)
- Cytaphérèse (n=16 mobilisées par du G-CSF + 6 non mobilisées) (4 randomisés)
- Cellules fractionnées CD34+ ou CD133+ ou ALDH^{br} (n=11 dont 4 randomisés)
- Cellules souches mésenchymateuses MSCs (n=8 dont 4 randomisés)

Figure 29 : Thérapie cellulaire dans l'AOMI

Depuis 2002, une centaine d'essais cliniques de TC dans l'ICMI ont été recensés dans le monde incluant environ 3200 patients traités (soit environ 45 patients par essai) (Figure 29).

b) Essais de Phase I/II

Les cellules mononucléées de la MO (BM-MNCs) ou du sang périphérique (PB-MNCs) représentent un mélange de populations cellulaires hétérogènes constituées de cellules matures et immatures (cellules souches et progénitrices).

• BM-MNCs :

Un volume d'environ 500 mL de MO est prélevé au niveau des deux crêtes iliaques postérieures des patients ICMI sous anesthésie générale au bloc opératoire. Le prélèvement médullaire est filtré, concentré (réduction de volume de 500 à 40 mL) et

trié afin d'exclure les granuleux et les érythrocytes. Les MNCs sont ensuite isolées grâce à un séparateur cellulaire (Cobe Spectra® CS3000-Plus Baxter®, ..) ou par centrifugation sur un gradient de Ficoll [270]. Dans 2 essais, le prélèvement médullaire a été simplement concentré sans séparation ou tri cellulaire [271, 272].

Contrairement à la TC dans le traitement des hémopathies malignes, la quantité cellulaire injectée n'est pas uniformisée et standardisée par kg de poids corporel du patient receveur. De plus, la composition cellulaire précise des produits de thérapie cellulaire (PTC) n'est que rarement indiquée. Les PTC sont quantitativement et qualitativement très hétérogènes (**Tableau VIII**). Les PTC d'origine médullaire sont constitués de cellules sanguines **matures** comme les Ly (50%), Mo (17%) et plaquettes (712 G/L) et de cellules souches **immatures** très rares comme des HSCs CD34⁺ (2,25%), des EPCs (0,015%) et des **MSCs** (34 MSCs par million de cellules nucléées) . L'hématocrite résiduel est de l'ordre de 5%.

Ce terme « BM-MNCs » utilisé dans tous les articles de TC est impropre car les granulocytes résiduels représentent en moyenne 17% des PTC (**Tableau VIII**).

	Quantité de MNCs injectées (x10 ⁹)	Quantité de cellules CD34 ⁺ injectées (x10 ⁷)	% de granuleux
BM-MNCs	1,8 [0,1 – 8,4] (n= 27 essais)	3,5 [1,0 – 8,1] (n= 19 essais)	17% [9,1 – 62,5] (n= 6 essais)
PB-MNCs mobilisées	13,7 [2,0 – 25,6] (n= 10 essais)	3,6 [0,9 – 23] (n= 9 essais)	24 à 31% (n= 2 essais)
PB-MNCs non mobilisées	6,4 [0,13 – 12,5] (n= 6 essais)	0,30 à 0,49 (n= 2 essais)	6% [1 – 20] (n= 1 essai)

Tableau VIII : Quantité cellulaire injectée et pourcentage de granuleux contaminant

Suite à la publication de l'essai TACT, de nombreux essais cliniques de Phase I/II ont permis de confirmer la faisabilité et la bonne tolérance de l'injection autologue de BM-MNCs dans le traitement de l'ICMI.

- **PB-MNCs :**

De nombreux patients « *NO-option* » étaient exclus des protocoles de prélèvement de cellules médullaires car leur état clinique contre-indiquait l'anesthésie générale et l'arrêt de toute anticoagulation.

- ✓ *PB-MNCs mobilisés par le G-CSF :*

Huang PP *et al.*, ont publié en 2005 l'étude pilote proposant une injection IM dans le mollet ischémié de MNCs autologues issues de cytophérèses mobilisées aux patients présentant une ICMI à haut risque d'amputation [273]. La mobilisation médullaire s'effectue par des injections sc de G-CSF (entre 5 et 10 µg/kg/jour) durant les 3 à 6 jours précédents la cytophérèse. Cette mobilisation a permis de multiplier d'un facteur 10 la quantité de cellules CD34⁺ circulantes (avant mobilisation : 0,013 ± 0,005% *versus* après mobilisation : 0,13 ± 0,026%) [273].

Les PB-MNCs sont collectés par cytophérèse d'une masse sanguine de 5 L environ pendant 90 min. Deux cytophérèses à un jour d'intervalle sont parfois nécessaires afin d'obtenir la quantité cellulaire souhaitée. La quantité cellulaire injectée n'est pas uniformisée et standardisée par kg de poids corporel du patient receveur. Les PTC d'origine périphérique sont quantitativement et qualitativement très hétérogènes (**Tableau VIII**).

Les 16 essais cliniques injectant des PB-MNCs mobilisés ont montré une amélioration de l'IPS, de la TcPO₂ et de la cicatrisation des ulcères [273, 274].

Certains essais cliniques avaient pour objectif de comparer les 2 types cellulaires : BM-MNCs *versus* PB-MNCs mobilisés [250, 265, 275, 276]. Aucune différence statistique entre les 2 groupes n'a été observée dans les critères principaux (taux d'amputation et de survie). Huang PP *et al.*, ont constaté une supériorité de la cohorte PB-MNCs mobilisés sur l'amélioration des paramètres hémodynamiques et la douleur [275]. Aucun de ces essais n'est randomisé.

- ✓ *PB-MNCs non mobilisés :*

L'administration de G-SCF peut-être contre-indiquée chez ces patients atteints d'AOMI car le G-CSF peut provoquer des effets secondaires majeurs (thrombose artérielle, angor, dysfonction ventriculaire) [277-279].

Les PTC non mobilisés d'origine périphérique sont constitués de cellules sanguines **matures** comme les lymphocytes (61%), monocytes (33%) et plaquettes (1541 G/L) et de cellules souches **immatures** très rares comme des HSCs CD34⁺ (0,09%), des EPCs (0,0008%) et des **MSCs** (9 MSCs par million de cellules nucléées) [280, 281]. L'hématocrite résiduel est de l'ordre de 9% (**Tableau VIII**).

Tateno K *et al.*, ont reporté les résultats d'une étude clinique pilote ayant étudié chez 29 patients atteints d'ICMI l'injection IM de PB-MNCs sans mobilisation (2 injections à 1 mois d'intervalle). La douleur au repos fut améliorée jusqu'à deux mois post-traitement et le périmètre de marche augmenté jusqu'au 6^{ème} mois après la transplantation. Ces améliorations furent conservées jusqu'à un an [265]. Six autres essais cliniques comparables ont été publiés.

En conclusion, ces essais cliniques de Phase I/II ont confirmé la faisabilité, l'innocuité de l'injection de MNCs autologues d'origine médullaire ou périphérique chez des patients présentant une ICMI unilatérale après échec des traitements conventionnels [282]. Ils sont bien tolérés, peuvent réduire la douleur au repos et améliorer la guérison de l'ulcère [273, 283].

c) Modifications apportées au protocole initial de l'essai TACT

Quelques essais cliniques ont modifié le protocole initial de l'essai TACT :

- **Injection intra-artérielle (IA)** [284-287].

Ainsi, il a été suggéré qu'une injection IA des cellules permettrait de mieux les acheminer aux zones ischémiques tout en leur offrant suffisamment d'oxygène pour prolonger leur effet bénéfique pro-angiogénique. L'essai PROVASA publié en 2011 (*Intraarterial Progenitor Cell Transplantation of Bone Marrow Mononuclear Cells for Induction of Neovascularization in Patients With Peripheral Arterial Occlusive Disease*) a été le premier essai contrôlé randomisé contre placebo ayant étudié injection IA de BM-MNCs chez 40 patients ICMI *versus* placebo [284]. Klepanec A *et al.*, n'ont pas trouvé de différence significative entre les 2 voies d'administration IM *versus* IA de BM-MNCs chez 41 patients ICMI [285].

- **Injection itérative de cellules :**

L'administration locale unique par voie IM des cellules est préférentiellement utilisée dans les essais cliniques (30 à 60 injections IM de 1 mL) (**Figure 27**).

Les études précliniques de suivi cellulaire *in situ* ont systématiquement démontré une greffe transitoire des cellules après l'injection IM, avec une faible survie des MNCs et une faible rétention dans le tissu ischémique avec peu d'intégration dans la vascularisation de l'hôte [288-290].

Quelques essais ont proposé les injections itératives de MNCs avec différents protocoles d'administration :

- ✓ 2 injections IM à 1 mois [265] ou 3 mois d'intervalle [284]
- ✓ 3 injections IA espacées de 3 semaines [287]
- ✓ 3 injections IM espacées de 2 mois [291]
- ✓ 2 et 5 injections IM espacées de 40 jours [275] [292]

- **Thérapeutique adjuvante :**

Le traitement conventionnel de réduction des facteurs de risque cardiovasculaire (statines, antiagrégants plaquettaires, IEC) est maintenu pendant toute la durée de suivi des patients inclus dans les essais de TC. L'arrêt du tabac est préconisé. A cette médication peut se rajouter des thérapeutiques adjuvantes :

- ✓ Administration de cellules médullaires associée à des antioxydants/L-Arginine majorant le NO *via* la eNOs [293]
- ✓ Administration de PB-MNCs mobilisés associée à des injections IV de Prostaglandine E1 [273]
- ✓ Administration de PB-MNCs mobilisés non pas avec du G-CSF mais avec 2 injections sc consécutives d'érythropoïétine 2 semaines et 1 semaine avant la cytophérèse [273]

D'autres molécules pourraient être associées à la TC [294]:

- ✓ Vasodilatateurs : Cilostazol (inhibiteur de Phosphodiesterase de type 3), Pentoxifylline (dérivé de la Xanthine), Naftidrofuryl (antagoniste 5-HT_{2R}), Beraprost (analogue de la Prostacyclin)
- ✓ Anticoagulants oraux directs anti-Xa (Rivaroxaban, Apixaban, Edoxaban) et anti-IIa (Dabigatran)

- ✓ Nouvelle génération d'antiagrégants plaquettaires : anti-P2Y12 (Ticagrélor, Prasugrel) et Vorapaxar en association avec l'acide acétylsalicylique.

- **Optimisation de la technique de séparation cellulaire**

Hernández P *et al.*, ont comparé 2 techniques de séparation cellulaire (séparateur de cellules *versus* gradient de densité sur Ficoll) pouvant modifier la composition cellulaire des BM-MNCs recueillis et secondairement leur efficacité clinique à la 24^{ème} semaine post-injection. Aucune différence significative n'a été observée entre ces 2 méthodes [270].

- **Suivi à long terme**

Dans la plupart des essais cliniques, les critères principaux de jugement sont le taux d'amputation majeure du membre (au-dessus de la cheville) et le taux de survie à 6 mois. Les cellules implantées *in situ* dans la zone ischémisée sont rapidement détruites et ce délai de suivi clinique s'est avéré rapidement trop court. L'étude de suivi de Matoba S *et al.*, publiée en 2008 a montré une amélioration de la douleur au repos, du périmètre de marche, et de la cicatrisation de l'ulcère trois ans après la transplantation de BM-MNCs [261]. D'autres essais ont rallongé leur suivi clinique à 4 ans [295], 5 ans [262, 292] puis à 8 ans [263].

Ces essais ont permis d'établir ou de confirmer des facteurs pronostic d'évolution défavorable :

- ✓ Diabète [275, 292]
- ✓ Dialyse [262]
- ✓ Pathologie cardiaque ischémique [295]
- ✓ Syndrome inflammatoire (CRP et le Fibrinogène) [292, 296]
- ✓ Lymphopénie et thrombopénie [250]
- ✓ Granuleux contaminant le PTC [281]

Suite à l'essai randomisé JUVENTAS (BM-MNCs *versus* placebo), la qualité de vie des patients a été évaluée pendant 3 ans. Aucune amélioration de la qualité de vie n'a été observée dans la cohorte BM-MNCs [297].

d) Essais randomisés

Considérant la variabilité des approches utilisées par les différents groupes, le large éventail de types de cellules utilisées, l'hétérogénéité quantitative et qualitative des PTC, l'absence de protocoles standardisés (méthode de séparation des cellules, dose, voie d'administration, nombre d'injections et leur fréquence, modalité et durée de suivi) et la faible cohorte de patients (\cong 45 patients par essai) hétérogènes sur le plan clinique, il existe une incertitude importante quant à l'efficacité de la TC dans l'ICMI. Malgré quelques résultats contradictoires, les essais de Phase I/II concluent à une forte présomption d'efficacité de la TC.

Afin d'établir formellement cette efficacité de la TC dans l'ICMI, des essais cliniques randomisés (TC *versus* traitement médical conventionnel) et randomisés en double aveugle contre placebo de phase III doivent être mis en place avec un *design* rigoureux de l'étude et l'inclusion d'une large cohorte de patients. De plus, les mécanismes physiopathologiques de revascularisation restent obscurs. La survie des cellules injectées dans cet environnement hostile du membre ischémique n'a pas été documentée. Ainsi, il n'est pas clair si un avantage lié à la TC est due à la participation directe des cellules dans l'angiogenèse et/ou le reflet une stimulation indirecte paracrine modulant les balances (pro- et anti-) angiogénique et inflammatoire.

	Design de l'étude	AOMI (stade et étiologie)	Cellules et nombre de patients traités (n)	Contrôles (n)	Voie d'adm	Durée de suivi	Résultats cliniques
Arai M <i>et al.</i> , 2006	Randomisée sans placebo	Fontaine III-IV ?	BM-MNCs 13	12 (thérapie conventionnelle)	IM	1 mois	• IPS ↗, TcPO ₂ ↗
Barc P <i>et al.</i> , 2006	Randomisée sans placebo	Fontaine III-IV ASO	BM-MNCs 14	15 (thérapie conventionnelle)	IM (n=10) ou IM+IA (n=4)	6 mois	• Taux d'amputation ↘ • Guérison d'ulcère ↗
Prochazka V <i>et al.</i> , 2010	Randomisée sans placebo	Fontaine IV ASO	Concentrés médullaires 42	54 (placebo)	IA	4 mois	• Sauvetage du membre ↗
Benoit E <i>et al.</i> , 2011	Randomisée double aveugle contre placebo	Rutherford 4-5 ASO	Concentrés médullaires 34	14 (placebo)	IM	6 mois	• Taux d'amputation ↘
Lu D <i>et al.</i> , 2011	Randomisée double aveugle contre placebo	Fontaine II-IV ASO	BM-MNCs 21 jambes	41 jambes (placebo)	M	6 mois	• IPS ↗, TcPO ₂ ↗ • Douleur à la marche ↘, Périmètre de marche ↗, • Score angiographique ↗ • Guérison d'ulcère ↗ • Taux d'amputation →
Walter DH <i>et al.</i> , 2011 (essai PROVASA)	Randomisée double aveugle contre placebo	Rutherford 4-6 ASO (n=32) TAO (n=8)	BM-MNCs 19	21 (placebo)	IA	6 mois	• IPS → • Guérison d'ulcère ↗, Douleur ↘, • Sauvetage du membre → • Taux d'amputation →
LI M <i>et al.</i> , 2013	Randomisée	Fontaine III-IV ASO	BM-MNCs 29	29 (placebo)	IM	6 mois	• IPS ↗ • Douleur ↘ • Guérison d'ulcère ↗
Terra M <i>et al.</i> , 2015 (essai JUVENTAS)	Randomisée double aveugle contre placebo	Rutherford 3-6 ASO	BM-MNCs (Lymphoprep) 81	70 (placebo)	IA (3 fois à 3 semaines d'intervalle)	6 mois	• IPS →, TcPO ₂ → • Taux d'amputation maj → • Douleur →
Pignon B <i>et al.</i> , 2017	Randomisée double aveugle contre placebo	Rutherford 4-5 ASO	BM-MNCs 18	20	IM	6 et 12 mois	• Douleur, Ulcers, TcPO ₂ , IPS → • Taux d'amputation ↘ (Jackknife analysis)

TAO : Thrombangiitis obliterans

ASO : Arteriosclerosis obliterans

Tableau IX : Essais randomisés de TC dans l'AOMI avec injection de cellules issues de la MO

A l'heure actuelle, environ une dizaine d'essais cliniques de phase III sont enregistrés dans la base de données internationale des essais cliniques : www.clinicaltrials.gov

- **BM-MNCs**

Les essais randomisés injectant des cellules issues de la MO sont référencés dans le (**Tableau IX**) [101, 115].

L'essai PROVASA a ainsi montré une guérison de l'ulcère dose-dépendante et une douleur au repos améliorée par rapport au placebo. Malheureusement, le taux d'amputation ne différait pas entre les groupes. De plus, les patients ayant un score Rutherford à 6 avec des gangrènes extensives ont dû subir une amputation majeure dans les 3 premiers mois [90].

De même, l'essai JUVENTAS (*Rejuvenating Endothelial Progenitor Cells via Transcutaneous Intra-arterial Supplementation*), a également conclu que l'injection IA de MNCs autologues n'a pas réduit le taux d'amputation à 6 mois post traitement. Cet essai a mis en place des injections répétées (3 injections espacées de 3 semaines *versus* placebo). Le critère de jugement principal était le taux d'amputation majeure [287].

L'essai BALI (*Bone marrow autograft in critical limb ischemia*), piloté par le CHU de Reims, est un essai multicentrique de phase III randomisé en double aveugle contre placebo. L'essai BALI a inclus 38 patients « NO-option » à travers la France (9 CHU français impliqués) de juin 2009 à août 2012 [259]. Les BM-MNCs ont été injectées dans le mollet ischémié des patients en 30 points d'injection IM d'1 mL. En utilisation un test statistique classique de régression multiple, les résultats de BALI ne sont pas parvenus à démontrer l'efficacité de la TC quant à la diminution significative du taux d'amputation majeure à 6 et 12 mois (**Tableau IX**).

Table 2. Major Amputation Rate and Secondary Outcomes at 6 and 12 Months in the BALI Study						
	Placebo (n=19)	BM-MNC (n=17)	Logistic regression test			
			Classical		Jackknife method	
			OR [95% CI]	P value	OR [95% CI]	P value
6-month status						
Major amputation*	5 (26)	3 (18)	0.55 [0.11–2.86]	0.48	0.55 [0.52–0.58]	<0.0001
Major/minor amputation or revascularization*	11 (58)	5 (29)	0.30 [0.08–1.21]	0.09	0.30 [0.29–0.31]	<0.0001
Major amputation or revascularization*	8 (42)	5 (29)	0.57 [0.14–2.29]	0.43	0.57 [0.55–0.59]	<0.0001
12-month status						
Major amputation*	5 (26)	3 (18)	0.60 [0.11–3.15]	0.55	0.59 [0.57–0.63]	<0.0001
Major/minor amputation or revascularization*	11(58)	7 (41)	0.51 [0.135–1.92]	0.32	0.51 [0.49–0.53]	<0.0001
Major amputation or revascularization*	8 (42)	6 (35)	0.75 [0.19–2.89]	0.68	0.75 [0.72–0.78]	0.001

*n (%). CI, confidence interval; OR, odds ratio. Other abbreviations as in Table 1.

Tableau X : Résultats de l'essai randomisé BALI

Des essais cliniques de groupes indépendants ont démontré collectivement la sécurité et la bioactivité des BM-MNCs en montrant toujours une amélioration de l'IPS, du périmètre de marche, de la cicatrisation des ulcères et du score de Rutherford par rapport au placebo [272, 298].

- **PB-MNCs**

Les essais randomisés injectant des cellules issues du sang périphérique sont référencés dans le

Tableau XI [101, 115].

Dans de nombreux essais randomisés, l'amélioration des résultats cliniques était associée à des preuves objectives de perfusion améliorée. Cependant, dans quelques essais, les effets de la TC sur les taux d'amputation n'ont pas démontré d'efficacité significativement supérieure. D'autres essais randomisés, avec une cohorte plus importante de patients, n'ont pas réussi à confirmer les effets bénéfiques suggérés par des études de Phase I/II [275].

	Design de l'étude	AOMI (stade et étiologie)	Cellules et nombre de patients traités (n)	Contrôles (n)	Voie d'adm	Durée de suivi	Résultats cliniques
Huang PP <i>et al.</i> , 2005	Randomisée sans placebo	Fontaine III-IV ASO	PB-MNCs mobilisée par G-CSF 14	14 (thérapie conventionnelle)	IM	3 mois	<ul style="list-style-type: none"> • IPS \uparrow, Laser Doppler blood perfusion \uparrow • Guérison d'ulcère \uparrow • Score angiographique \uparrow
Ozturk A <i>et al.</i> , 2012	Randomisée sans placebo	Fontaine III-IV ?	PB-MNCs mobilisée par G-CSF 20	20	IM	3 mois	<ul style="list-style-type: none"> • IPS \uparrow, TcPO₂ \uparrow • Périmètre de marche \uparrow • Douleur \downarrow • Guérison d'ulcère \uparrow
Huang PP <i>et al.</i> , 2007	Randomisée	? ASO	PB-MNCs mobilisée par G-CSF versus BM-MNCs 74 76	0	IM	3 mois	<ul style="list-style-type: none"> • Différence significative (PB-MNCs) : IPS \uparrow, T° cutanée \uparrow, Douleur \downarrow • Différence non significative : Taux d'amputation, TcPO₂, périmètre de marche sans douleur, Guérison d'ulcère
Mohammadzadeh L <i>et al.</i> , 2013	Randomisée contre placebo	? ?	PB-MNCs mobilisée par G-CSF 7	14 (placebo)	IM (60 sites d'inj)	3 mois	<ul style="list-style-type: none"> • IPS \uparrow, TcPO₂ \uparrow • Douleur \downarrow • Taux d'amputation mej \downarrow

TAO : Thrombangiitis obliterans
ASO : Arteriosclerosis obliterans

Tableau XI : Essais randomisés de TC dans l'AOMI avec injection de cellules issues du sang périphérique

- **Effet dose CD34⁺**

Depuis de longue date, la TC est un traitement de choix de certaines hémopathies malignes (Myélome multiple, Lymphome). La dose à injecter aux patients est établie à partir du contingent de HSCs CD34⁺ par kg de poids corporel du receveur ($\geq 2 \times 10^6$ cellules CD34⁺/kg en autogreffe et $\geq 4 \times 10^6$ cellules CD34⁺/kg en allogreffe).

Depuis l'essai pilote TACT, tous les essais cliniques de TC dans l'AOMI ont déterminé la concentration des cellules CD34⁺ dans leurs PTC afin de trouver la dose optimale à injecter. La dose de cellules CD34⁺ dans les BM-MNCs est estimée à $0,38 \times 10^6$ [0,09 - 1,20] kg/poids corporel dans le premier essai clinique supervisé par le CHU de Reims [299].

Onodera R *et al.*, ont séparé leurs patients en 2 cohortes, l'une recevant des BM-MNCs et l'autre des PM-MNCs mobilisées. Ils ont ensuite comparé les résultats issus de 2 lots de PTC, l'un contenant une forte dose de CD34⁺ ($> 5 \times 10^7$) et l'autre une faible dose de CD34⁺ ($\leq 5 \times 10^7$). Le groupe avec la forte dose de CD34⁺ avait un meilleur pronostic [276]. Cet essai n'a pas été randomisé.

La plupart des essais randomisés n'ont pas trouvé de corrélation entre la dose de cellules CD34⁺ injectées et l'efficacité de la TC (taux d'amputation, de survie, TcPO₂) [287, 300].

2. Cellules triées : cellules CD34⁺ ; CD133⁺ ou à activité ALDH

Les BM-MNCs contiennent une population hétérogène de cellules matures, de cellules souches ou progénitrices (HSCs, MSCs et d'EPCs). Certains groupes de chercheurs émettent l'hypothèse qu'injecter une population plus homogène de cellules serait plus efficace pour traiter l'ICMI.

Les EPCs pouvant migrer vers les sites ischémiés constitue un argument solide en faveur de leur utilisation en TC chez les patients atteints d'ICMI [105]. Cependant, malgré les progrès dans la compréhension du mécanisme physiopathologique de la réponse à l'ischémie, la contribution des EPCs dans la formation des néovaisseaux reste controversée. Dans un modèle murin HLIM, les EPCs ont été impliquées dans la

formation de néovaisseaux [288]. L'injection des EPCs « purs » en TC humaine dans l'AOMI n'a pas été réalisée à ce jour du fait de leur changement de phénotype, de caryotype et l'apparition de signes de sénescence *in vitro* [301].

a) Cellules triées CD34⁺

Au cours d'un essai clinique de phase I/II en 2009, l'équipe de Kawamoto a montré la faisabilité du projet et l'innocuité de l'utilisation des cellules CD34⁺ chez les patients « *NO-option* ». Les cellules CD34⁺ ont été obtenues après cytophérèse mobilisée par du G-CSF puis tri magnétique. Trois doses de CD34⁺ par kg de poids corporel (1.10⁵, 5.10⁵ et 1.10⁶/kg) avaient été injectées aux 17 patients en IM. La TC utilisant des cellules CD34⁺ a permis d'améliorer uniquement les critères de jugements secondaires. La réponse ne dépendait pas de la dose utilisée [302].

Plus récemment, l'étude de phase I/II ACT34-CLI (*Autologous CD34⁺ cell therapy for CLI investigator*) randomisée en double aveugle contre placebo a permis de mettre en évidence une tendance à une chute du taux d'amputation dans le groupe traité par les cellules CD34⁺ [290] (voir **Tableau XII** réalisé d'après [101, 115]).

b) Cellules triées CD133⁺

Dans un essai de phase I, Burt *et al.*, ont évalué la faisabilité et l'innocuité de l'injection IM de cellules CD133⁺ obtenues après cytophérèse mobilisée par du G-CSF puis tri magnétique. Les cellules souches CD34⁺/CD133⁺ sont considérées comme plus immatures que les HSCs CD34⁺. Elles correspondraient aux angioblastes. Cette étude non contrôlée a mis en évidence une amélioration de la qualité de vie des patients jusqu'à 6 mois après l'intervention mais non retrouvée à 12 mois [303]. Un essai randomisé a été publié par Raval *et al.*, en 2014 [260] (**Tableau XII**).

c) Cellules avec une haute activité ALDH

L'ALDH est hautement exprimée dans les HSCs. La sélection des cellules issues de la MO ou du sang périphérique avec une haute activité ALDH permet d'obtenir une population cellulaire très primitive. L'essai PACE, (*Patients with intermittend claudication injected with ALDH bright cells*) de phase II randomisé en double aveugle contre placebo, n'est pas parvenu à démontrer l'efficacité de telles cellules [304] (**Tableau XII**).

	Design de l'étude	AOMI (stade et étiologie)	Cellules et nombre de patients traités (n)	Contrôles (n)	Voie d'adm	Durée de suivi	Résultats cliniques
Losordo DW et al., 2012 (essai ACT34-CLI)	Randomisée double aveugle contre placebo	Rutherford 4-5 ASO (n=27) TAO (n=1)	7 PB-MNCs mobilisée par G-CSF + tri cellulaire CD34 ⁺ 9 Forte dose (10 ⁶ cellules CD34 ⁺ /kg)	12 (placebo)	IM	1 an	<ul style="list-style-type: none"> Taux d'amputation ↘
Raval AN et al., 2014 (essai SCRIPT-CLI)	Randomisée contre placebo	Fontaine III-IV ?	7 PB-MNCs mobilisée par G-CSF + tri cellulaire CD133 ⁺	3 (placebo)	IM	1 an	<ul style="list-style-type: none"> Taux de survie sans amputation ↗ ↘ (NS) Périmètre de marche ↗ (NS)
Perin EC et al., 2017 (essai PACE)	Randomisée double aveugle contre placebo	Rutherford 1-3 ASO	38 ALDH ^{br} BM-MNCs	40 (placebo)	IM	6 mois	<ul style="list-style-type: none"> Douleur à la marche → Nombre de vx collatéraux (MRI) → Perfusion capillaire (MRI) →
Szabo GV et al., 2013	Randomisée sans placebo	? ASO	10 (Mélange cellulaire = CD34 ⁺ et CD31 ^{br}) PB-MNCs + <i>in vitro</i> expansion : Ves Cell	10	IM	3 mois 2 ans	<ul style="list-style-type: none"> 3 mois : <ul style="list-style-type: none"> Taux d'amputation ↘ Périmètre de marche ↗ TcPO₂ ↗ Douleur ↘ et Cicatrisation ↗

TAO : Thrombangiitis obliterans
ASO : Arteriosclerosis obliterans
MRI : *Magnetic resonance imaging*
NS : non significatif
br : *bright*

Tableau XII : Essais randomisés de TC dans l'AOMI avec injection de cellules fractionnées

3. Cellules souches mésenchymateuses

Les MSCs sont mises à profit dans la réparation tissulaire et la médecine régénérative pour 5 raisons :

- Leur fort potentiel de multiplication *in vitro* à l'état de MSCs indifférenciées
- Leur fort potentiel de différenciation
- Leurs propriétés immunomodulatrices
- Leur capacité de recrutement sur les sites de lésions ischémiques [145, 146].
- Leur sécrétome

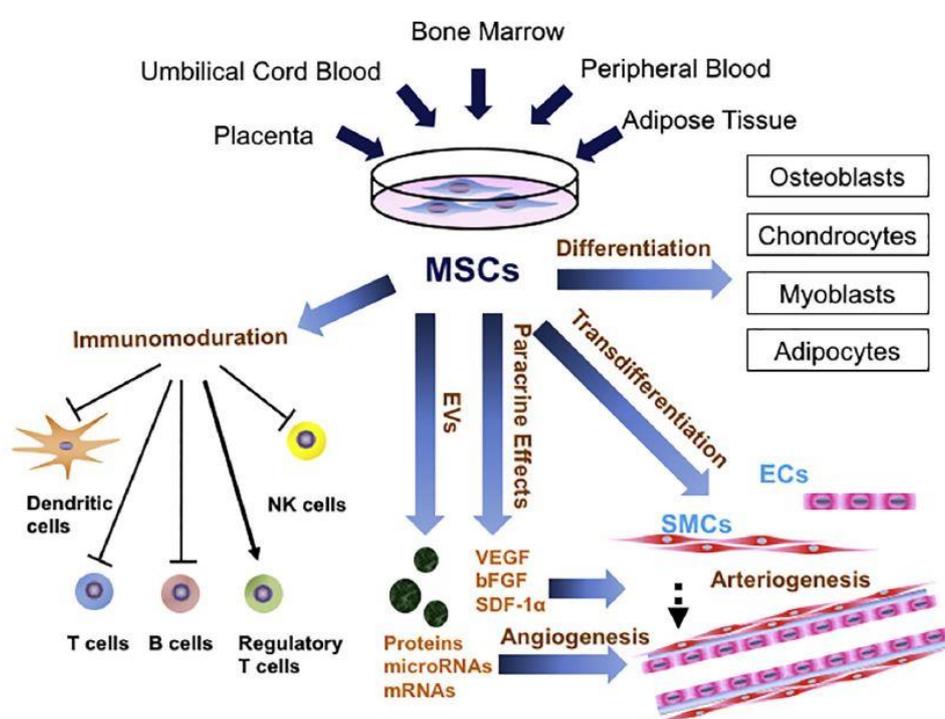


Figure 30 : Sources des MSCs, pouvoir de différenciation et rôle immunomodulateur [115]

Les MSCs issues de différentes sources (MO, TA, tissus embryonnaires) ont été administrées en autologue ou en allogénique aux rongeurs dans le modèle expérimental d'ICMI (**Tableaux III, IV, V et VI**). Ces résultats positifs obtenus dans ces études précliniques encouragent leur utilisation en TC humaine.

Les 8 essais de TC chez l'homme injectant des MSCs issues de 3 origines tissulaires différentes (MO, TA et sang de cordon) sont référencés dans le **Tableau IV XIII**. Seuls 4 d'entre eux sont randomisés.

Au cours d'un essai clinique de phase I/II en 2006, l'équipe de Kim a montré la faisabilité du projet et l'innocuité de l'utilisation des cellules MSCs HLA compatibles issues du sang de cordon ombilical chez 4 patients présentant une maladie de Buerger [305].

Dash NR *et al.*, en 2009 ont reporté les résultats de leur essai randomisé réalisé sur 24 patients dont 12 ont été traités avec MSCs autologues médullaires. Ils ont observé une amélioration de la cicatrisation de l'ulcère et une augmentation du périmètre de marche [306].

Lasala GP *et al.*, en 2012 ont conduit un essai clinique de phase II, en injectant une combinaison de PTC : 30×10^6 BM-MSCs et 30×10^8 BM-MNCs dans le mollet ischémié de 26 patients ICMI. Quatre mois après l'injection, le membre injecté a manifesté une augmentation de l'IPS et le périmètre de marche a été amélioré significativement. La perfusion, visualisée par scintigraphie a montré une amélioration significative [307].

Lu D *et al.*, en 2011 ont conduit un essai clinique randomisé en double aveugle contre placebo chez 41 patients diabétiques souffrant d'ICMI : 41 jambes placebo, 41 jambes recevant des BM-MNCs autologues et 41 jambes recevant des BM-MSCs autologues (**Tableau IX** et **Tableau XIII**). Cet essai a permis de montrer une amélioration des symptômes, une guérison plus rapide des ulcères et une croissance des vaisseaux sanguins collatéraux plus importantes dans le groupe MSCs. De plus, le groupe MSCs avait complètement cicatrisé ses ulcères 4 semaines après l'injection des MSCs [283].

Dans 3 essais, le volume de prélèvement médullaire était limité à 30 à 50 mL obtenu sous anesthésie locale [283, 307, 308]. Les essais de TC avec injection de BM-MNCs nécessitent une ponction médullaire de 500 mL environ obtenue sous anesthésie générale.

L'administration allogénique de MSCs issues de la MO de donneurs sains à des patients atteints d'ICMI est également bien tolérée, mais n'a pas eu d'effets significatifs sur le taux d'amputation [309].

	Design de l'étude	AOMI (stade et étiologie)	Cellules et nombre de patients traités (n)	Contrôles (n)	Voie d'adm	Durée de suivi	Résultats cliniques
Kim SW <i>et al.</i> , 2006	Sans contrôle Non randomisé	Fontaine III -IV TAO	UCB-MSCs HLA compatible allogénique 4	0	sc ou IM	4 mois	<ul style="list-style-type: none"> Score angiographique ↗ (vx collaté-raux ↗) Cicatrisation ↗ Douleur maintenue pendant 14j
Dash NR <i>et al.</i> , 2009	Randomisée sans placebo	Fontaine II-IV ASO (n=6) TAO (n=18)	BM-MSCs 12	12	IM	3 mois	<ul style="list-style-type: none"> Guérison d'ulcère ↗ Périmètre de marche sans douleur ↗
Lasala GP <i>et al.</i> , 2010	Sans contrôle Non randomisé	Fontaine IIIb-IV ASO	BM-MNCs + BM-MSCs autologue 10	0	IM	10 mois	<ul style="list-style-type: none"> Périmètre de marche ↗ IPS ↗ Qualité de vie ↗
Lu D <i>et al.</i> , 2011	Randomisée double aveugle contre placebo	Fontaine II-IV ASO	BM-MSCs autologue 20	41 jambes (placebo)	IM	6 mois	<ul style="list-style-type: none"> IPS ↗, TcPO₂ ↗ Douleur à la marche ↘, Périmètre de marche ↗, Score angiographique ↗ Guérison d'ulcère ↗
Powell RJ <i>et al.</i> , 2011 (essai RESTORE-CLI)	Randomisée	Fontaine III-IV ?	Lxmyelocel-T (Mélange = cellules médullaires CD90 ⁺ + cellules CD14 ⁺) autologue 32	14 (placebo)	IM	6 et 12 mois	<ul style="list-style-type: none"> Taux de survie sans amputation ↗ Guérison d'ulcère ↗
Lasala GP <i>et al.</i> , 2012	Non randomisé	Rutherford 4-6 ASO	BM-MNCs + BM-MSCs autologue 26	26 jambes (placebo)	IM	4 mois	<ul style="list-style-type: none"> IPS ↗ Périmètre de marche ↗ Perfusion sanguine ↗ (Scintigraphie) Qualité de vie ↗
Gupta PK <i>et al.</i> , 2013	Randomisée double aveugle contre placebo	Rutherford 4-6 ?	BM-MSCs autologue 10	10 (placebo)	IM	6 mois	<ul style="list-style-type: none"> IPS ↗
Bura A <i>et al.</i> , 2014 (essai ACellDREAM)	Sans contrôle Non randomisé	Fontaine III-IV ASO (n=6) TAO (n=1)	ADSCs autologue 7	0	IM	6 mois	<ul style="list-style-type: none"> TcPO₂ ↗ Guérison d'ulcère ↗

TAO : Thrombangiitis obliterans
ASO : Arteriosclerosis obliterans
UCB-MSCs : Umbilical cord blood- MSCs
ADSCs : Adipose-derived stem/progenitor cells

Tableau XIII : Essais de TC dans l'AOMI avec injection de cellules souches mésenchymateuses

4. Méta-analyses : Efficacité de la TC

Un nombre croissant de preuves expérimentales, précliniques et cliniques suggère que la TC peut être prometteuse chez les patients atteints d'ICMI. D'une part, les essais précliniques ont utilisé des modèles animaux d'ICMI pour étudier l'efficacité des approches de TC dans la promotion de l'angiogenèse et l'atténuation des lésions musculaires squelettiques. D'autre part, les premières études de TC chez les patients atteints d'ICMI sont des essais de phase I ou II de faisabilité et de tolérance et concluent à une forte présomption d'efficacité. Un nombre limité d'essais randomisés incluant des témoins (n=19) ont été publiés à ce jour (**Tableau IX** et **Tableau XI à Tableau XIII**). Le **Tableau XIV** recense ces différents essais publiés et indique les principales caractéristiques des patients inclus dans ces protocoles de TC. Cinq méta-analyses ont compilé les résultats des essais randomisés (incluant quelques essais non randomisés) en fonction des critères majeurs (taux de survie sans amputation) et secondaires d'efficacité (tests hémodynamiques, qualité de vie, périmètre de marche...) [297, 300, 310-312].

Characteristic	All Studies (n=67)	Randomized Controlled Trials (n=19)	Nonrandomized Controlled Trials (N=7)	Noncontrolled Studies (N=41)
Number	2332	837	338	1157
ASO/TAO/unknown, %	59/14/27	67/3/30	62/8/30	55/22/23
Age, y	62.6	65.2	63.4	59.9
Sex male, %	71.9	70.7	72.2	72.9
Hypertension, %	66.1	77.0	63.0	59.9
Diabetes mellitus, %	58.3	61.0	60.2	55.6
Dyslipidemia, %	54.6	76.5	38.6	45.1
Smoke, %	66.6	64.9	66.9	68.0
Chronic kidney disease, %	20.5	26.4	25.5	9.7
CHD, %	38.9	40.5	38.6	37.5
Previous revascularization, %	50.5	51.2	48.1	50.8
Baseline				
ABI	0.49	0.54	0.57	0.47
TcO ₂ , mmHg	26.2	36.1	19.5	23.4
Follow-up, months	8.1	6.0	6.8	10.2
Therapies				
Antiplatelet, %	66.8	76.2	83.5	50.5
Statins, %	52.9	81.2	25.7	28.9

ABI indicates ankle brachial index; ASO, atherosclerosis obliterans; CHD, Coronary heart disease; TAO, thromboangiitis obliterans; and TcO₂, transcutaneous oxygen tension.

Tableau XIV : Caractéristiques des patients inclus dans les essais de TC dans l'AOMI [312]

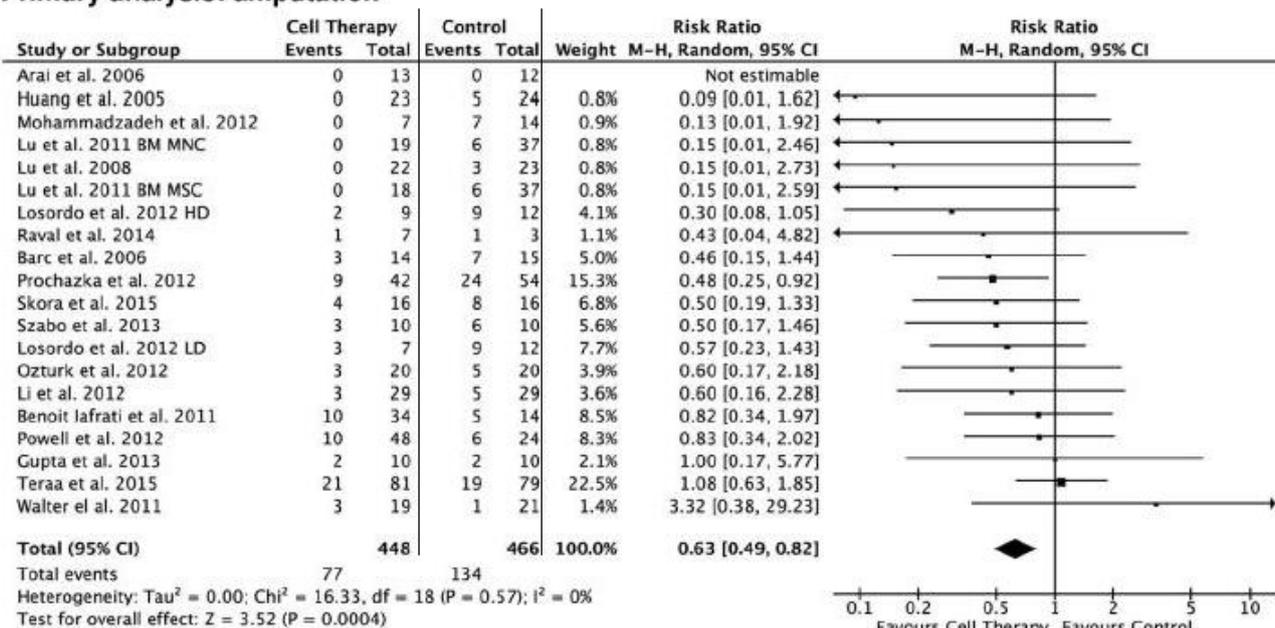
Une récente méta-analyse publiée en 2017 a compilé les résultats de 19 essais cliniques randomisés et contrôlés incluant 837 patients atteints d'AOMI (**Tableau XIV**) :

- ✓ Bonne tolérance de la TC
- ✓ La TC n'a pas amélioré le taux de **mortalité (p=0,39)** toutes causes confondues, ni le périmètre de marche sans douleur (p=0,34)
- ✓ La TC a significativement **réduit le taux d'amputation de 37%** et la douleur, amélioré les chances de survie sans amputation de 18%, la perfusion du membre (objectivée par l'augmentation de l'IPS et de la TcPO₂) et la cicatrisation complète des ulcères (
- ✓ Figure 31) [312].
- ✓ L'administration IM semblerait plus efficace que la voie IA
- ✓ Le taux d'amputation augmenterait parallèlement à la prévalence du diabète dans la cohorte de patients
- ✓ Les cytophères mobilisées par du G-CSF surclasseraient les cellules médullaires et les MSCs.

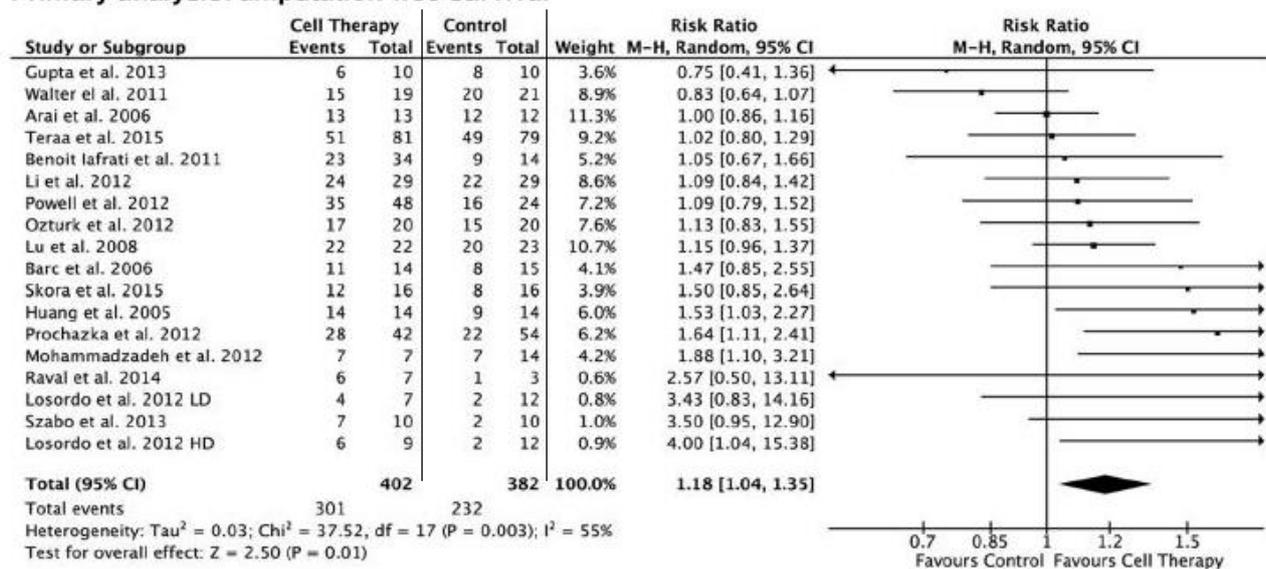
Ainsi, il n'y a pas actuellement de preuve robuste pour soutenir l'efficacité de la TC dans l'ICMI. Les essais sont très hétérogènes et peu de patients sont inclus (moyenne de 35 à 45 patients/essai)

Les patients « *NO-option* », qui présentent le plus mauvais pronostic, représentent un défi thérapeutique majeur. N'ayant pas d'alternative à l'amputation pour ces patients, la TC doit être administrée même en l'absence de preuves solides pour soutenir les effets sur la survie sans amputation. [312]

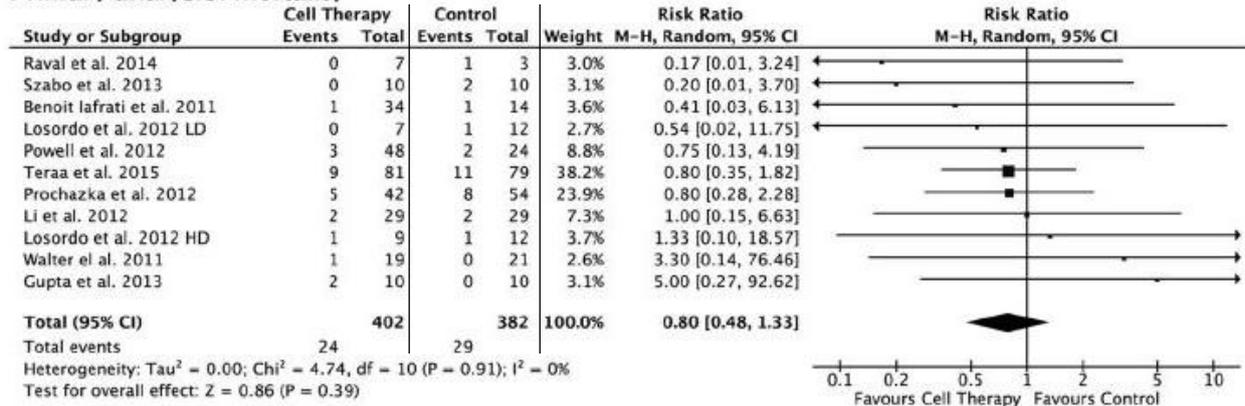
Primary analysis: amputation



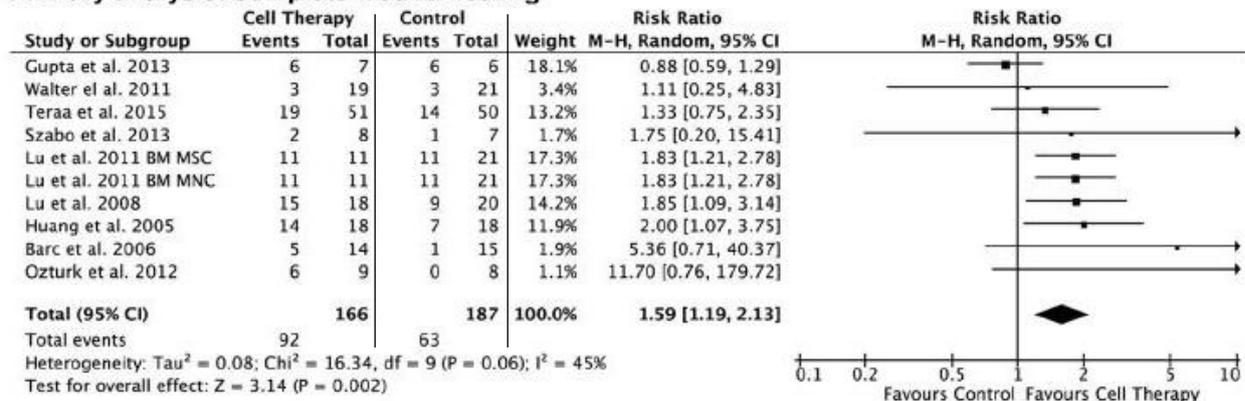
Primary analysis: amputation-free survival



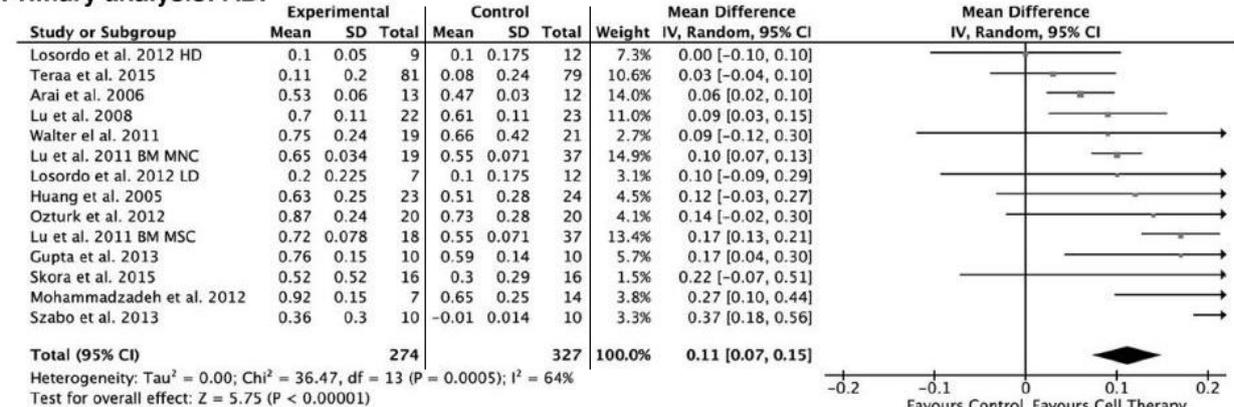
Primary analysis: mortality



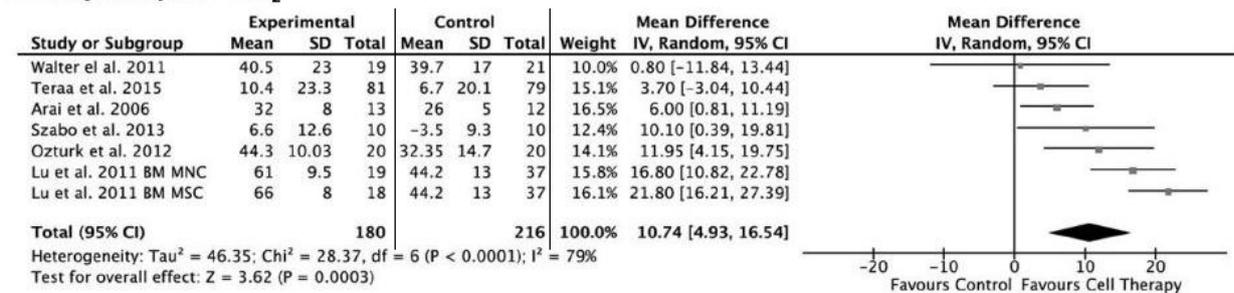
Primary analysis: complete wound healing



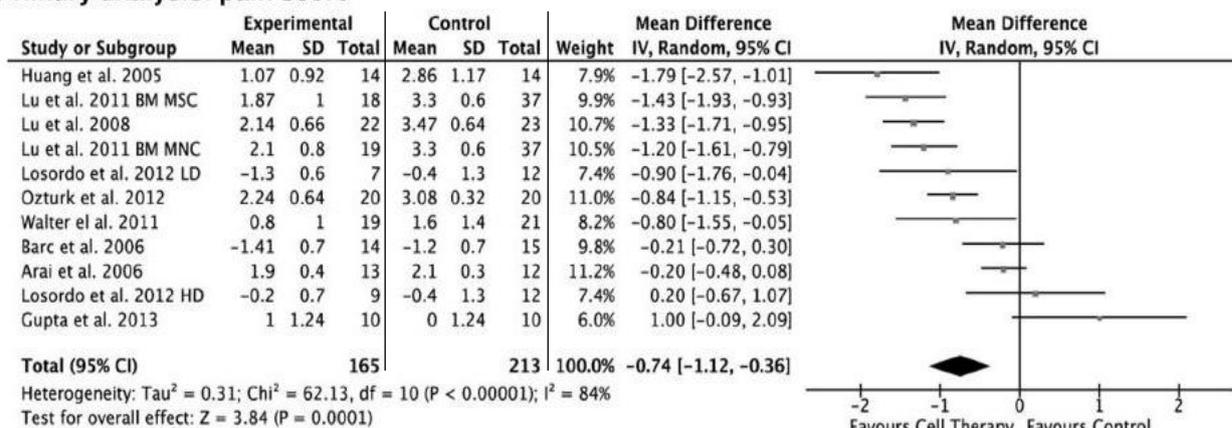
Primary analysis: ABI



Primary analysis: TcO₂



Primary analysis: pain score



Primary analysis: Pain-free walking distance

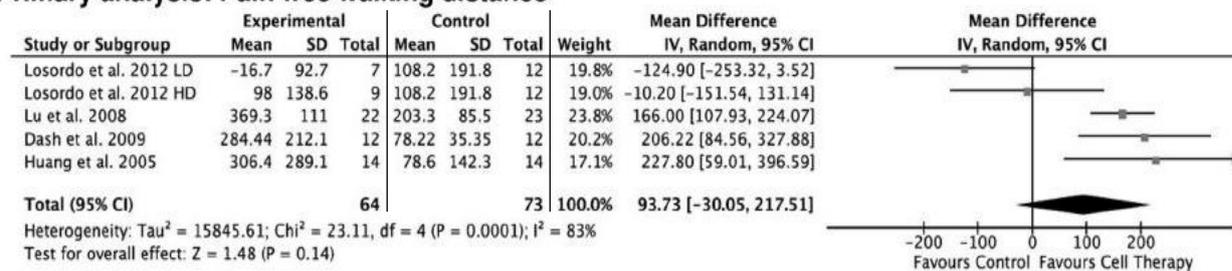


Figure 31 : Résultats des analyses des essais randomisés contrôlés [312]

Ankle brachial index (ABI; valeur absolue), Transcutaneous oxygen tension (TcO₂; mmHg), pain (0–4 scale), and pain-free walking distance (m).

Quatre raisons peuvent être à l'origine du succès limité de la TC ?

1. Tout d'abord, la conception des protocoles de TC dans l'AOMI s'est principalement basée sur les connaissances acquises lors de la TC dans le traitement des hémopathies malignes et beaucoup moins sur les connaissances scientifiques de la physiopathologie de l'ischémie chez ces patients atteints d'ICMI. Deux essais précliniques [256, 313] seulement ont précédés le premier essai TACT chez l'homme. De plus, les expérimentations animales sont souvent réalisées sur des animaux jeunes, en bonne santé, ce qui nous éloigne des patients atteints d'ICMI, généralement composées de sujets plus âgés avec une prévalence élevée de diabète, de tabagisme et de maladies chroniques athérosclérotiques. Les cellules injectées dans les essais précliniques sont également issues de sujet jeune (témoin sain humain en

injection allogénique chez des animaux immunodéficients athymiques ou témoin sain murin issu de la même souche en injection autologue).

2. Les protocoles de TC sont très **hétérogènes** d'un essai clinique à l'autre et le nombre de patients inclus est **insuffisant**. Les BM-MNCs et PB-MNCs sont quantitativement (absence de standardisation de la dose) et qualitativement hétérogènes, et peuvent contenir plusieurs sous-ensembles cellulaires avec un large éventail d'effets. La composition cellulaire exacte des greffons injectés est rarement détaillée dans les essais. Dans ce cas, comment établir des facteurs prédictifs d'efficacité ?
3. L'utilisation de cellules autologues chez ces patients ayant de nombreuses comorbidités associées (telles que le diabète) peut perturber leurs propriétés réparatrices et pro-angiogéniques ce qui peut grandement limiter l'efficacité de la TC.
4. Le devenir des cellules après l'injection n'est pas clair. La survie des cellules dans l'environnement hostile du membre ischémique peut être limitée; la persistance des cellules dans les régions ischémiques n'a pas été systématiquement documentée. Les analyses histologiques des membres amputés sont rares [266, 314, 315]. L'ICMI humaine est caractérisée par une hétérogénéité anatomique dans les lésions tissulaires due à la gravité de l'ischémie. Des stratégies d'administration affinées médiées par échographie et tenant compte de la distribution régionale des lésions ischémiques chez les patients peut être nécessaire pour améliorer l'efficacité.

VI. LA SPECTROSCOPIE RAMAN AU SERVICE DE L'AOMI

A. Altération du muscle squelettique et dysfonction mitochondriale

Par le passé, la physiopathologie de l'AOMI a longtemps été attribuée uniquement aux obstructions athéroscléreuses et à la réduction du flux sanguin dans les membres inférieurs. Or, la physiopathologie de la maladie est plus complexe et des données de la littérature indiquent qu'une **myopathie** se développe secondairement à l'atteinte vasculaire [316]. En effet, l'ischémie des membres inférieurs induit une accumulation progressive de dégâts tissulaires se traduisant par une altération graduelle de la morphologie des fibres musculaires et par un **stress oxydatif** endommageant principalement le *Gastrocnemius*. Il paraît en effet évident que les tissus les plus vulnérables à l'ischémie dans les membres inférieurs sont les muscles squelettiques. La tolérance du muscle squelettique à l'ischémie est d'environ 4h. De plus, les **épisodes répétés d'ischémie-reperfusion** pouvant se produire à l'exercice et au repos sont délétères pour le muscle et induisent une altération musculaire aussi bien morphologique que métabolique [316]. Concernant l'altération morphologique au cours de l'AOMI, la densité musculaire est diminuée et **une accumulation de lipides** se produit au sein des fibres induisant une altération fonctionnelle comme le confirme les analyses histologiques de biopsies [317]. Concernant l'altération métabolique, elle est due à une dysfonction mitochondriale [318] induisant une réduction de la production d'ATP et une augmentation de celle des ROS [319]. Ces derniers provoquent des dommages aux protéines, aux lipides et aux acides nucléiques du tissu [320]. La dysfonction mitochondriale ainsi que la dégradation des fibres musculaires sont associés à la diminution du périmètre de marche et à une altération de la fonctionnalité [321]. De son côté, l'inflammation promeut le développement de l'athérosclérose et joue un rôle dans le tableau symptomatique de l'AOMI. Le muscle squelettique ischémié est le siège d'une inflammation locale exacerbant les symptômes et altérant le métabolisme musculaire. L'inflammation est en effet associée une réduction du périmètre de marche [322].

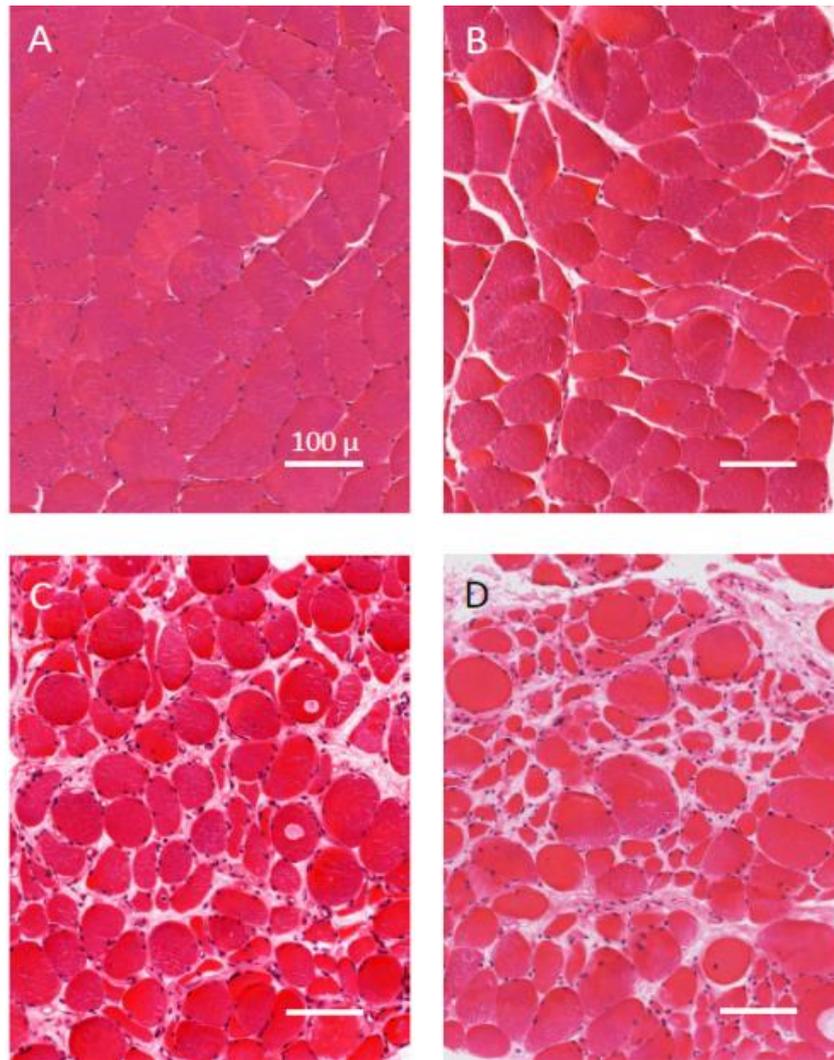


Figure 32 : Histologie muscle normal et AOMI [323]

- A. Muscle normal** avec des myofibres de forme polygonale et uniformes. Les noyaux sont situés en périphérie. L'endomysium et le pérимysium sont fins.
- B. Muscle légèrement endommagé** d'un patient atteint d'AOMI avec des signes d'atrophie légère, la présence de myofibres atrophiques arrondies ou anguleuses.
- C. Muscle modérément endommagé** d'un patient atteint d'AOMI avec des signes d'atrophie modérée, des myofibres arrondies ou anguleuses avec, pour certaines d'entre elles, des noyaux internes occasionnels, la présence de vacuoles et d'un endomysium fibreux.
- D. Muscle sévèrement endommagé** d'un patient atteint d'AOMI avec des signes d'atrophie, d'un élargissement entre les fibres et d'une fibrose endomysiale et pérимysiale modérée. Les myofibres sont angulaires et celles avec des noyaux internes sont nombreuses. [323]

Jusqu'à présent, les tentatives de caractérisation de la dégradation du muscle au cours de l'AOMI se sont limitées à des évaluations histopathologiques invasives notamment qualitatives et à des mesures de section transversale de la myofibre.

- ✓ La **morphologie musculaire normale** est caractérisée par la présence de fibres polygonales généralement de même forme et de même taille, et ayant un noyau refoulé en périphérie. L'endomysium et le pérимysium enrobant les fibres sont fins (**Figure 31A**).
- ✓ Les **cellules musculaires modérément myopathiques** présentent généralement une variation de forme et de taille accrue et commencent à développer une vacuolisation des fibres. Dans le cas de myofibres sévèrement myopathiques, des groupes de microfibrilles en voie de détérioration commencent à apparaître, les vacuolisations au sein des myofibres s'intensifient ainsi que la présence de myofibres avec des noyaux situés centrolocalisés. Les tissus interstitiels (endomysial et pérимysial) sont plus épais et plus fibreux (**Figure 31 B à D**).

B. La spectroscopie Raman

Ainsi, la morphologie des myofibres change pendant la **progression de l'AOMI** et il paraît utile de développer des **techniques non invasives** évaluant la progression de la détérioration musculaire. En effet les techniques utilisées actuellement dans le suivi de l'AOMI se focalisent essentiellement sur la mesure du flux sanguin et sur l'évaluation de la qualité des vaisseaux. La spectroscopie Raman est un outil analytique non invasif utilisant les **propriétés de diffusion de la lumière** pour caractériser les vibrations moléculaires dans un échantillon de tissu. L'empreinte spectrale produite fournit des informations moléculaires riches. La spectroscopie Raman présente des applications cliniques potentiellement importantes pour l'évaluation *in situ* en temps réel des tissus vivants [324]

La spectroscopie Raman est basée sur l'interaction des rayonnements électromagnétiques avec la matière. Lorsque la lumière monochromatique (UV-**visible**-IR) passe à travers un milieu transparent (solide, liquide ou gazeux), une grande partie de cette lumière est transmise dans toutes les directions de l'espace sans changement de fréquence (**Figure 33**). Ce processus est appelé diffusion

élastique ou Rayleigh. Il n'y a pas d'échange d'énergie entre le rayonnement et la matière, donc la diffusion Rayleigh n'apporte aucune information vibrationnelle sur la molécule.

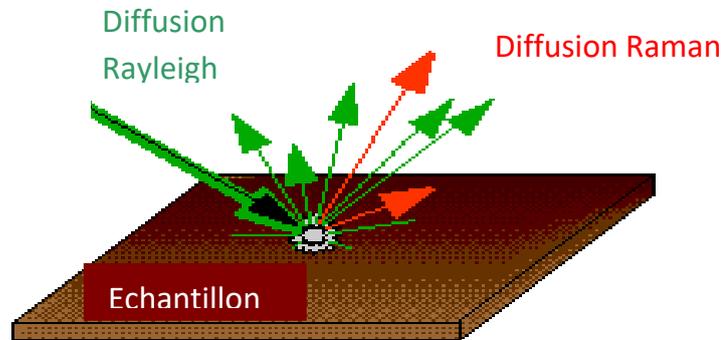


Figure 33 : Diffusion de la lumière

Cependant, une petite fraction de lumière est diffusée à différentes longueurs d'onde, appelée diffusion Raman. Elle inclut deux types de diffusion :

- ✓ la diffusion Raman Stokes
- ✓ la diffusion Raman anti-Stokes

Dans la diffusion Raman Stokes, la molécule est amenée à un niveau vibrationnel supérieur à celui d'origine. Par contre, lors de la diffusion Raman anti-Stokes, la molécule est amenée à l'état fondamental depuis un niveau vibrationnel supérieur. Ce phénomène est très rare et concerne 1 sur 10^7 photons. Le gain ou la perte d'énergie des photons inélastiques émis par rapport aux photons incidents est traduit sur les spectres Raman par un déplacement en fréquence. Les fréquences de vibration des groupements fonctionnels d'une molécule dépendent de la masse des atomes impliqués dans le mode normal de vibration ainsi que des forces des liaisons interatomiques.

Le diagramme de Jablonski (**Figure 34**) permet de visualiser les processus d'absorption infrarouge et de diffusion Raman.

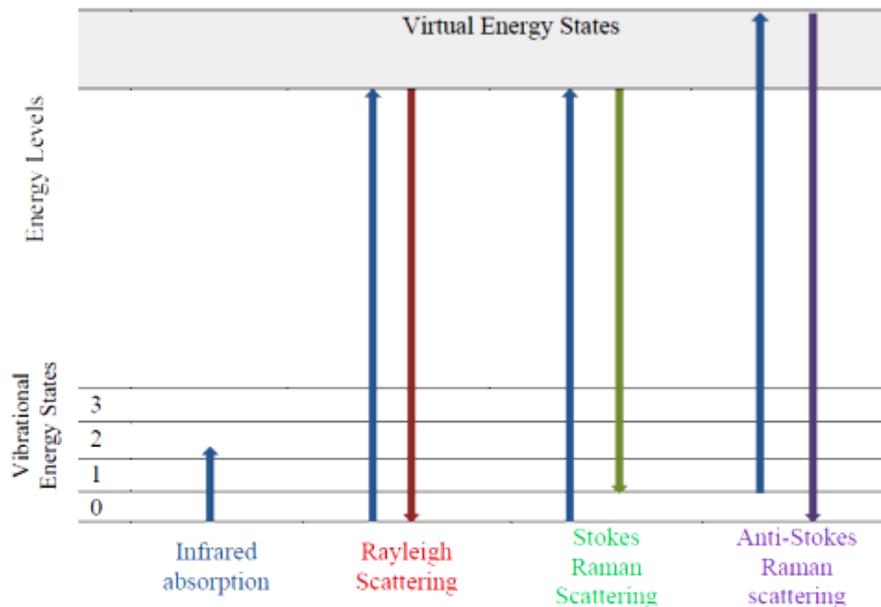


Figure 34 : Diagramme de Jablonski [325]

Ce diagramme énergétique représente la diffusion élastique de Rayleigh et la diffusion Stokes et Anti-Stokes de Raman.

La spectroscopie Raman est devenue une technique puissante et très sensible aux changements morphologiques et à la composition moléculaire qui se produisent dans le tissu durant le développement de la lésion. L'information spectrale générée est intrinsèque à l'échantillon. Elle est déterminée seulement par sa composition chimique sans coloration ni marquage. Les principaux constituants moléculaires des espèces biologiques (les cellules, les tissus, et les fluides biologiques) sont habituellement les acides nucléiques (ADN/ARN), les protéines, les glucides, les lipides, et l'eau et qui peuvent être caractérisés par des empreintes spectroscopiques spécifiques. Cette composition chimique subit des variations au niveau moléculaire lors d'une agression par des facteurs environnementaux, des maladies, des cancers, ou d'autres pathologies ou anomalies. La spectroscopie Raman permet d'appréhender, sur un plan moléculaire, les transitions de l'état normal à l'état lésionnel, transitions difficilement décelables parfois à l'aide des méthodes morphologiques.

Toutefois, le véritable succès de l'application de cette technique en clinique s'est appuyé sur les méthodes statistiques multivariées. En effet, le problème de l'extraction des informations utiles au diagnostic peut être divisé en 3 trois niveaux distincts mais liés : statistiques, chimiques et morphologiques :

1. **L'analyse statistique:** Elle peut être utilisée pour caractériser l'ensemble des variations spectrales. Ces variations peuvent être utilisées comme marqueurs spectroscopiques pour classer les tissus par catégorie histologique et pour identifier les constituants biochimiques et morphologiques spécifiques à différents stades de la maladie.
2. **L'analyse chimique :** La spectroscopie Raman peut fournir des informations sur la composition chimique des tissus. Un spectre peut être modélisé comme une superposition des spectres de tous les constituants chimiques présents dans le tissu, fournissant ainsi des informations chimiques qualitatives et quantitatives. L'information chimique est importante, dans la mesure où l'apparition de la maladie s'accompagne de modifications biochimiques. Cette technique permet de détecter des modifications biochimiques qui peuvent se produire dans les compartiments cellulaires ou extracellulaires du tissu.
3. **L'analyse morphologique :** Les méthodes quantitatives et qualitatives permettent d'extraire les informations sur les constituants biochimiques présents dans un échantillon tissulaire et de les corrélérer avec les structures morphologiques. Les pathologistes effectuent un diagnostic en évaluant la présence, l'absence ou l'abondance relative de constituants ou de structures morphologiques présentes au niveau cellulaire et tissulaire. La spectroscopie Raman permet de fournir de telles informations morphologiques d'une manière quantitative et objective.

C. Applications biomédicales de la spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman est une technique analytique de plus en plus utilisée en médecine et en biologie. Des études ont démontré qu'elle permettait d'identifier les structures sub-cellulaires telles que le noyau, le cytoplasme et la mitochondrie [326]. De plus, il est possible d'identifier les différentes phases du cycle cellulaire [327]. La spectroscopie Raman a été aussi utilisée dans la détection de plaques d'athérome à haut risque de rupture [328]. En 1992, Baraga *et al.*, ont développé une sonde Raman pouvant être utilisée *in situ* et permettant de collecter en temps réel des informations quant à la composition des plaques d'athérome [329]. Dans le domaine du diagnostic biomédical, la spectroscopie Raman a été largement appliquée pour sonder de façon

quantitative et qualitative des altérations au niveau de la composition moléculaire des tissus à divers états pathologiques affectant les tissus bronchiques [330], cérébral [331], gastrique [332], articulaire [333] et mammaire [334].

Ces études ont révélé certains changements spectraux entre les tissus normaux et pathologiques faisant ainsi apparaître tout le potentiel de cette technique vibrationnelle dans la détection des tissus affectés par un désordre biologique. En corrélant les caractéristiques spectrales avec les structures histologiques, des informations sur les différences dans la composition moléculaire de ces structures ont été révélées.

L'objectif principal de la spectroscopie Raman *in vivo* est de développer cette méthode pour analyser en temps réel les tissus, afin de caractériser des tissus normaux et pathologiques. Cet avantage justifie l'intérêt sans cesse croissant de l'application de cette technique dans le domaine médical. La nature aqueuse des tissus s'oppose à l'utilisation de la spectroscopie infrarouge pour la plupart des mesures *in vivo*, tandis que la spectroscopie Raman est adaptée à l'analyse des échantillons aqueux. Par conséquent, la spectroscopie Raman pourrait être utilisée pendant les procédures cliniques telles que l'endoscopie, la colposcopie, la biopsie et la chirurgie. Les fibres optiques peuvent être intégrées dans les cavités de ces dispositifs cliniques afin de collecter l'information directement sur le tissu à analyser *in situ*. L'intégration des dispositifs spectroscopiques dans les examens actuels pourrait améliorer considérablement la pratique clinique.

La spectroscopie Raman est devenue un outil de diagnostic *in situ* d'une grande importance [335-337]. Cette technique peut apporter une aide au clinicien pour cibler plus précisément les lésions et ainsi fournir aux pathologistes des échantillons tissulaires représentatifs de l'état général de la lésion pour établir un diagnostic. L'élimination complète des lésions tout en préservant les tissus sains durant les interventions chirurgicales peut être améliorée.

D. L'utilisation de la spectroscopie Raman dans l'AOMI

A notre connaissance, il n'y a pas d'étude sur l'utilisation de la spectroscopie Raman pour caractériser les changements métaboliques et biochimiques des constituants moléculaires résultant de l'AOMI. Des études antérieures ont reporté l'utilisation de la spectroscopie Raman pour la caractérisation biochimique de l'hippocampe en post-ischémie cérébrale [338] et l'analyse de l'effet de l'ischémie sur le sérum sanguin [339], la détection de l'ischémie du myocarde [340].

En 2014, l'équipe de Cluff a eu recours à la spectroscopie Raman à surface améliorée. Cette technique utilise des surfaces métalliques nanostructurées afin d'amplifier le signal Raman. En effet, les travaux de Cluff *et al.*, ont pu corrélérer l'IPS (c'est-à-dire la mesure du flux sanguin) aux signatures spectrales des biopsies musculaires correspondantes de patients atteints d'ICMI [341].

L'un des objectifs de la thèse est de développer une approche spectroscopique non invasive dédiée au diagnostic *in vivo* et en temps réel l'ischémie. La spectroscopie Raman *in vivo* pourrait devenir une aide au diagnostic des lésions précoces dans l'AOMI et être utilisée comme marqueur pronostic sur du long terme en complément des approches traditionnelles (imagerie, IPS, TcPO₂).

VII. ARTICLE 1

CELL THERAPY IN CRITICAL LIMB ISCHEMIA: A COMPREHENSIVE ANALYSIS OF TWO CELL THERAPY PRODUCTS

Claire Tournois^{1,2}, Bernard Pignon³, Marie-Antoinette Sevestre⁴, Rida Al-Rifai², Valérie Creuza¹, Gaël Poitevin², Caroline François² & Philippe Nguyen^{1,2}

¹ Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire Robert Debré, Reims,

² EA3801, SFR CAP-santé, Université de Reims Champagne-Ardenne, France.

³ Unité de Thérapie Cellulaire, Centre Hospitalier Universitaire, Reims, France,

⁴ Service de Médecine Vasculaire, Centre Hospitalier Universitaire, Amiens, France

Introduction :

La TC fait l'objet d'intenses recherches pour être proposée comme option de prise en charge des patients présentant une ICMI à haut risque d'amputation. Les patients dits « *NO-option* » ne sont pas éligibles aux techniques conventionnelles de revascularisation. Les essais cliniques menés afin de promouvoir l'angiogenèse dans le membre ischémié ont permis de faire la lumière sur une certaine efficacité de la TC. En effet, les méta-analyses ont permis de montrer que la TC est efficace pour améliorer les critères cliniques secondaires tels que la douleur, la TcPO₂ et la cicatrisation des ulcères mais concernant le taux de mortalité, la TC n'est pas parvenue à le réduire significativement. La majorité des études a exploité des cellules autologues issues de la MO ou du sang périphérique. Cependant, ces cellules ont rarement été caractérisées. Par conséquent, le mécanisme d'action reste encore à élucider.

L'objectif de cette étude a été de caractériser deux produits de thérapie cellulaire (CTPs pour « *Cell therapy products* ») : l'un issu du sang périphérique (PB-CTPs ; n=20) et le second issu de la MO (BM-CTPs ; n=20). Ces cellules sont obtenues à partir de patients « *NO-option* ».

Matériel et Méthodes :

Les PB-CTPs ont été obtenus par cytophérèse sans mobilisation des patients au préalable par du G-CSF. Les BM-CTPs ont été obtenus par ponction aspiration de la MO au niveau des crêtes iliaques et sous anesthésie générale. Les CTPs ont été caractérisés par cytométrie en flux et les EPCs et MSCs quantifiés. Ces CTPs ont également été caractérisés selon leur profil transcriptomique. Le profil angiogénique et l'issue clinique des patients à 6 mois est également décrit.

Résultats :

A l'état basal, les patients inclus ont présenté un syndrome inflammatoire majeur ainsi que des concentrations sanguines de CXCL12, de SCF et de G-CSF élevées et des concentrations GM-CSF basses.

Les concentrations de cellules CD34⁺ circulantes étaient également faibles, inversement corrélées à l'âge, à l'inflammation et aux facteurs de risque cardiovasculaire.

Les BM-CTPs ainsi que les PB-CTPs étaient très hétérogènes entre eux. En effet, les cellules matures ainsi que les CFU-EC (*colony forming unit endothelial cells*) étaient présents en plus grande quantité au sein des PB-MNCs. Les cellules nucléées étaient 2.9 fois plus élevées en fréquence au sein des PB-CTPs par rapport aux BM-CTPs. Les cellules CD2⁺ (lymphocytes T et NK) représentaient 44% des BM-CTPs et 58% des PB-CTPs. Les cellules CD34⁺ et les EPCs étaient plus abondants au sein des BM-CTPs (respectivement 8,9 et 5,3 fois plus dans les BM-CTPs par rapport au PB-CTPs). Les fréquences des EPCs étaient les suivantes (1/8000 cellules nucléées dans la MO et 1/124 000 cellules nucléées dans le sang). Les PB-CTPs, étaient très riches en monocytes et en plaquettes.

Des MSCs étaient présentes au sein des deux CTPs Ces cellules sont rares mais présentes (1/28 000 cellules nucléées dans la MO et 1/114 000 cellules nucléées dans le sang) chez le patient ayant une AOMI évoluée.

Les profils transcriptomiques ont révélé un fort potentiel pro-angiogénique des BM-CTPs probablement dû aux cellules souches et progénitrices. Par exemple, l'expression du gène codant pour CXCL12 était 843 fois plus élevé chez les BM-CTPs

par rapport au PB-CTPs. De même pour l'expression du gène codant pour VCAM1, son expression était 300 fois plus élevée dans les BM-CTPs par rapport au PB-CTPs.

Les résultats cliniques à 6 mois post-TC chez les 40 patients inclus sont les suivants : 12 patients sur 20 sont en vie sans amputation majeure dans le groupe BM-CTPs et 14 patients sur 20 dans le groupe PB-CTPs.

Une faible TcPO₂, une CRP élevée et une quantité élevée de PNN au sein des CTPs sont des facteurs prédictifs défavorables de l'issue clinique à 6 mois des patients.

Conclusion :

La transcriptomique permet de caractériser les PTC et il apparaît que les BM-CTPs présente un fort potentiel pro-angiogénique bien que les cellules souches y soient représentées en très faible quantité. Cependant, les BM-CTPs sont plus riches en cellules souches que les PB-CTPs. La très forte proportion de cellules matures au sein des PB-CTPs signifie que ces derniers semblent agir selon un mécanisme essentiellement paracrine. L'issue clinique à 6 mois indique que le statut délétère des patients entrave la réussite de la TC et fait la lumière sur les limites des approches autologues. En ce sens, les MSCs semblent représenter une piste prometteuse.



Cell therapy in critical limb ischemia: A comprehensive analysis of two cell therapy products

CLAIRE TOURNOIS^{1,2}, BERNARD PIGNON³, MARIE-ANTOINETTE SEVESTRE⁴, RIDA AL-RIFAI², VALERIE CREUZA¹, GA L POITEVIN², CAROLINE FRANÇOIS² & PHILIPPE NGUYEN^{1,2}

¹Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire Robert Debr, Reims, France, ²Equipe d'accueil de recherche, Structure F d'attribution de Recherche Champagne Ardenne Picardie-Sant, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France, ³Unité de Thérapie Cellulaire, Centre Hospitalier Universitaire, Reims, France, and ⁴Service de Médecine Vasculaire, Centre Hospitalier Universitaire, Amiens, France

Abstract

Background. Cell therapy has been proposed as a salvage limb procedure in critical limb ischemia (CLI). In spite of the fact that clinical trials found some efficacy, the mechanism of action remains elusive. The objective of this study was to characterize two autologous cell therapy products (CTPs) obtained from patients with advanced peripheral arterial disease. **Methods.** Bone marrow (BM-CTPs) (n = 20) and CTPs obtained by non-mobilized cytopheresis (peripheral blood [PB]-CTPs) (n = 20) were compared. CTPs were characterized by their cell composition, by the quantification of endothelial progenitor cells (EPCs) and mesenchymal stromal cells (MSCs) and by transcriptomic profiling. The angiogenic profile and the 6-month outcome of CLI patients are described. **Results.** Patients presented inflammation syndrome and high levels of CXCL12, soluble stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor, whereas granulocyte macrophage colony-stimulating factor was low. Circulating CD34+ cells represented rare events. BM and PB-CTPs were heterogeneous. Mature cells and colony-forming unit–endothelial cells were in higher concentration in PB-CTPs, whereas CD34+ stem cells and EPCs were more abundant in BM-CTPs. MSCs were identified in both CTPs. Transcriptomic profiling revealed the strong angiogenic potential of BM-CTPs. Transcutaneous partial pressure of oxygen, C-reactive protein and neutrophil content in CTPs are predictive of the clinical outcome at 6 months. **Discussion.** Transcriptomic allows an accurate characterization of CTPs. BM-CTPs have the richest content in terms of stem cells and transcriptome. The high content of mature cells in PB-CTPs means that they work via a paracrine mechanism. The clinical outcome indicates the deleterious influence the patients' status and the limits of an autologous approach. In this respect, MSCs may allow an allogenic strategy.

Key Words: angiogenesis, cell therapy, critical limb ischemia, endothelial progenitor cells, mesenchymal stem cells, transcriptome

Introduction

The most common cause of chronic lower limb ischemia is atherosclerotic peripheral arterial disease (PAD). In the absence of control of cardiovascular risk factors, the disease will progress leading to critical limb ischemia (CLI) [1]. The annual incidence of CLI is estimated to be 500–1000 cases per million people in developed countries [1]. CLI may lead to limb loss or even death unless treated promptly. Up to 25% of patients are not eligible for standard revascularization procedures and are defined as “no-option CLI” (NO-CLI). For these patients, autologous cell therapy has been proposed. The Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation (TACT) trial was the first large report on the use of bone marrow (BM)-derived mononuclear cells (MNCs) in the treatment of CLI [2].

Since 2002, 88 clinical trials have been published, and around 3000 patients have been treated with autologous transplantation. These studies were rarely randomized and generally included limited numbers of patients, which may explain that no definite conclusion about efficacy could be drawn. Recent meta-analyses were in favor of a beneficial effect of cell therapy on major amputation rates and amputation-free survival [3,4]. A major pitfall, when interpreting clinical trials including meta-analyses, is that many different cell therapy products (CTPs) were used. If the majority of CTPs were obtained from BM, peripheral blood (PB) with different protocols was also used (with or without granulocyte-colony stimulating factor [G-CSF]-mobilization and sub-fractionated cell preparations, e.g., CD34+ or CD133+ cells). If the safety

Correspondence: Philippe Nguyen, MD, PhD, Equipe d'accueil de recherche, Structure F d'attribution de Recherche Champagne Ardenne Picardie-Sant, Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire Reims, Hôpital Robert-Debr, 51092 Reims Cedex, France. E-mail: pnguyen@chu-reims.fr

(Received 15 July 2016; accepted 20 October 2016)

ISSN 1465-3249 Copyright © 2017 International Society for Cellular Therapy. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.10.013>

of cell therapy can be considered as established [5], the mechanism of the neovascularization remains to be elucidated. In most clinical trials, the exact composition of the cellular product remains elusive and is obviously highly variable [6]. To improve our knowledge on the mechanism of action of CTPs, it is mandatory to characterize extensively each product. A clinical trial gave us the opportunity to perform an ancillary study that is presented here. The clinical trial (trial number NCT00533104) initiated in two French academic hospitals was designed as a two-arm, open labelled phase IIa trial, aimed at establishing the feasibility and safety of two different CTPs (BM- versus PB-CTPs). The originality of the clinical trial is related to the fact that PB-CTPs were collected without any G-CSF-mobilization. Forty patients presenting with CLI were included in this clinical trial and were implanted with BM- or PB-CTPs (20 in each group). We could demonstrate the safety and, particularly, the absence of thrombogenicity of both CTPs [7].

The ancillary study was designed as a comprehensive analysis of CTPs, using transcriptomic characterization in addition to the quantification of stem and progenitor cells. The objectives of the present study were: (i) to characterize the angiogenic potential of non-mobilized PB-CTPs in comparison with BM-CTPs, (ii) to evaluate the influence of the patient status on the characteristics of CTPs and (iii) to compare the CTPs' characteristics and patients' status with clinical outcome. The angiogenic profile of CLI patients was determined before cell therapy (baseline). Angiogenic potential of each CTP was evaluated by clonogenic assays (colony forming unit-endothelial cells, [CFU-EC] and CFU-fibroblast [CFU-F]) and by the quantification in flow cytometry (FC) of hematopoietic stem cells (HSCs) and endothelial progenitor cells (EPCs). Clonogenic assays, FC quantification and transcriptomics indicate that BM-CTPs possess a much higher angiogenic potential than PB-CTPs. The analysis of clinical response indicates that the patients' status at baseline is preponderant for their outcome at 6 months.

Materials and methods

Patients, BM- and PB-cell products preparation

The study protocol was approved by the Ethics Committee of Champagne Ardennes. The design of the clinical trial can be found on the site www.clinicaltrials.gov (trial number NCT00533104). Briefly, 40 patients presenting with unilateral CLI but not suitable candidates for non-surgical or surgical revascularization were included. Transcutaneous partial pressure of oxygen (TcPO₂) was measured using a TINA TCM4 monitor (Radiometer) in standardized conditions. CTPs were obtained by BM (n = 20) or cytopheresis (n = 20). For

the preparation of BM-cell products, 500 mL of BM were collected under general anesthesia through multiple punctures of the posterior iliac crest. BM-CTPs were isolated using a blood-cell separator (Cobe Spectra, version 4, Bone Marrow Processing Program, Gambro BCT). PB-CTPs were collected by cytopheresis of one blood mass (5.1 ± 1.1 L) during 90 min on the same blood-cell separator (Cobe Spectra, version 6, auto-PBSC program) [8]. BM- and PB-CTPs were suspended in an autologous patient's plasma and were implanted once within 3 h after preparation, by 30 multiple intramuscular (IM) injections into the gastrocnemius of the ischemic leg (1 mL per injection). Follow-up visits were performed on post-procedure days 1, 2, 3, 14 and 28 and at months 3 and 6. The clinical outcome was assessed 6 months after CTP implantation.

Patient's blood parameters

Quantitative determination of interleukin-6 (IL-6) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) plasma was performed by specific human antibodies using the Quantikine ELISA kit (R&D Systems Inc), according to the manufacturer's instructions. Chemokine, CXC motif, ligand 12 (CXCL12 or stromal-cell-derived factor, SDF_(1α+1β)), soluble stem cell factor (sSCF or KIT Ligand), granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) and granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) EDTA plasma levels were measured by Luminex multi-analyte profiling (xMAP) technology using Milliplex MAP kit human cytokine panel I or II (Millipore Corporation). C-reactive protein (CRP) serum levels were measured using standardized methods (COBAS, Roche Diagnostics). CD34+ cells analysis was performed according to the reference method [9] using phycoerythrin (PE)-conjugated CD34 (clone 581, epitope class III; Beckman Coulter) and fluorescein (FITC)-conjugated CD45 anti-human monoclonal antibodies, the 7-AAD viability dye (Beckman Coulter), PE-immunoglobulin (Ig)G1 and FITC-IgG1 (Beckman Coulter) as isotypic controls, and StatusFlowPro control as target values.

CTP parameters

Cell counts

Cells counts were performed with an XE-2100™ Sysmex counter (Roche Diagnostics) in Reims Hospital, and a Gen's counter (Beckman Coulter) in Amiens Hospital. BM- or PB-cell products' characterization methods have been previously described [8].

Characterization of mononuclear cells, stem and progenitor cells in FC

A three-color FC analysis was performed as previously described to determine the proportion of CD2+

cells (T lymphocytes and Natural Killer cells [NK cells]), and CD19+ cells (B lymphocytes) in the cell products. HSC and EPC characterization methods have been extensively described previously [8]. Briefly, EPCs were defined as CD34+/CD133+/VEGF-R2+ cells [10]. The gating excluded platelets, debris, nude nuclei (megakaryocytic and erythroblastic cells) and non-viable cells. A total of 400,000 cells was analyzed to select and quantify CD34+/VEGF-R2+ and CD34+/CD133+/VEGF-R2+ cells [8].

Characterization of CFU-ECs

BM- and PB-CTPs cells were plated on fibronectin-coated 6-well dishes (BD BioCoat Human fibronectin cellware, BD Biosciences) in CFU-Hill liquid medium (Stemcell Technologies). After 2 days, non-adherent cells were harvested and plated on fibronectin-coated 24-well plates (BD BioCoat Human fibronectin cellware, BD Biosciences). Discrete CFU-EC (CFU-Hill or early EPC or circulating angiogenic cells) [11] emerge in 5 days, composed of round cells centrally with spindle-shaped cells growing at the periphery. CFU-ECs were suspended in phosphate-buffered saline $\times 1$ (PBS) with 2% of fetal calf serum and were labelled for 30 min, at 4°C, in the dark, with the following monoclonal antibodies: FITC-conjugated CD14 (monocytic marker; Dako), CD31 (PECAM1; BD Pharmingen), CD105 (endoglin; BD Pharmingen), PE-conjugated VEGF-R2 (KDR; R&D Systems), PE-Cyanine 5 (PCy5)-conjugated CD34 (Immunotech, Beckman Coulter) and PE-Cyanine 7 (PCy7)-conjugated CD45 (leukocyte common antigen; Immunotech, Beckman Coulter). The isotype-matched mouse IgG1-FITC, IgG1-PE, IgG1-PCy5 and IgG1-PCy7 were used as negative controls. After being washed twice with PBS, samples were analyzed on an FC500 flow cytometer (Beckman Coulter). Data were analyzed using Kaluza software.

Characterization of mesenchymal stromal cells

The MesenCult Proliferation Kit (Stemcell Technologies) was used for the CFU-F assay [12]. A four-color FC analysis was performed on FC500 analyzer (Beckman Coulter) to characterize mesenchymal stromal cells (MSCs): FITC-conjugated CD105, PE-conjugated CD90 (Thy-1), PE-Cy7-conjugated CD73 (5' nucleotidase), PE-Cy5-conjugated human leukocyte antigen-D related (HLA-DR; BD Pharmingen) and PCy5-conjugated CD34, CD45 and CD11b (integrin alpha M; Immunotech, Beckman Coulter). The isotype-matched mouse IgG1-FITC, IgG1-PE, IgG1-PCy5 and IgG1-PCy7 were used as negative controls. Data were analyzed using Kaluza software.

Transcriptomic characterization of PB- and BM-cell products by simultaneous real-time polymerase chain reactions

The messenger RNA (mRNA) analysis was realized from 11 BM and 11 PB randomly selected cell products. The following cells were used as controls: non-stimulated elutriated human monocytes ($n = 3$) according to Poitevin *et al.* [13], cord blood endothelial colony-forming cells (cb-ECFCs; $n = 4$), cord blood CD34+ cells (cb-CD34+; $n = 3$) as previously described by Cucchini *et al.* in 2010 [14] and Pan T-, NK- and B-cell isolation kits (Miltenyi Biotec SA). Total RNA was extracted from 5×10^6 cells, using the RNeasy Mini kit (Qiagen). RNA was treated to eliminate any DNA contamination (DNase Invitrogen). Complementary DNA (cDNA) was synthesized using the high-capacity cDNA reverse transcriptase (RT) kit with RNase inhibitor (Applied Biosystems). TaqMan Custom Arrays (Format 48 P/N 4342253: 47 simultaneous real-time polymerase chain reactions [PCR] + 1 mandatory control; 8 samples per Card; Applied Biosystems) were used. The TaqMan array was designed on the flexible Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System. Of the 47 mRNAs, 39 mRNAs were actually analyzed, 5 mRNAs related to hemostasis were analyzed in a previous published study [7]; 3 mRNAs were not included in the analysis due to equivocal results. The following primers and Taqman probes (Applied Biosystems) are reported in Table VI, supplemental data. Each cDNA was assayed twice. The limit of detection of PCR is defined by a threshold cycle (C_t) > 35 . The cDNA levels were normalized to housekeeping genes (beta-2 microglobulin [B2M] and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [GAPDH]); reference gene stability analysis software packages GeNorm and NormFinder [15]. The limit of detection of $2^{-\Delta C_t}$ is $< 10^{-5}$. The $2^{-\Delta \Delta C_t}$ method was used to analyze the relative changes in gene expression from semiquantitative real-time PCR (qPCR) experiments [16]. The relative gene expression (RQ) was calculated in comparison to PB-CTPs, arbitrarily defined as equal to 1 [17]. Relative expression (RQ2) is expressed using the following formula: $RQ2 = -1/RQ$.

All assays were centralized on a unique platform except cytometry quantification of CD34+ cells and EPCs. Because these techniques were performed in two different laboratories, a reliability study was conducted and previously published [8].

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SAS software v8.0 (SAS Institute). For continuous variables, differences between groups were evaluated using the nonparametric Mann-Whitney test. Paired comparisons for continuous variables used non-parametric

Wilcoxon matched pairs test. For categorical variables, differences were assessed using chi-square or two-tailed Fisher exact tests, when the expected number was less than five. Quantitative variables were expressed as median (Med) and range (minimum-maximum) or Box and Whiskers plots (Medcalc version 7.3 software, <https://www.medcalc.org/>). The microarray data were statistically interpreted using a linear model for micro arrays (Limma) [18] (StatMiner qPCR Data Analysis Software, Integromics, PerkinElmer). The correlation between biological and/or clinical parameters used the non-parametric Spearman test. The statistically significant differences level was defined as $*P < 0.05$, $^{\dagger}P < 0.01$ and $^{\ddagger}P < 0.001$.

Results

Patient characteristics

CTPs were obtained from 40 patients included in the clinical trial: 20 BM-CTPs and 20 non-mobilized PB-CTPs. CTPs were harvested from 33 males and 7 females, with a median age of 70 years. Patients presented severe symptoms and had significant comorbidities (Table I): active smoking, diabetes mellitus,

arterial hypertension, dyslipidemia, overweight (25% of patients) and obesity (25% of patients).

Biological parameters on day 0 (baseline = before cell therapy) are reported in Table I. Sixty percent of patients had anemia and 10% had a hematocrit <30%. CLI patients presented a major inflammatory syndrome with high levels of IL-6 and CRP (72% of the patients and 64% higher than normal values, respectively). Patients with ulcers presented a higher inflammatory syndrome with high IL-6 (2.4-fold higher; $P = 0.01$) and CRP levels (5.4-fold higher; $P = 0.009$) in comparison with patients free of skin defect. Baseline circulating CD34+ cells/ μ L were 2.0 (0.4–5.7) and comparable between groups. Baseline plasmatic levels of pro-angiogenic (VEGF, CXCL12) and growth factors (G-CSF, sSCF) are shown in Table I. In the total population, pro-angiogenic factors and growth factors were mostly greater than normal range (56% of patients had a VEGF concentration within normal range), with a wide dispersion of values. On the opposite, GM-CSF was dramatically less than normal range (median concentration 14-fold less than usual values).

At baseline, there was no difference between the two groups, whatever the studied clinical or biological parameters.

Table I. Patient characteristics.

Characteristic	Group	
	BM (n = 20)	PB (n = 20)
Age (y)	71 (45–84)	65 (37–84)
Gender (male/female)	18/2	15/5
Body mass index (kg/m ²)	25 (20–32)	27 (19–42)
TcPO ₂ (mm Hg)	16 (1–43)	18 (1–74)
Presence of ulcers	8 (40%)	9 (45%)
Rest pain	17 (85%)	18 (90%)
Active smokers	16 (80%)	12 (60%)
Arterial hypertension	14 (70%)	13 (65%)
Hyperlipidemia	14 (70%)	8 (40%)
Diabetes mellitus	6 (30%)	4 (20%)
Hemoglobin (g/L)	127 (91–149)	124 (90–151)
WBCs ($\times 10^9$ /L)	7.8 (5.2–13.9)	7.8 (4.5–16.4)
CD34+ cells/ μ L	1.9 (0.4–3.9)	2.8 (0.9–5.7)
VEGF (pg/mL)	77 (21–1178)	110 (40–370)
<115 ^a		
CXCL12 (ng/mL)	3.4 (1.1–5.6)	2.9 (0.1–6.9)
1.6 (0.2–3.4) ^a		
sSCF (pg/mL)	7.6 (3.4–59)	3.4 (3.4–63.5)
4.6 (3.4–11.3) ^a		
G-CSF (pg/mL)	18.7 (8.1–69)	20.4 (5.7–69.4)
3.37 (0.99–22.2) ^a		
GM-CSF (pg/mL)	2.3 (2.3–3342)	4.0 (2.3–1357)
32.0 (7.0–769) ^a		
IL-6 (pg/mL)	5 (1–45)	8 (1–139)
<3.2 ^a		
CRP (mg/L)	6.6 (0.7–60)	10.6 (1.0–120)
<5 ^a		

Quantitative variables are expressed as median (range). Biologic markers measured in 40 NO-CLI patients on day 0 (baseline) before cell therapy.

WBCs, white blood cells.

^aNormal values as indicated by the manufacturer.

Influence of the patient status on the circulating CD34+ cell count at baseline

Circulating CD34+ cell count was negatively correlated with age ($r = -0.45$; $P < 0.02$). Among cardiovascular risk factors, high blood pressure and hyperlipidemia patients presented with a lower CD34+ cell count (2.2-fold lower, $P < 0.007$, and 2.0-fold lower, $P < 0.02$, respectively). CD34+ cell count is lower in patients presenting with an inflammatory syndrome (correlation with IL-6 plasma level $r = -0.39$; $P < 0.04$). Baseline hemoglobin level was inversely correlated with IL-6 plasma level ($r = -0.38$; $P = 0.03$) suggesting that some patients presented with an inflammatory anemia.

Cell characterization of BM and PB cell products

Mature cell subsets

Cell counts of mature cell subsets (including erythroblasts) in BM and PB cell products are presented in Table II. Total nucleated cells were 2.9-fold higher in PB-CTPs than in BM-CTPs. Platelets (PLTs), lymphocytes and monocytes were in significantly higher concentration in PB- than in BM-CTPs. CD2+ cells (T lymphocytes and NK cells) represent 44% (26–61) and 58% (32–71) in BM- and PB-CTPs, respectively, whereas CD19+ cells (B lymphocytes) represent 9% (3–16) and 6% (1–12), respectively.

Table II. Cell counts of BM- and PB-cell therapy products*.

Biologic variables		BM-CTPs (n = 20)	PB-CTPs (n = 20)	P ^a
PLTs:	($\times 10^9/L$)	712 (461–1214)	1541 (814–2652)	<0.0001
Total nucleated cells:	($\times 10^9/L$)	38 (18–71)	110 (48–187)	<0.0001
Total MNCs:	($\times 10^9/L$)	34 (11–52)	104 (45–186)	<0.0001
– Lymphocytes:	(%) ^b	50 (34–75)	61 (34–85)	
	($\times 10^9/L$)	18.0 (6.2–44.7)	65.6 (23.1–159.3)	<0.0001
– Monocytes:	(%) ^b	17 (9–27)	33 (14–59)	
	($\times 10^9/L$)	5.7 (2.1–12.4)	37.0 (11.3–80.9)	<0.0001
– Erythroblasts:	(%) ^b	7.4 (2.2–29)	None	
	($\times 10^9/L$)	3.4 (0.4–13.6)	None	
– Other cells ^c :	(%) ^b	5.7 (0–14.3)	None	
	($\times 10^9/L$)	2.2 (0–5.6)	None	
Mature granulocytes:	(%) ^b	16 (6–48)	6 (1–20)	
	($\times 10^9/L$)	6.4 (1.9–33.9)	8.0 (1.9–31.6)	NS

*BM- and PB-CTPs were implanted by 30 multiple IM injections into the gastrocnemius of the ischemic leg (1 mL per injection). Quantitative variables were expressed as median and range (minimum–maximum). NS, not significant.

^aNon-parametric Mann-Whitney test.

^bPercentage of nucleated cells.

^cOther cells: blasts, immature granulocytes and plasma cells.

Stem and progenitor cells

CD34⁺ stem cells, CD34⁺/VEGF-R2⁺ cells and EPCs were significantly higher in BM-CTPs than in PB-CTPs (8.9 fold, 3.9 fold and 5.3 fold, respectively; Table III). In the PB group, CD34⁺ cells in CTPs were significantly correlated with baseline circulating CD34⁺ cells ($r = 0.75$; $P = 0.007$). This was not the case in the BM group ($r = 0.46$; $P = 0.08$).

EPCs are very rare events (1 EPC of 8000 nucleated cells in BM-CTPs versus 1 EPC of 124,000 nucleated cells in PB-CTPs). Whatever the origin of cell products (BM or PB), a strong positive correlation was observed between CD34⁺/VEGF-R2⁺ and EPC quantifications ($r = 0.95$; $P = 0.0002$ in BM-CTPs; $r = 0.85$; $P = 0.0002$ in PB-CTPs).

Table III. Stem and progenitor cells in BM- and PB-CTPs*.

Biologic variables		BM-CTPs (n = 20)	PB-CTPs (n = 20)	P ^a
HSCs:				
CD34 ⁺ cells (%) ^b		2.25 (0.82–5.03)	0.09 (0.05–0.19)	<0.0001
CD34 ⁺ cells ($\times 10^6/mL$) ^c		0.98 (0.20–3.31)	0.11 (0.04–0.25)	<0.0001
Endothelial cells:				
CD34 ⁺ /VEGF-R2 ⁺ cells:				
CD34 ⁺ /VEGF-R2 ⁺ (%) ^b		0.015 (0.002–0.077)	0.0011 (0.0003–0.0044)	<0.0001
CD34 ⁺ /VEGF-R2 ⁺ /mL ^c		5895 (1415–33 483)	1500 (415–4600)	<0.0001
EPCs cells ^d :				
EPCs cells (%) ^b		0.015 (0.002–0.074)	0.0008 (0.0001–0.0024)	<0.0001
EPCs cells/mL ^c		4721 (943–27 642)	888 (207–3378)	<0.0001
CFU-EC:				
CFU-Hill number/mL ^c		1171 (124–4131)	2756 (586–5974)	0.03
Male: 35 \pm 35/mL of blood ^c				
Female: 26 \pm 23/mL of blood ^c				
MSCs:				
CFU-F number/1.10 ⁶ nucleated cells		34 (12–60)	9 (8–13)	0.0046
CFU-F number/mL ^c		1364 (274–4248)	965 (598–1363)	NS

*BM- and PB-CTPs were implanted by 30 multiple IM injections into the gastrocnemius of the ischemic leg (1 mL per injection). Quantitative variables were expressed as median and range (minimum–maximum).

^aNon-parametric Mann-Whitney test.

^bPercentage of nucleated cells.

^cThe blood cell separator was programmed to obtain a final volume of 40 mL CTPs (30 mL for autologous reinjection and 10 mL for controls and analyses).

^dEPCs were defined as CD34⁺/CD133⁺/VEGF-R2⁺ cells.

^ePeripheral blood-derived CFU-Hill colony frequencies in the general population (as indicated by the manufacturer).

CFU-ECs were quantified according to Hill *et al.* (CFU-Hill) [11] and characterized in FC (CD45+, CD14+, CD31+, VEGF-R2+, CD105+, CD34-; Figure 3A, supplemental data). They represent rare events (1 CFU-EC of 32 500 nucleated cells in BM-CTPs versus 1 CFU-EC of 40 000 nucleated cells in PB-CTPs). Absolute CFU-EC cell counts were 2.35-fold higher in PB-CTPs than in BM-CTPs (Table III; $P < 0.03$). In both CTPs, CFU-ECs were significantly correlated with monocytes; the correlation was stronger in PB-CTPs ($r = 0.85$; $P = 0.007$) than in BM-CTPs ($r = 0.60$; $P = 0.003$). CFU-ECs were not correlated with EPCs in either CTP.

Because MSCs have a pro-angiogenic potential, we looked for their presence in CTPs using CFU-F assay. CFU-F cells were characterized in FC (CD105+, CD90+, CD73+, CD34-, CD45-, CD11b-, HLA-DR-; Figure 3B, supplemental data). MSCs were present but extremely rare in both CTPs (1 MSCs of 28 000 nucleated cells in BM-CTPs versus 1 MSCs of 114,000 nucleated cells in PB-CTPs) with no significant difference in absolute count (Table III). A significant positive correlation between CD34+ cells and MSCs ($r = 0.64$; $P = 0.027$) was found in BM-CTPs.

Transcriptomic characterization of PB and BM cell products

The expression of 37 genes of interest was quantified using simultaneous real-time PCR. In Figure 1, they were classified in eight categories (A, angiogenic growth factors; B, angiogenic targets; C, endothelial markers; D, angiogenic inhibitors; E, hematopoietic growth factors + interleukins + hematopoietic markers + matrix metalloproteinases [MMPs]) + transcription factor HIF1A and arranged in decreasing levels of expression.

Table IV shows the relative transcriptomic profile of BM-CTPs in comparison with PB-CTPs. For this, RQ2 in PB-CTPs were defined as equal to 1. Three genes (namely, ANGPT2, THBS2 and G-CSF) were not detected in either CTPs (see acronym meaning in Table VI, supplemental data). Figure 1 and Table IV clearly indicate that most expressed genes (i.e., 25 of 34 genes) were quantified at a significantly higher level in BM-CTPs in comparison with PB-CTPs. BM-CTPs expressed significantly a higher level of angiogenic growth factors (especially CXCL12; 843-fold higher), angiogenesis targets (especially KIT, alternatively named CD117), endothelial markers (especially VCAM1; 300-fold higher) and MMPs. BM-CTPs expressed higher levels of angiogenic inhibitors (THBS1 and TIMP3) and proinflammatory cytokines than PB-CTPs. Nine genes were expressed in a comparable way in both CTPs (PDGFA, PDGFB,

KITLG, FGF2, PDGF-RB, VEGF-R3, PECAM1, NOS3 and TIMP2). One single gene, namely, CD14, a monocytic marker, was significantly more expressed in PB-CTPs. HIF-1A expression in either CTP was not correlated with any other studied genes. When interpreting these results, one has to keep in mind that the numbers of total nucleated cells were 2.9-fold higher in PB-CTPs than in BM-CTPs.

Purified mature (unstimulated monocytes, T cells and NK cells [CD2+], B cells [CD19+]) hematopoietic cells (cb-CD34+) cells and cb-ECFCs were compared with PB-CTPs (Table IV). The transcriptomic profile of BM-CTPs presents similarities with the CD34+ cell-transcriptomic profile and, to a lesser extent, with the cb-ECFC-transcriptomic profile. As expected, angiogenic targets and endothelial markers were significantly more expressed in cb-ECFCs than in CTPs. cb-CD34+ cells expressed significant levels of angiogenic growth factors (particularly ANGPT1) and angiogenic targets (especially KIT and TEK, alternatively named Tie-2) as well as cytokines and MMPs. In contrast, mature cells (monocytes, T cells, NK cells and B cells) expressed heterogeneous profiles with a relatively lower expression level in comparison with progenitor cells and BM-CTPs. Lymphocytes expressed a significant level of angiogenesis target CXCR4.

Taken together, these results indicate a higher pro-angiogenic potential of BM-CTPs, in comparison with PB-CTPs. In spite of the fact that CD34+ cells are rare events in BM-CTPs (Table III), these cells may have a significant impact on the transcriptomic profile of BM-CTPs.

Influence of the patient status on the characteristics of CTPs

The influence of background factors in clinical patients and biological parameters on the characteristics of CTPs was analyzed (Table V). Age is significantly and inversely correlated with HSCs and MSCs. In contrast, EPCs, CD34+/VEGF-R2+ and CFU-ECs were not correlated with age. The presence of ulcers was associated with an inflammatory syndrome at baseline (defined by an elevation of CRP and IL-6) and correlated with the EPC concentration in both CTPs. BM-CTPs obtained from anemic patients presented with a transcriptomic profile characterized by the up-regulation of some angiogenic factors (HGF, IGF1, FGF2 and SCF) and targets (VEGF-R1 and VEGF-R2), endothelial makers (PECAM1, VCAM1 and NOS3) and TIMPs.

Clinical outcome

The clinical trial design was not aimed at comparing both products in terms of efficacy. However, the

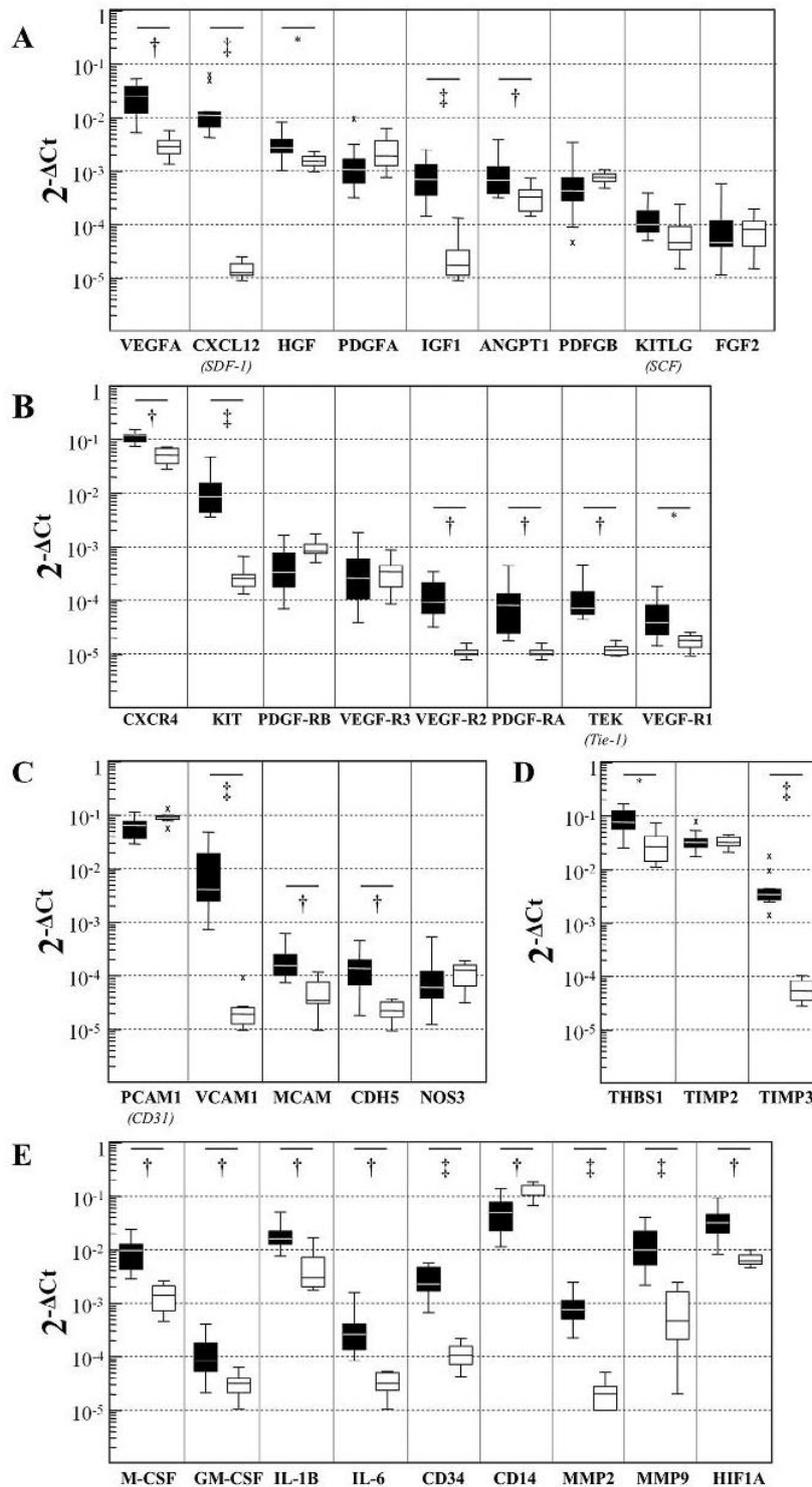


Figure 1. Transcriptomic of CTPs' profiles. mRNA expression of 37 genes of interest were quantified using simultaneous real-time RT-qPCR experiments in BM-CTPs (black box, n = 11) and PB-CTPs (empty box, n = 11). Three genes (namely ANGPT2, THBS2 and G-CSF) were not detected in either CTPs. The genes of interest were classified in 8 categories (A, angiogenic growth factors; B, angiogenic targets; C, endothelial markers; D, angiogenic inhibitors; E, hematopoietic growth factors + interleukins + hematopoietic markers + MMPs) + transcription factor HIF1A and arranged in decreasing levels of expression. x, aberrant distribution values as indicated by Box and Whiskers plots Medcalc version 7.3 software. The statistically significant differences level was defined as * $P < 0.05$, † $P < 0.01$ and ‡ $P < 0.001$.

Table IV. Transcriptomic profiles of CTPs and cells controls (relative expression in reference to PB-CTPs).

		cb-ECFCs	cb-CD34+ cells	BM-CTPs	PB-CTPs	Monocytes	T cells	NK cells	B cells	
Angiogenic growth factors	VEGFA	-0.9	3.5	7.3	1	0.6	0.1	0.2	0.8	
	CXCL12	4.1	15.7	843	1					
	HGF	-8.3	5.9	2.0	1	0.3	-17.1		-8.1	
	PDGFA	3.4	-0.6	-1.4	1	-49	1.4	-3.8	-2.9	
	IGF1	2.0	20	32	1	-1.6	1.5	-1.5	3.3	
	ANGPT1	1.3	151	3.1	1	-1.2	2.1	-9.8	-3.8	
	PDGFB	20	-0.7	-1.4	1	-26	6.0	-2.8	-1.6	
	KITLG	55	3.3	2.3	1	-5.4	-1.2	-4.3	1.2	
Angiogenesis targets	FGF2	249	2.7	1.1	1					
	CXCR4	-125	0.3	2.2	1	-6.2	7.5	4.5	14.3	
	KIT	3.5	931	48	1	-6.6	4.5	17	-2.9	
	PDGF-RB	-15	-1.0	-2.5	1		-4.1	2.7	-1.2	
	VEGF-R3	4.3	2.5	-1.0	1		22.9	-5.7	1.3	
	VEGF-R2	7692	22	10.6	1					
	PDGF-RA	3.8	14.6	5.9	1					
	TEK	2347	470	8.9	1					
Endothelial markers	VEGF-R1	153	73	2.8	1		17.6	-1.3	58.2	
	PECAM1	7.6	1.6	-1.6	1	1.5	-2.7	-2.4	-1.3	
	VCAM1	99.3	11.4	300	1					
	MCAM	6050	25	4.2	1		2.2	-2.2	1.6	
	CDH5	10837	104	6.3	1	2.4	1.4	-1.6	3.1	
	NOS3	30.3	2.7	1.0	1	-3.8	7.1	-2.4	-1.4	
	THBS1	38	-0.4	3.4	1	-0.2	-3.6	-4.7	-8.0	
	TIMP2	2.8	1.5	1.0	1	1.8	-12.6	-23.3	-3.2	
Angiogenic inhibitors	TIMP3	16.1	640	82	1	-4.0	6.4	3.3	3.6	
	M-CSF	7.6	23	7.7	1	-7.3	5.6	-1.4	1.0	
	GM-CSF	3.2	3.7	3.5	1		3.4	5.6	2.5	
	IL-1B		33	3.5	1	-5.6	-3.2		17.8	
	IL-6	140	10	6.8	1	-3.0	-1.0		560	
	Hematopoietic markers	CD34	72	2762	30	1		-1.3		-1.4
		CD14	-1829	-22	-3.0	1	0.2	-1073	-2662	-11.8
	MMP	MMP2	15890	384	48	1	1.0	18.7	-1.3	3.7
MMP9			11.2	20	1	-14.1	26.7	-6.7	2.2	
Transcription factor	HIF1A	6.6	14.9	3.9	1	2.6	2.8	1.6	6.6	

White rectangle: non-detected gene expression (Ct > 35).

RQ2: relative gene expression data (RQ2 = -1/RQ; see Material and Methods).

$RQ2 \leq -2$  $P < 0.05$.
 $-2 < RQ2 \leq +2$  $P < 0.05$.
 $RQ2 \geq 2$  $P < 0.05$.

*The micro-array data were statistically interpreted using a linear model for micro-arrays (Limma).

Table V. Influence of the patient status at baseline on the characteristics of CTPs.

Variables		CTPs	r^s	P
Age:	CD34+ cells (x10 ⁹ /L)	BM-	-0.51	0.004 ^a
	CD34+ cells (x10 ⁹ /L)	PB-	-0.46	0.004 ^a
	MSCs (CFU-F/mL)	BM-	-0.47	0.01 ^a
Presence of ulcers:	Patients with ulcers presented: a higher EPCs concentration in their CTPs:			
	1.9-fold higher	BM-		0.04 ^b
Inflammatory syndrome	2.1-fold higher	PB-		0.049 ^b
	EPCs/mL of CTPs	BM-	+0.51	0.049 ^a
IL-6 plasma levels:				
Anemia:	HGF, IGF1, FGF2, SCF, PECAM1, TIMP2, TIMP3 mRNA expression	BM-	-0.60 to -0.72	<0.05 ^a
Hemoglobin:	VEGF-R2, VEGF-R1, VCAM1, NOS3 mRNA expression	BM-	-0.77 to -0.91	<0.01 ^a

^aNon-parametric Spearman test.^bNon-parametric Mann-Whitney test.

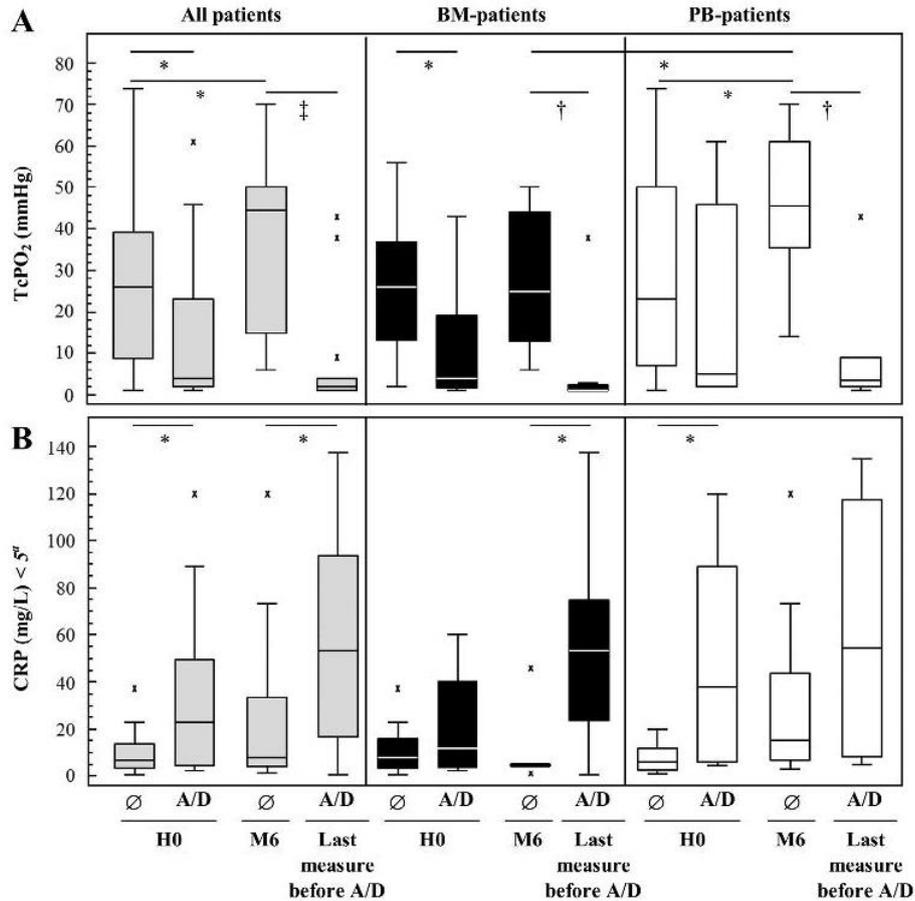


Figure 2. Predictive factors of favorable outcome. TcPO₂ (A) and CRP serum level (B) values at baseline (H0) and 6 months (M6) after IM implantation were measured: all patients (grey box), BM-CTPs patients (black box) and PB-CTPs patients (empty box). Ø, Patients alive without any major amputation 6 months after cell therapy; all patients (n = 26); BM patients (n = 12); PB patients (n = 14). A/D, patients amputated or died within 6 months; all patients (n = 14); BM patients (n = 8): 6 amputated at 47 (9–92 days), and 2 died at 82 and 156 days; PB patients (n = 6); 5 amputated at 46 (7–169) days, and 1 died at 145 days. x, aberrant distribution values as indicated by Box and Whiskers plots Medcalc version 7.3 software. *Normal values as indicated by the manufacturer. Non-parametric Wilcoxon matched pairs test (H0 versus M6). Otherwise non-parametric Mann-Whitney (for non-matched values). The statistically significant differences level was defined as * $P < 0.05$, † $P < 0.01$ and ‡ $P < 0.001$.

administration of CTPs was associated with a favorable outcome in some patients: after 6 months, 12 of 20 patients were alive without any major amputation in the BM group versus 14 of 20 patients in the PB group. The presence of neutrophils in PB-CTPs was associated with poor outcome in this subgroup of patients. Absolute neutrophils counts in PB-CTPs were 2.3-fold higher in patients with unfavorable outcome ($3.5 [0.8–9.5] \times 10^8$) than in patients with favorable outcome ($1.5 [0.6–4.8] \times 10^8$; $P = 0.047$). The other parameters of CTP characterization were not associated with clinical outcome. In contrast, patients with favorable 6-month outcome presented with significantly 6.5-fold higher baseline TcPO₂ ($P = 0.034$; Figure 2A) and 3.3-fold lower baseline CRP ($P = 0.038$; Figure 2B). Interestingly, TcPO₂ improved at 6 months in patients alive without any major

amputation after PB-CTP treatment (2.0-fold higher; $P = 0.040$). This was not the case in the BM group.

Discussion

Cell therapy is considered as a therapy of last resort in no-option CLI patients. In spite of the fact that meta-analyses of clinical trials concluded on the beneficial effect on limb salvation [3,4], the efficacy remains controversial [19]. A major issue today is to clarify the mechanism of action of CTPs. Surprisingly, CTPs are poorly described in terms of cell composition and molecular content. In an autologous situation, the quality of CTPs is obviously dependent on the characteristics of the patient at the time of the harvest. The CLI population is elderly and experiences many cardiovascular risk factors known to influence angiogenesis

potential [20,21]. A clinical trial gave us the opportunity to perform an extensive biological characterization of two different CTPs. BM can be considered as “a gold standard” because it was used by the founder trial [2]. However, cytappheresis is a valuable alternative because it is easier to handle and non-invasive. The protocols of cytappheresis are widely variable in terms of mobilization procedure and cell selection [3,4,22]. In our trial, cytappheresis was performed without any step of mobilization to avoid any side effects such as bone pain, arthralgia and thrombosis [5].

In this autologous situation, we first evaluated the angiogenic profile of CLI patients before the CTP harvest. As expected, these patients presented current cardiovascular risk factor and a pro-inflammatory status at the time of CTP collection. The baseline profile of patients was characterized by a low count of circulating CD34+ cells in spite of high plasmatic concentrations of G-CSF. CD34+ cell count was negatively correlated with age, in agreement with reported studies [23,24]. The baseline elevation of VEGF and CXCL12 is in line with publications that reported the elevation of these factors in patients with PAD [25] and CLI [24]. In physiopathology, it is known that VEGF and CXCL12 are stimulated by hypoxia [26]. Surprisingly, our study points out the very low concentration of GM-CSF, a growth factor currently used for mobilization, to improve walking distance in patients with PAD [27].

Different approaches were used to characterize CTPs. The first approach was to evaluate and characterize the number of stem and progenitor cells. To the best of our knowledge, this is the first study that evaluates simultaneously the count of HSCs, EPCs, CFU-EC and MSCs. The literature largely reported on the CD34+ cells content in BM-CTPs and more rarely in PB-CTPs, in that latter case mostly obtained after mobilization. Our results are in agreement with the literature [6,28] and show that CD34+ cell content is 8-fold higher in BM-CTPs than in (non-mobilized) PB-CTPs. The rarity of CD34+ cells in CTPs is at least partly explained by the age of patients and cardiovascular risk factors. A recent meta-analysis [3] concluded that CD34+ count in CTPs was not correlated with efficacy. Another publication [22] suggested to use CD34+ cell count as an indicator of the apheresis quality.

We next quantified CD34+/VEGF-R2+ cells and EPCs. CD34+/VEGF-R2+ and EPCs were significantly higher in BM-CTPs than in PB-CTPs. These results are difficult to compare with the published studies [29–31] in the absence of FC standardization and of consensus of EPC definition. Furthermore, the quantification of EPCs is a biological challenge due to their rarity. Still, it seems relevant to quantify EPCs in CTPs because these cells have the capacity of homing to the site of tissue injury and participate in the formation of

new vessels [32]. EPCs have a paracrine effect on angiogenesis in secreting pro-angiogenic cytokines and growth factors [33]. In contrast to EPCs, CFU-ECs were higher in PB-CTPs than in BM-CTPs. Interestingly, CFU-ECs dramatically express CD14+, a monocytic marker. Monocytes were also significantly more abundant in PB-CTPs than in BM-CTPs and correlated with CFU-ECs. We hypothesize that non-mobilized cytappheresis may select a sub-population of CD14+ cells, which have the capacity to form CFU-ECs. Moreover, these cells are known to exhibit a strong paracrine potential and have been shown to support the activity of ECFCs [34,35].

Because MSCs have a pro-angiogenic potential, we looked at their presence in CTPs. We found the presence of CFU-F in both CTPs. This range is comparable with CFU-EC. The frequency of MSCs in human BM is estimated to be 1 of 100,000 cells [36]. The procedure of apheresis may, therefore, enrich CTPs in MSCs.

Our study gives striking evidence of major differences between CTPs related to content and distribution of mature blood cells, with a huge heterogeneity in their composition. The presence of mature cells in CTPs should not be underestimated because they may significantly modulate their angiogenic potential. Indeed, the paracrine effect of monocytes [22,37], lymphocytes [38] and platelets [39,40] is well established. In published studies, if the count of MNCs is currently given, the presence of neutrophils is totally ignored. Our data clearly show that CTPs contain a high level of granulocytes, which are predictive of unfavorable outcome. These cells are worthwhile to consider because they may play a deleterious role after implantation of CTPs inducing endothelial injury via the release of cytotoxic products [41].

The second approach was to determine the transcriptomic profile of CTPs. Two previous studies used the same methodology but analyzed a limited number of genes [29,42]. In agreement with our results, Yamamoto *et al.* reported a higher level of EPC-specific molecule expression in BM-CTPs in comparison with peripheral blood-derived MNCs [29]. The originality of our approach was to compare the transcriptomic profiles with well-defined, relevant cell types. The transcriptomic profile of BM-CTPs is quite comparable with cb-ECFCs and CD34+ cells. This suggests that, in spite of their rarity, these cells significantly influence the transcriptomic profile. PB-CTPs share common gene expression with purified monocytes. The comparison of the transcriptomic profiles of both CTPs pointed out the major differences of CXCL12 and VCAM-1. This is consistent with the fact that these molecules are strongly expressed by medullar stromal cells and play a major role in the mobilization of stem progenitor cells [26].

The transcriptomic profiling confirms the large inter-individual heterogeneity observed in both BM- and PB-CTPs and the probable influence of cardiovascular risk factors [20,21,43]. It emphasizes the major impact of age on the quality of either CTP, in agreement with published data [36,44,45]. The presence of ulcers and of an inflammatory syndrome was associated with an increase in EPCs. This is in agreement with the fact that IL-6 increases the mobilization, the migration and the proliferation of EPCs [46,47].

Taken together, these results show that cardiovascular risk factors and associated co-morbidities deeply influence both circulating CD34+ cells and CTPs characteristics. The extensive characterization of CTPs indicates that BM, considered as “the gold standard,” has the richest content in terms of stem cells and transcriptome. However, the invasiveness of the collection procedure in otherwise fragile patients encourages work on new cell products [26,33,48]. Furthermore, the outcome of patients did not differ in terms of amputation rate and mortality. The clinical trial was not designed to compare both protocols in terms of efficacy (no randomization, no placebo group, limited size). However, the surrogate marker TcPO₂ was significantly improved in PB patients at 6 months. With either CTP, baseline CRP or TcPO₂ were found to be predictive of a clinical outcome. In spite of the fact that BM-CTPs were significantly richer in stem and progenitor cells than PB-CTPs, their administration was not associated with a more favorable outcome. Transcriptomic profiling of CTPs allows a highly accurate characterization of CTPs. This approach is limited by the fact that platelets, which are numerous in CTPs and are known to bring proangiogenic properties, are not analyzed by this method.

Taken together, these results point out the importance of the patient's status and the limits of autologous cell therapy. In this respect, an allogeneic strategy using MSCs would avoid this pitfall, with interesting immunomodulatory properties [49] and pro-angiogenic potential.

In summary, it is a major issue to characterize the quality of CTPs to improve our understanding of the mechanism of action of cell therapy in CLI. Transcriptomic profiling brings comprehensive information in addition to classical evaluation of cell characterization.

Acknowledgments

This study was funded by a clinical research hospital program grant (French Ministry of Health, PHRC 2003). The authors appreciated the contribution of J.-C. Capiod, C. Mac , A. Dupont, A.-M. Delloup, C. Nguyen, P. Cornillet, H. Moret (PRBI platform, Reims,

France), E. Jacquet and R. Barbet (Q-PCR platform Imagif, Gif sur Yvette, France).

Disclosure of interests: The authors have no commercial, proprietary or financial interest in the products or companies described in this article.

References

- [1] Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG, et al. Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2007;33(Suppl. 1):S1–75.
- [2] Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, et al. 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.
- [3] Ai M, Yan CF, Xia FC, Zhou SL, He J, Li CP. Safety and efficacy of cell-based therapy on critical limb ischemia: a meta-analysis. *Cytotherapy* 2016;18(6):712–24.
- [4] Liew A, Bhattacharya V, Shaw J, Stansby G. Cell therapy for critical limb ischemia: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Angiology* 2016;67(5):444–55.
- [5] Benoit E, O'Donnell TF, Patel AN. Safety and efficacy of autologous cell therapy in critical limb ischemia: a systematic review. *Cell Transplant* 2013;22(3):545–62.
- [6] Wang ZX, Li D, Cao JX, Liu YS, Wang M, Zhang XY, et al. Efficacy of autologous bone marrow mononuclear cell therapy in patients with peripheral arterial disease. *J Atheroscler Thromb* 2014;21(11):1183–96.
- [7] Tournois C, Pignon B, Sevestre MA, Djerada Z, Capiod JC, Poitevin G, et al. Critical limb ischemia: thrombogenic evaluation of two autologous cell therapy products and biologic profile in treated patients. *Transfusion* 2015;55(11):2692–701.
- [8] Capiod JC, Tournois C, Vitry F, Sevestre MA, Daliphard S, Reix T, et al. 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.
- [9] Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother* 1996;5(3):213–26.
- [10] Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000;95(3):952–8.
- [11] Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003;348(7):593–600.
- [12] Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976;4(5):267–74.
- [13] Poitevin S, Garnotel R, Antonicelli F, Gillery P, Nguyen P. Type I collagen induces tissue factor expression and matrix metalloproteinase 9 production in human primary monocytes through a redox-sensitive pathway. *J Thromb Haemost* 2008;8(9):1586–94.
- [14] Cucuini W, Poitevin S, Poitevin G, Dignat-George F, Cornillet-Lefebvre P, Sabatier F, et al. Tissue factor up-regulation in proinflammatory conditions confers thrombin generation capacity to endothelial colony-forming cells without influencing non-coagulant properties *in vitro*. *J Thromb Haemost* 2010;8(9):2042–52.

- [15] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3(7):1–12.
- [16] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001;25(4):402–8.
- [17] Willems E, Leyns L, Vandesompele J. Standardization of real-time PCR gene expression data from independent biological replicates. *Anal Biochem* 2008;379(1):127–9.
- [18] Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004;3:Article3. [Epub 2004 Feb 12].
- [19] Peeters Weem SM, Teraa M, de Borst GJ, Verhaar MC, Moll FL. Bone marrow derived cell therapy in critical limb ischemia: a meta-analysis of randomized placebo controlled trials. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2015;50(6):775–83.
- [20] Dimmeler S, Leri A. Aging and disease as modifiers of efficacy of cell therapy. *Circ Res* 2008;102(11):1319–30.
- [21] Hung HS, Shyu WC, Tsai CH, Hsu SH, Lin SZ. Transplantation of endothelial progenitor cells as therapeutics for cardiovascular diseases. *Cell Transplant* 2009;18(9):1003–12.
- [22] Lawall H, Bramlage P, Amann B. Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease. A critical appraisal. *Thromb Haemost* 2010;103(4):696–709.
- [23] Fadini GP, de Kreutzenberg SV, Coracina A, Baesso I, Agostini C, Tiengo A, et al. Circulating CD34+ cells, metabolic syndrome, and cardiovascular risk. *Eur Heart J* 2006;27(18):2247–55.
- [24] Teraa M, Sprengers RW, Westerweel PE, Gremmels H, Goumans MJ, Teerlink T, et al. Bone marrow alterations and lower endothelial progenitor cell numbers in critical limb ischemia patients. *PLoS ONE* 2013;8(1):e55592.
- [25] Makin AJ, Chung NA, Silverman SH, Lip GY. Vascular endothelial growth factor and tissue factor in patients with established peripheral artery disease: a link between angiogenesis and thrombogenesis? *Clin Sci* 2003;104(4):397–404.
- [26] Silvestre JS, Smadja DM, Levy BI. Postischemic revascularization: from cellular and molecular mechanisms to clinical applications. *Physiol Rev* 2013;93(4):1743–802.
- [27] Domanchuk K, Ferrucci L, Guralnik JM, Criqui MH, Tian L, Liu K, et al. Progenitor cell release plus exercise to improve functional performance in peripheral artery disease: the PROPEL Study. *Contemp Clin Trials* 2013;36(2):502–9.
- [28] Sugihara S, Yamamoto Y, Matsubara K, Ishida K, Matsuura T, Ando F, et al. Autoperipheral blood mononuclear cell transplantation improved giant ulcers due to chronic arteriosclerosis obliterans. *Heart Vessels* 2006;21(4):258–62.
- [29] Yamamoto K, Kondo T, Suzuki S, Izawa H, Kobayashi M, Emi N, et al. Molecular evaluation of endothelial progenitor cells in patients with ischemic limbs: therapeutic effect by stem cell transplantation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(12):e192–6.
- [30] Lasala GP, Silva JA, Gardner PA, Minguell JJ. Combination stem cell therapy for the treatment of severe limb ischemia: safety and efficacy analysis. *Angiology* 2010;61(6):551–6.
- [31] Teraa M, Sprengers RW, van der Graaf Y, Peters CE, Moll FL, Verhaar MC. Autologous bone marrow-derived cell therapy in patients with critical limb ischemia: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Ann Surg* 2013;258(6):922–9.
- [32] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275(5302):964–7.
- [33] Asahara T, Kawamoto A, Masuda H. Concise review: circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine. *Stem Cells* 2011;29(11):1650–5.
- [34] Yoon CH, Hur J, Park KW, Kim JH, Lee CS, Oh IY, et al. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation* 2005;112(11):1618–27.
- [35] Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(2):288–93.
- [36] Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 2007;213(2):341–7.
- [37] Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003;107(8):1164–9.
- [38] Hur J, Yang HM, Yoon CH, Lee CS, Park KW, Kim JH, et al. Identification of a novel role of T cells in postnatal vasculogenesis: characterization of endothelial progenitor cell colonies. *Circulation* 2007;116(15):1671–82.
- [39] Stellos K, Gawaz M. Platelet interaction with progenitor cells: potential implications for regenerative medicine. *Thromb Haemost* 2007;98(5):922–9.
- [40] Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2011;105(Suppl. 1):S13–33.
- [41] Iba O, Matsubara H, Nozawa Y, Fujiyama S, Amano K, Mori Y, et al. Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs. *Circulation* 2002;106(15):2019–25.
- [42] Oda M, Toba K, Kato K, Ozawa T, Yanagawa T, Ikarashi N, et al. Hypocellularity and insufficient expression of angiogenic factors in implanted autologous bone marrow in patients with chronic critical limb ischemia. *Heart Vessels* 2012;27(1):38–45.
- [43] Fadini GP, Avogaro A, Agostini C. Critical assessment of putative endothelial progenitor phenotypes. *Exp Hematol* 2007;35(10):1479–80.
- [44] Geiger H, Denking M, Schirmbeck R. Hematopoietic stem cell aging. *Curr Opin Immunol* 2014;29:86–92.
- [45] Childs BG, Durik M, Baker DJ, van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med* 2015;21(12):1424–35.
- [46] Fan Y, Ye J, Shen F, Zhu Y, Yeghiazarians Y, Zhu W, et al. Interleukin-6 stimulates circulating blood-derived endothelial progenitor cell angiogenesis *in vitro*. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008;28(1):90–8.
- [47] Tousoulis D, Andreou I, Antoniadis C, Tentolouris C, Stefanadis C. Role of inflammation and oxidative stress in endothelial progenitor cell function and mobilization: therapeutic implications for cardiovascular diseases. *Atherosclerosis* 2008;201(2):236–47.
- [48] Suzuki J, Shimamura M, Suda H, Wakayama K, Kumagai H, Ikeda Y, et al. Current therapies and investigational drugs for peripheral arterial disease. *Hypertens Res* 2016;39(4):183–91.
- [49] El Omar R, Xiong Y, Dostert G, Louis H, Gentils M, Menu P, et al. Immunomodulation of endothelial differentiated mesenchymal stromal cells: impact on T and NK cells. *Immunol Cell Biol* 2016;94(4):342–56.

Appendix: Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at doi:10.1016/j.jcyt.2016.10.013.

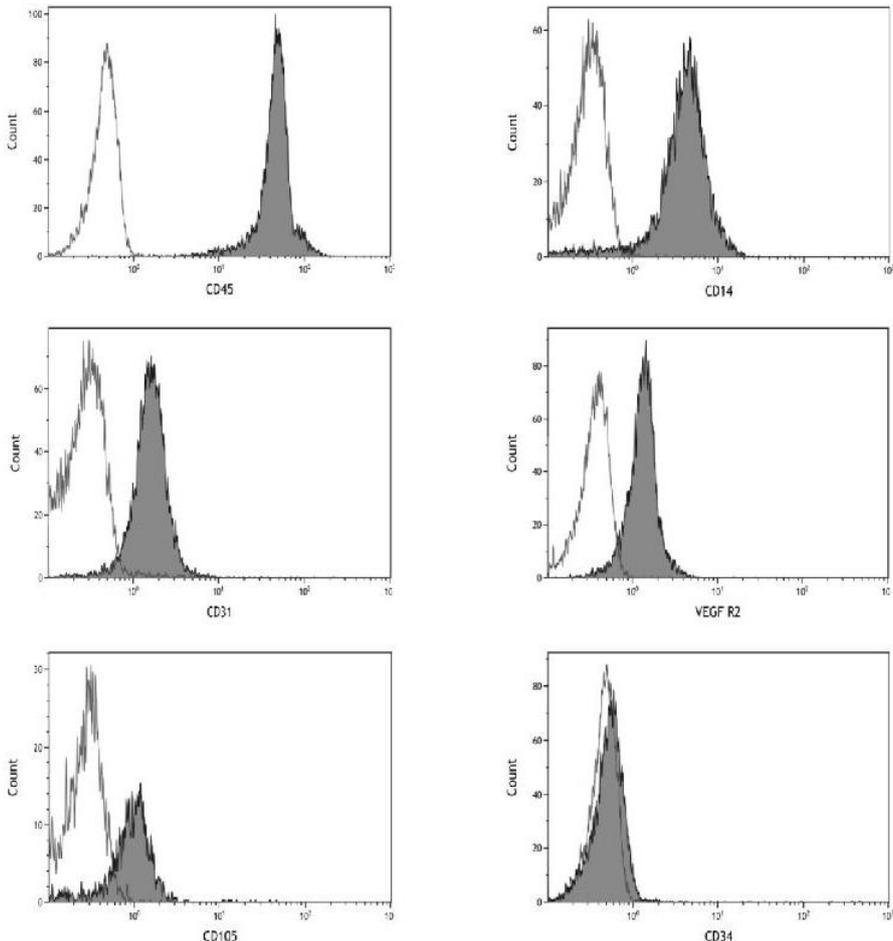
Table VI. Taqman probes (Applied Biosystems) (Supplemental Data)

HGNC approved gene symbol	Titles and alternative titles (Symbols)	Taqman probes (Applied Biosystems)
ANGPT1	Angiopoietin 1 or ANG1	Hs00181613_m1
ANGPT2	Angiopoietin 2 or ANG2	Hs01048042_m1
B2M	Beta-2 microglobulin	Hs99999907_m1
CD14	Monocyte differentiation antigen	Hs00169122_g1
CD34	Hematopoietic progenitor cell	Hs00990732_m1
CDH5	VE-Cadherin, Vascular endothelial, CD144	Hs00174344_m1
CSF1	Colony stimulating factor-1, Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)	Hs00174164_m1
CSF2	Colony stimulating factor-2, Granulocyte- Macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)	Hs00929873_m1
CSF3	Colony stimulating factor-3, Granulocyte- colony-stimulating factor (G-CSF)	Hs99999083_m1
CXCL12	Chemokine, CXC motif, Ligand 12, Stromal-cell-derived factor-1 (SDF-1), Pre-B Cell growth-stimulating factor (PBSF)	Hs00171022_m1
CXCR4	Chemokine, CXC motif, receptor 4, LPS-associated protein-3, CD184	Hs00976734_m1
FGF2	Fibroblast growth factor 2, Fibroblast growth factor basic (FGFB)	Hs00266645_m1
FLT1	FMS-like tyrosine kinase 1, Vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGF-R1)	Hs00176573_m1
FLT4	FMS-like tyrosine kinase 4 (FLT4), Vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGF-R3)	Hs00176607_m1
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase (GAPD)	Hs99999905_m1
HGF	Hepatocyte growth factor , Hepatopoietin A	Hs00300159_m1
HIF1A	Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit	Hs00936371_m1
IGF1	Insulin-like growth factor-1, Somatomedin C	Hs01547656_m1
IL-1B	Interleukin-1beta	Hs01555410_m1
IL-6	Interleukin-6	Hs0174131_m1
KDR	Kinase insert domain receptor, Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGF-R2), CD309	Hs00176676_m1
KIT	v-KIT Hardy-Zuckerman feline sarcoma viral oncogene homolog, Stem cell factor receptor (SCF-R), CD117	Hs00174029_m1
KITLG	KIT ligand, Stem cell factor (SCF), Mast cell growth factor	Hs00241497_m1
MCAM	Melanoma adhesion molecule (CD146)	Hs00174838_m1
MMP2	Matrix metalloproteinase 2, Collagenase type IV-A, Gelatinase A	Hs00234422_m1
MMP9	Matrix metalloproteinase 9, Collagenase type IV-B, Gelatinase B	Hs00957555_m1
NOS3	Nitric oxide synthase 3, Nitric oxide synthase endothelial (eNOS)	Hs00167166_m1
PDGFA	Platelet-derived growth factor, alpha polypeptide	Hs00234994_m1
PDGFB	Platelet-derived growth factor, beta polypeptide	Hs00234042_m1
PDGFRA	Platelet-derived growth factor receptor, alpha, CD140a	Hs00183486_m1

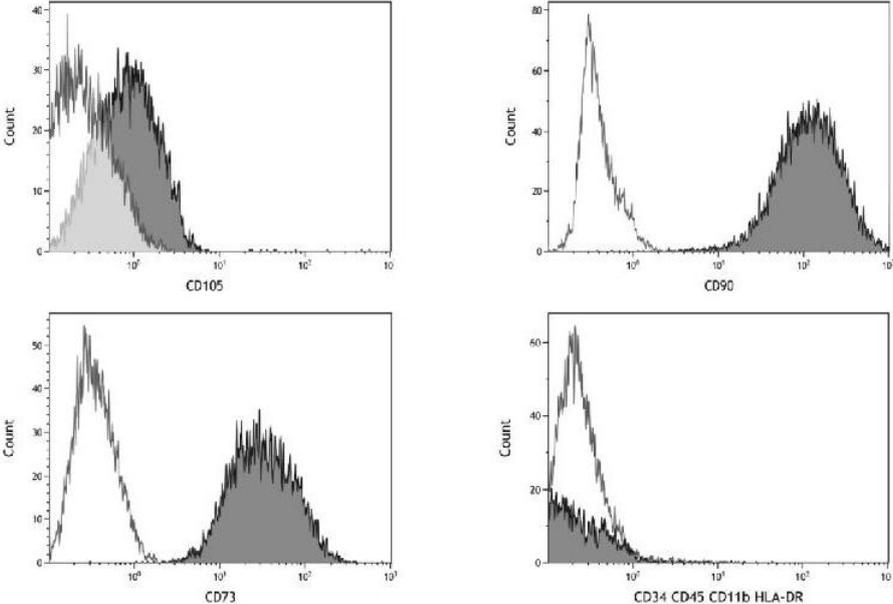
PDGFRB	Platelet-derived growth factor receptor, beta, CD140b	Hs00182163_m1
PECAM1	Platelet endothelial cell adhesion molecule 1, CD31	Hs01065279_m1
TEK	Tyrosine Kinase, endothelial, Protein receptor tyrosine kinase, epithelial-specific, (Tie-2), CD202b	Hs00176096_m1
THBS1	Trombospondin 1 (TSP-1)	Hs00170236_m1
THBS2	Trombospondin 2 (TSP-2)	Hs00170248_m1
TIMP2	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	Hs01091319_m1
TIMP3	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3	Hs00927216_m1
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1, CD106	Hs00174239_m1
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A, VEGF165 isoform	Hs00173626_m1

Figure 3. Characterization of CFU-EC and CFU-F by flow cytometry (Supplemental Data).

A



B



VIII. ARTICLE 2

IN VIVO EFFICACY OF ENDOTHELIAL LIKE MESENCHYMAL STEM CELLS DERIVED FROM PATIENTS WITH CRITICAL LIMB ISCHEMIA

Rida Al-Rifai,¹ Philippe Nguyen,^{1,2} Nicole Bouland,³ Christine Terryn,⁴ Lukshe Kanagaratnam,⁵ Gaël Poitevin,¹ Caroline François,¹ Catherine Boisson-Vidal,⁶ Marie-Antoinette Sevestre,⁷ and Claire Tournois,^{1,2}

¹ EA-3801, SFR CAP-santé, Université de Reims Champagne-Ardenne, France.

² Laboratoire d'Hématologie, CHU Robert Debré, Reims, France.

³ Laboratoire d'anatomopathologie, Université de Reims Champagne-Ardenne, France

⁴ Plateform PICT, Université de Reims Champagne Ardenne, Reims, France.

⁵ Unité d'aide méthodologique CHU Robert Debré, Reims, France.

⁶ Inserm UMR S1140, Université René Descartes, Paris V, France.

⁷ Service de Médecine Vasculaire, CHU, Amiens, France.

Introduction :

Dans les protocoles initiaux des études précliniques de TC, des BM-MNCs ou des PB-MNCs (également regroupés sous le nom plus général de BM ou PB-CTPs pour « *Cell therapy products* ») d'individu jeune et dépourvu de pathologies artérielles étaient injectées avec succès dans le mollet ischémié des rongeurs. Or, les cellules injectées dans les essais cliniques sont d'origine autologue et constituent une étape limitante au succès de la TC pro-angiogénique. Effectivement, la majorité des essais cliniques de TC dans l'ICMI a exploité des cellules autologues dérivées de la MO (BMCs pour "*Bone marrow derived cells*") et a émis des résultats plus mitigés. Cela pourrait être imputable aux facteurs de risque cardiovasculaire et au syndrome inflammatoire délétère présent chez ces patients « *NO-option* » impactant la fonctionnalité de leurs cellules médullaires. Il est donc nécessaire aujourd'hui de **revenir aux études précliniques** afin de trouver de nouvelles **stratégies thérapeutiques**.

Une sous-population de MSCs réside au sein des BMCs des patients atteints d'ICMI. Ces cellules, du fait de leurs propriétés immunomodultrices et pro-angiogéniques représentent une piste prometteuse. En 2012, Smadja *et al.*, ont mis en évidence l'efficacité des MSCs issus de patients ICMI dans un modèle murin HLIM [342]. De plus, ces cellules possèdent un potentiel équivalent aux MSCs issus de patients exempts de facteurs de risque. Cultivées dans un milieu riche en FCs pro-angiogéniques, ces MSCs deviennent des MELs. Ces MELs présentent un pouvoir pro-angiogénique supérieur aux MSCs *in vitro* et *in vivo* [178] [179] [177] mais n'ont jamais été testées dans un modèle HLIM. Le premier objectif de ce travail a été de mettre en évidence et d'amplifier ces MELs au sein de BMCs issues de patients. Dans un modèle murin d'ICMI, le second objectif de cette étude a été de comparer l'efficacité des MELs et des MSCs issues de patients « *NO-option* » en comparaison aux BMCs de patients initialement injectés dans l'essai clinique BALI.

Matériel et Méthodes :

Origine des cellules :

Les BMCs issus de 7 patients « *NO-option* » issus de l'essai BALI ont été utilisés. Les caractéristiques cliniques et biologiques de ces patients sont parfaitement colligées. Ainsi, l'âge médian des patients est de 57 ans. Dans un premier temps, les MSCs indifférenciées ont été isolées puis amplifiées à partir de ces BMCs médullaires. Dans un second temps, les MSCs indifférenciées sont cultivées dans un milieu riche en FCs pro-angiogéniques pendant 2 semaines afin d'obtenir des MELs.

Caractérisation des MSCs et des MELs :

Les MSCs et les MELs ont été caractérisés par cytométrie en flux (CMF). Un Matrigel a été réalisé *in vitro* afin de comparer les pouvoirs pro-angiogéniques respectifs des MSCs et des MELs.

Modèle murin d'ischémie de la patte :

Une ligature de l'artère fémorale commune gauche a été réalisée chez 135 souris mâle *Nude* BALB/c. Quatre heures après l'induction de l'ischémie, 5.10^5 cellules ont été injectées dans le *Gastrocnemius* ischémié. Un groupe de 6 souris a été utilisé pour

chaque condition. Un groupe de 20 souris a reçu le véhicule (Tampon PBS dans lequel sont remises en suspension les BMCs, les MSCs et les MELs).

Suivi du flux sanguin par PeriCam® :

Le flux sanguin a été contrôlé par PeriCam® dans les membres inférieurs durant 28 jours. Les souris sont anesthésiées à l'isoflurane durant la mesure. Les résultats sont exprimés en ratio de perfusion du membre ischémié / membre sain.

Observations et tests fonctionnels :

L'observation quotidienne durant 28 jours des pattes a permis de détecter la nécrose. La récupération fonctionnelle a été évaluée en utilisant deux tests, l'un statique et l'autre dynamique durant 28 jours. Le test statique repose sur la mesure de l'espace interdigital entre le 1^{er} et le 5^{ème} orteil de chaque patte. Le test dynamique évalue le score de marche des souris.

Immuno-histologie :

Le dernier jour de l'étude, les muscles gastrocnémiens sont prélevés afin d'évaluer la réparation musculaire et de mesurer la néoangiogenèse. La réparation musculaire est estimée par le pourcentage de fibres musculaires présentant des noyaux centraux. La néoangiogenèse est observée grâce au marquage immunofluorescent anti-CD31 et anti- α SMA.

Résultats :

Le pouvoir pro-angiogénique des MELs *in vitro* est supérieur à celui des MSCs :

Les MSCs et les MELs présentent un phénotype strictement identique en CMF. Les MELs forment davantage de pseudo-tubes en Matrigel que les MSCs.

Les MELs restaurent complètement le flux sanguin plus précocement que les MSCs :

Concernant le flux sanguin, les MELs et les MSCs induisent une restauration complète du flux sanguin contrairement aux BMCs qui ne permettent qu'une restauration partielle. Cependant, il faut noter que les BMCs ont induit une restauration supérieure au véhicule. De plus, les MELs induisent une restauration plus précoce que les MSCs.

Les MELs et les MSCs induisent une récupération fonctionnelle supérieure aux BMCs :

Les souris traitées par MELs n'ont présenté aucune nécrose contrairement à celles traitées par MSCs et BMCs. Le groupe ayant reçu le véhicule a présenté davantage de nécroses. Sur le plan fonctionnel, la TC s'est démarquée du véhicule par son efficacité à rétablir l'écartement interdigital et le score de marche. Concernant le test statique plus précisément, les MELs ainsi que les MSCs ont été plus efficaces que les BMCs.

Les MELs induisent une néoangiogenèse et une réparation musculaire :

Les données histologiques ont montré que les MELs ont induit un taux de réparation musculaire plus important que les MSCs. Les BMCs n'ont pas permis de réparer le muscle. Les néovaisseaux immunomarqués avec un anticorps anti-CD31 et anti- α SMA sont plus nombreux dans le groupe MELs par rapport aux 3 autres lots (BMCs, MSCs et véhicule).

Conclusion :

L'étude a permis de mettre en évidence la présence d'un contingent de MELs au sein des BMCs issus de patients « *NO-option* ». Les MELs présentent une capacité pro-angiogénique supérieure au MSCs issues du même BMCs. Elles ont également la capacité de favoriser la régénération musculaire. En conclusion, les MELs semblent être un bon candidat pour la TC.

TITLE PAGE

Title of the article:

In vivo efficacy of endothelial-like mesenchymal stem cells derived from patients with critical limb ischemia

Running head:

Cell therapy in critical limb ischemia

Authors:

Rida Al-Rifai,¹ Philippe Nguyen,^{1,2} Nicole Bouland,³ Christine Terryn,⁴ Lukshe Kanagaratnam,⁵ Gaël Poitevin,¹ Caroline François,¹ Catherine Boisson-Vidal,^{6,7} Marie-Antoinette Sevestre,⁸ and Claire Tournois,^{1,2}

Institutional addresses:

¹ EA-3801, SFR CAP-santé, Université de Reims Champagne-Ardenne, France.

² Laboratoire d'Hématologie, CHU Robert Debré, Reims, France.

³ Laboratoire d'Anatomie Pathologique, Université de Reims Champagne-Ardenne, France.

⁴ Plateforme PICT, Université de Reims Champagne Ardenne, Reims, France.

⁵ Unité d'aide méthodologique CHU Robert Debré, Reims, France.

⁶ Inserm UMR S1140, Faculté de Pharmacie de Paris, France

⁷ Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, France.

⁸ Service de Médecine Vasculaire, CHU, Amiens, France.

email addresses:

Rida Al-Rifai : rida.al-rifai@etudiant.univ-reims.fr

Philippe Nguyen: pnguyen@chu-reims.fr

Nicole Bouland: nicole.bouland@univ-reims.fr

Christine Terryn: christine.terryn@univ-reims.fr

Lukshe Kanagaratnam: lkanagaratnam@chu-reims.fr

Gaël Poitevin: gael.poitevin@univ-reims.fr

Caroline François: cfrancois@chu-reims.fr

Catherine Boisson-Vidal: catherine.boisson-vidal@parisdescartes.fr

Marie-Antoinette Sevestre: sevestre.marie-antoinette@chu-amiens.fr

Claire Tournois: claire.tournois@univ-reims.fr

Corresponding author:

Claire TOURNOIS, PhD

Address: EA-3801, SFR CAP-santé, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51092
Reims Cedex, France

Telephone number: (+33) 3 26 91 35 42

Fax number: (+33) 3 26 78 81 71

E-mail address: claire.tournois@univ-reims.fr

Word counts for text (excluding the abstract, keywords, abbreviations, references and illustrations): 4063

Word counts for abstract: 248

Figure/table count: 9 figures and 1 table

Reference count: 46

ABSTRACT

Background:

Cell therapy has been proposed for patients with critical limb ischemia (CLI). Clinical trials were encouraging but failed to establish efficacy. In most cases, autologous bone marrow derived cells (BMCs) were used. Mesenchymal stem cells (MSCs) may be a better option as they combine angiogenic and immunomodulatory properties. The aim of this study was to evaluate efficacy of two types of MSCs: undifferentiated MSCs and “endothelial-like” MSCs (MELs) in comparison with currently used BMCs.

Methods:

Hindlimb ischemia was obtained after ligation of the left femoral artery in 135 BALB/c *Nude* mice. Cells (5×10^5) or vehicle were injected into the *Gastrocnemius*. MSCs and MELs were obtained by culture from CLI-patients' BMCs. Perfusion of lower limbs and functional tests were assessed for 28 days. Muscle histological analysis (neoangiogenesis and muscle repair) was performed.

Results:

MELs can induce blood flow recovery; their effect is as strong as MSCs and better than BMCs. No amputation was observed in MELs treated mice. Functional tests showed improvement in treated groups with a superiority of MSCs and MELs. In muscles, CD31+ and α SMA+ labelling were the highest in MELs treated mice. MELs induced the highest muscle repair.

Conclusions:

MELs from CLI patients have an angiogenic potential. Their administration was associated with limb salvage. With an equivalent effect on blood flow recovery, MELs could be a better option than MSCs as they also favour muscle repair. As inflammation is deleterious for vessel repair, the immunomodulatory effect of MELs may explain their efficacy.

Trial registration: NCT00533104

KEYWORDS

Angiogenesis; cell therapy; critical limb ischemia; mesenchymal stem cells

BACKGROUND

Critical limb ischemia (CLI) is the most severe form of atherosclerotic peripheral arterial disease (PAD). Due to the progression of vascular risk factors, PAD incidence is predicted to double by 2050 [1]. The management of patients is limited to surgical revascularization. However, around up to 30% of patients are not eligible for such procedures due to poor distal vascular bed. Therefore, these “no-option” patients (NO-CLI) experience a high risk of major amputation [2] and are exposed to a high level of cardiovascular death [3].

In such context, cell therapy (CT) has been proposed for NO-CLI patients to promote angiogenesis and improve tissue perfusion [4]. To date over 50 phase I/II or III clinical trials have investigated a variety of cell therapies [5-11]. Recent meta-analysis are in favor of a clinical improvement of treated patients but results remain divided [12]. In most cases, non-selected autologous bone marrow derived cells (BMCs) were used. They were obtained from elderly ill patients and exhibit low proangiogenic potential [13]. In most studies BMCs were not well characterized.

We recently published a multicentre clinical trial evaluating the effect of autologous BMCs *versus* placebo in CLI-patients [Bone Marrow Autograft in Limb Ischemia (BALI)]. This study was in favor of efficacy but the rate of amputation remained elevated in treated patients [14]. Inflammation was associated with poor outcome [15]. In order to improve our understanding, BMCs were extensively characterized and we observed a great variability in BMCs composition between patients [15].

BMCs contained mature and immature cells (hematopoietic stem cells (HSCs), endothelial progenitor cells). Interestingly, they also contained a rare subset of mesenchymal stem cells (MSCs). These non-hematopoietic mononuclear cells reside in the bone marrow stroma [16]. MSCs show an extensive capacity of differentiation into osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, astrocytes and skeletal muscle cells [17, 18]. MSCs can also promote regeneration of damaged tissues, reducing inflammation [19]. They can migrate and proliferate in areas of ischemia [20]. They may be good candidates for CT as they combine proangiogenic and immunomodulatory properties [21]. Moreover, “endothelial-like” MSCs (MELs) can be obtained from MSCs culture in the presence of vascular endothelial growth factor (VEGF) [22-24]. They can form functional blood vessels in collagen-plug implanted in mice [23] but have never been tested in a Hind limb ischemia model (HLIM).

This led us to evaluate the presence of MSCs and MELs in CLI-patients BMCs and, if so, to study the effect of MSCs and MELs in a murine HLIM in comparison with BMCs.

METHODS

Study design

The aim of the study was to evaluate the efficacy of BMCs, MSCs and MELs in comparison with vehicle in a murine HLIM. BALB/c *Nude* mice were included in the study. Hindlimb perfusion and functional tests were assessed at baseline (day – 1). At day 0 hindlimb ischemia was induced after left common femoral artery ligation. Blood flow of the lower limbs was performed postoperatively. Cells (5×10^5 of BMCs or MSCs or MELs) or vehicle (30 μ L of Phosphate Buffer Saline (PBS)) were injected in the left *Gastrocnemius* muscle 4 hours after ischemia induction. Blood flow measurement was considered as primary endpoint whereas necrosis detection and functional tests (static and dynamic) were considered as secondary endpoints. They were evaluated at days 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20 and 28 postoperatively. At day 28 *Gastrocnemius* muscles were harvested for histological analyses (Fig. 1).

Source of BMCs

BMCs were obtained from 7 CLI patients randomly selected from 38 patients included in the BALI trial (trial number NCT00533104). The study protocol was approved by the French National Agency for Medicines and Health Products Safety and by an Institutional Review Board. As previously described [14], 500 mL of bone marrow (BM) were collected under general anesthesia through multiple punctures of the posterior iliac crest. BMCs were isolated using a blood cell separator (Cobe Spectra, version 4, Bone Marrow Processing Program, Gambro BCT, Lakewood, CO, USA) and concentrated to obtain a final volume of 40 mL (30 mL for autologous injection and 10 mL for control analyses and cryopreservation). BMCs were cryopreserved in liquid nitrogen in dimethyl sulfoxide (DMSO) as a cryoprotector.

Platelets (PLTs) and nucleated cells counts were performed with an Advia automated counter (Siemens). Cell morphology was observed after cytocentrifugation and May Grünwald Giemsa staining. The MesenCult Proliferation Kit (Stemcell Technologies) was used for the fibroblast colony-forming units (CFU-F) assay. CD34+ stem cell analysis was performed by flow cytometry (FC) according to the ISHAGE (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering) reference method using Stem-Kit reagents (Beckman Coulter). Samples were analyzed on Navios flow cytometer (Beckman Coulter).

Cell Culture

MSCs and MELs were obtained from cryopreserved BMCs. After thawing, cells were counted, and viability was evaluated. MSCs were selected by their capacity to adhere to uncoated plastic plates and cultured and expanded in a CFU-F medium (MesenCult™ Proliferation Kit, Stemcell Technologies, Grenoble, France) supplemented with 1% penicillin-streptomycin-amphotericin (Antibiotic-Antimycotic 100X, Gibco by Life Technologies, Illkirch, France). Cells were cultured in a humidified incubator at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere. The culture was maintained through 28 days.

MELs were obtained from MSCs after trypsinization at day 14, and subsequent culture during another period of 14 days in a highly supplemented endothelial cell growth medium containing 5% fetal bovine serum (FBS), human VEGF-A, human fibroblast growth factor-2 (FGF-2), human epidermal growth factor (EGF), insulin-like growth factor-1 (IGF-1), and ascorbic acid for rapid proliferation (EGM-2 MV BulletKit, Lonza, Basel, Switzerland). Cells were observed in phase contrast microscopy (OLYMPUS, Plateforme en Imagerie Cellulaire et Tissulaire PICT)

Characterization of MSCs and MELs

MSCs and MELs were phenotyped by a four-color FC analysis on FC500 analyzer (Beckman Coulter) using FITC-CD105, PE-CD90 (Thy-1), PE-Cy7-CD73 (5'nucleotidase), PE-Cy5- human leukocyte antigen-D related (HLA-DR; BD Pharmingen) and PCy5- CD34, CD45 and CD11b (integrin alpha M; Immunotech, Beckman Coulter). The isotype-matched mouse IgG1-FITC, IgG1-PE, IgG1-PCy5 and IgG1-PCy7 were used as negative controls. Data were analyzed using Kaluza software.

Capillary-like tube formation

Capillary-like tube formation was evaluated in a Matrigel (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) matrix. A volume of 10 µL of gel was deposited on the uncoated slide (81501, µ-Slide Angiogenesis, Biovalley). After thirty minutes at 37°C the gel formed a matrice and 10⁴ cells were deposited. Slides were observed during 24h with a videomicroscope (Axiovert, 200M, Zeiss, Germany) piloted by Software Metamorph (Roper Scientific). Pictures were catched each 5 minutes (coolsnap HQ, Roper Scientific, France). The extend of the network of the capillary-like tubes was appreciated by the quantification of the loops number using the ImageJ software and Neuron-J plug in tool. MRC-5 fibroblasts cells line (84003, RD-Biotech) was used as negative control. Cord-

blood derived-endothelial colony-forming cells (cb-ECFC) were used as positive control. Isolation and characterization of cb-ECFC have been previously described [25].

Murine hindlimb ischemia model and Cell transplantation

One hundred and thirty-five male BALB/c *Nude* mice (Charles River Laboratories, l'Arbresle, France), 11 weeks of age were used for all experiments. They had access to water and food *ad libitum*. Hindlimb ischemia was induced after the surgical left common femoral artery ligation [26]. Animals were placed on a 38°C heating pad and anesthetized by continuous inhalation of isoflurane (5% in induction and 2% during the intervention). Exposure was obtained by performing an incision in the skin overlying the high portion of the left hindlimb next to the inguinal ligament. The common left femoral artery was ligated with a non-absorbable 6.0 silk thread. Then the skin was closed with absorbable sutures. Buprenorphine was administered as analgesic (0.05 mg/kg twice a day for three days). Under anesthesia, mice were transplanted in their left *Gastrocnemius* four hours after surgery with 30 μ L of PBS (n = 20 mice) or with 30 μ L of 5×10^5 BMCs (n = 40 mice and approximately 6 per condition) or of $5 \cdot 10^5$ MSCs (n = 35 mice and approximately 6 per condition) or of 5×10^5 MELs (n = 40 mice and approximately 6 per condition). Before injection, cells were counted, and viability was determined by Trypan blue. A 30-gauge needle was used for the unique intramuscular injection.

Blood Flow Analysis

Perfusion of lower limbs was assessed with PeriCam® perfusion imaging (PeriCam® PSI, Perimed, Craponne, France) at baseline and for 28 days after ligation. Measures were taken under anesthesia with isoflurane and on a 38°C heating pad. Low or no blood perfusion was displayed as dark blue, whereas the highest perfusion was displayed as red. After blood flow was scanned during 30 seconds, stored records were analyzed with PimSoft® software and the average flows of ischemic and non-ischemic limbs were quantified. Ratios of the ischemic (left) / normal (right) limb blood flow were used to express the results. The mean and the standard deviation were used per group.

Clinical Recovery

Necrosis detection: Limb ischemia was assessed with the daily observation of mouse limbs searching for foot or leg necrosis or amputation.

Two functional tests (static and dynamic) were used to quantify post-ligature clinical improvement:

- **Static test:** After surgical ligation, ischemic mouse paw retracted. Interdigital spacing between the first and the 5th toe (IDS) was measured using Image J software. For this, the mouse was placed in a transparent container to visualize from the bottom normal and ischemic paws. Measures were taken at day -1 (baseline), 1, 3, 5, 7, 10, 14, 20 and 28 post surgery. Results were expressed as a ratio of IDS ischemic / control paw. Clinical improvement was testified by the gradual recovery of (IDS).
- **Dynamic test:** A semi quantitative assessment of impaired use of ischemic limb was performed. Mice progressed in a transparent corridor to evaluate their walking. The functional scoring was adapted from Tarlov's [27]: score 0: the mouse does not use the paw - score 1: the mouse can rely on the left paw - score 2: the mouse can use its left paw but claudicates - score 3: normal walking). Measures were taken at day -1 (baseline), 1, 3, 5, 7, 10, 14, 20 and 28 post surgery.

Tissue preparation and histological analysis

The *Gastrocnemius* muscles right and left of each mouse were harvested at day 28. For each condition, the muscles were frozen for immunofluorescence assay or fixed in formalin 10% for hematoxylin eosin (HE) staining. For immunofluorescence, tissues were embedded in Optimal Cutting temperature (OCT) compound (F/KMA-0100-00A, MM France, Francheville, France) and frozen in liquid nitrogen. Frozen sections of 6- μ m thickness were mounted on superfrost slides. Sequentially, slides were fixed in cold acetone for 20 minutes, blocked with normal donkey serum (S30, Merck Millipore, St-Quentin-en-Yvelines, France) for one hour at room temperature and incubated with primary antibody at 4°C overnight. After washing three times with PBS 1X (ET330, Euromedex, Souffelweyersheim, France), slides were incubated with secondary antibody during one hour at room temperature. The capillaries were visualized by immunofluorescent staining with a primary anti-Platelet endothelial cell adhesion molecule CD31 antibody (PECAM or CD31) (1:100, ab28364, abcam, Cambridge, United Kingdom) and a secondary fluorochrome-coupled antibody (1:500, Alexa Fluor® 568, ab175470, abcam, Cambridge, United Kingdom). Slides were observed on an inverted fluorescence microscope (x20 magnification Axio Observer Z1, Zeiss Microscopy) piloted by Metamorph Software (Roper Scientific). Capillaries were counted in 5 representative fields from 3

tissue sections for each muscle using ImageJ® software. The amount of ischemia-induced angiogenesis was compared with the non-ischemic *Gastrocnemius*. The alpha-smooth muscle actin-positive (α SMA) capillaries and macrophage infiltration were also visualized by the same protocol using respectively a primary anti- α SMA antibody (1:500, ab5694, abcam, Cambridge, United Kingdom) and an anti-CD68 antibody (1:500, ab125212, abcam, Cambridge, United Kingdom). The fixed muscles were embedded in paraffin and stained with Hematoxylin and eosin (HE) to determine the percentage of muscle fibers with a central nucleus. Indeed, these muscle fibers specifically indicate muscle regeneration [28-30]. For this, five fields were counted by blinded observer in the central region of the largest cross area of *Gastrocnemius* muscle sections. The results were expressed in ratio left muscle / right muscle. All results were expressed as mean and standard deviation per group.

Statistical analyses:

Quantitative variables were expressed as median (Med) and range [min-max] or Box and Whiskers plots (Medcalc version 7.3 software, <https://www.medcalc.org/>). Mann Whitney Tests were used to compare differences between groups at day 28. Wilcoxon Tests were used to compare differences between days in the same group (Statview®). A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

For blood flow analysis, a mixed effect model was performed to assess the relationship between the ischemic / normal limb ratio and treatment group, the time of the measure, adjusted on the value of the ratio at day-1 (baseline value). Bonferroni method was used for multiple comparisons adjustments.

The overall survival limb rates were estimated by the Kaplan-Meier method. Difference between survival curves for each experimental group was performed using the log rank test (GraphPad®).

RESULTS

Patient and BMCs characteristics

BMCs were obtained from 7 different unselected patients presenting with CLI and candidates for cell therapy. Patients were representative of the NO-CLI population in terms of age, associated cardiovascular risk factors, and current medications (Table 1). The severity of the disease was appreciated from percutaneous tissue oxygen pressure (TcPO₂) and the presence of ulcers.

BMCs were characterized by cell counting and differential presented in Figure 2A-2D and Table 1. HSCs were quantified in BMCs by FC: 3.66% ± 1% (Fig. 2D). MSCs were quantified in BMCs by a clonogenic assay (CFU-F): 39 ± 16 MSCs of 1 million nucleated cells (Table 1)

Clinical outcome after 6 and 12 months was presented in Table 1.

MSCs and MELs characterization

Human BM derived MSCs show plastic adherent properties and have fibroblast-like morphology seen under phase contrast microscope (Fig. 2B). The cultured MSCs express on their surface CD105+, CD90+ and CD73+, while lacking the expression of hematopoietic cell markers (CD45-, CD34-, CD11b-) and HLA-DR surface marker (Fig. 2E). MELs present similar fibroblast-like morphology (Fig. 2C) and immunophenotyping for these 7 surface markers (Fig. 2F).

Because MSCs and MELs have a proangiogenic potential, we looked for their ability to form capillary-like tube in an *in vitro* endothelial tube formation assay. Contrary to MRC-5 fibroblasts cells line used as negative control, cb-ECFC were constitutively able to form pseudo-tubes in a Matrigel assay. MSCs have low ability for pseudo-tube formation compared with MELs (p value = 0.0008). There was no difference between cb-ECFC and MELs (Fig. 3).

MSCs and MEL are effective to restore hindlimb blood flow

As MSCs and MELs may have a stronger angiogenic potential than BMCs, we compared these cells with vehicle in ischemic *Nude* mice (Fig. 4A). The mouse model was validated by the fact that the targeted ischemic ratio was obtained and was identical in each group at

baseline (0.99 ± 0.05) and after surgery (0.31 ± 0.04). Figure 4B shows statistical differences between groups. Whatever the type of cells, their injection was more effective to restore leg perfusion as measured by PeriCam® than vehicle ($p < 0.0001$). MSCs and MELs transplantation allowed significant improvement of flow in comparison with BMCs [p value (MSCs vs BMCs) < 0.0033 ; p value (MELs vs BMCs) < 0.0001]. However, complete flow recovery after BMCs transplantation was not achieved at day 28. In comparison, MSCs allowed to fully restore the flow at day 20. MELs were also more effective than BMCs and MSCs and allow achieving full recovery at day 14. These results indicate that MSCs and MELs are more effective than BMCs (and vehicle) to restore hindlimb blood flow.

MELs improves limb survival in comparison with MSCs

Animal limbs were regularly observed during 28 days post operatively to detect necrosis. Ten out 20 untreated mice developed necrosis as early as day 3 after ligation (Fig. 5). In contrast, in the BMCs group, necrosis affected 7 out of 40 (17.5%) mice. The efficacy of BMCs injection on limb survival was significant compared with vehicle ($p < 0.001$). In the MSCs group, necrosis was observed in 4 out of 35 (11.4%) mice. MSCs significantly improved limb salvage in comparison with vehicle ($p < 0.001$) but did not significantly differ from BMCs. In contrast, no necrosis was observed after MELs injection, the necrosis rate being significantly reduced in comparison with BMCs but also with MSCs ($p < 0.05$).

Taken together, these results suggest that MELs have the strongest angiogenic potential in comparison with BMCs but also MSCs.

MSCs and MELs injection improves clinical recovery

Cell injection using the three types of cells significantly improved clinical recovery in comparison with control group (Fig. 6 and 7). In all groups, static and dynamic tests were well-correlated (Pearson's test: $r = 0.6$, $p < 0.0001$).

In order to appreciate recovery, we measured IDS of the ischemic and of the controlateral non-ischemic paw, allowing us to calculate an IDS ratio (equal to 1 to achieve full recovery) (Fig. 6A). BMCs significantly improved IDS ratio evaluated at day 28 in comparison with vehicle (IDS ratio BMCs: 0.84 ± 0.15 ; vehicle: 0.67 ± 0.20 , $p < 0.001$).

MSCs and MELs were significantly more effective than BMCs on IDS ratios at day 28 [IDS ratio MSCs: 0.90 ± 0.11 ; MELs: 0.93 ± 0.09 ; p (MSCs vs BMCs) <0.05 ; p (MELs vs BMCs) <0.001 ; MSCs vs MELs = non-significant) (Fig. 6B).

Cell injection of BMCs, MSCs or MELs significantly improved the walking of the ischemic mice as assessed by the dynamic test ($p < 0.0001$) (Fig. 7). Indeed, in the absence of cell infusion, the walking score of the ischemic mice progressively improved barely achieving full recovery at day 28. On the contrary, full recovery was obtained at day 20 after cell infusion, whatever the type of cells used.

MELs and MSCs increase capillary density in the ischemic limb

In order to visualize neoangiogenesis after cell infusion, capillary density in the ischemic muscles was assessed by immunofluorescence after CD31 labelling (Fig. 8A). A ratio was calculated from the fluorescence intensity in the ischemic muscle in comparison with the controlateral counterpart. We observed that BMCs increased capillary density in comparison with vehicle (fluorescence ratio: 3.67 ± 1.52 vs 1.95 ± 0.21 ; $p < 0.05$) (Fig. 8B). MSCs induced a higher capillary density than BMCs (5.32 ± 1.67 vs 3.67 ± 1.52 ; $p < 0.05$). Capillary density in the ischemic muscle was the highest after MELs injection (MELs fluorescence ratio: 6.31 ± 0.96 ; $p < 0.05$ vs MSCs).

We further visualized capillary structure; we counted the number of α SMA-positive cells (Fig. 8C). Indeed, this marker indicates the presence of smooth muscular vascular cells. The injection of BMCs did not increase the number of α SMA-positive cells in comparison with vehicle (fluorescence ratio: 1.46 ± 0.53 vs 1.20 ± 0.30) (Fig. 8D). In contrast, MSCs treated mice developed a higher rate of α SMA-positive cells in comparison with BMCs (1.92 ± 0.36 vs 1.46 ± 0.53 , $p < 0.05$). Interestingly, MELs treated mice presented with the highest α SMA-positive pattern (MELs fluorescence ratio: 2.38 ± 0.54 ; $p < 0.05$ vs MSCs). These results suggest that MSCs and MELs can induce CD31 and α SMA-positive capillaries whereas BMCs cannot.

As inflammation is a strong modulator of angiogenesis, we evaluated the macrophage infiltration in response to cell infusion using a CD68 labeling. We found no difference in CD68-positive cell counts after the injection of either type of cells BMCs, MSCs and MELs

(data not shown). Still, there was a difference between either cell type in comparison with vehicle (fluorescence ratio BMCs: 8.72 ± 3.06 ; MSCs: 9.26 ± 3.37 ; MELs: 9.71 ± 3.54 ; vehicle: 12.1 ± 2.18 , p value for each type of cells vs vehicle: $p < 0.05$). No difference according to the type of cells was found.

MSCs and MELs favor muscle repair after ischemia

BMCs failed to favor muscle repair ($37 \pm 18\%$ expressed as a percentage of total muscle fibers), in comparison with vehicle ($33 \pm 20\%$) (Fig. 9). MSCs did increase the rate of myofibers with central nuclei ($46 \pm 15\%$), in comparison with vehicle ($p < 0.01$). The effect of MELs on muscle repair ($74 \pm 20\%$) was significantly stronger than vehicle ($p < 0.001$) and BMCs ($p < 0.001$). Interestingly, MELs were also more effective than MSCs on ischemic muscle repair ($p < 0.01$). This indicates that MELs may favor muscle repair more efficiently than MSCs after ischemia.

DISCUSSION

Among innovative therapies, CT is a good candidate to treat patients with severe PAD. BMCs are considered as “gold standard” in CLI-CT because it was used by the founder trial [4]. In spite of encouraging clinical studies, the efficacy of CT remains controversial. This may be partially explained by the heterogeneity of autologous BMCs [15]. In such BMCs, HSCs are extremely rare and may not support proangiogenic properties of BMCs. Still, these autologous BMCs may be the source of other types of proangiogenic stem cells. Indeed undifferentiated MSCs were obtained from BMCs CLI-patients as previously described [15, 31].

Using a well-recognized model of mouse HLIM [26], Smadja *et al.*, showed that MSCs from CLI-patients may have a comparable proangiogenic potential to MSCs isolated from age matched patients free of any cardiovascular disease [31].

To improve proangiogenic properties of CLI-patients' MSCs, we cultured them in a proangiogenic medium. Our results show that in spite of morphologic and phenotypic similarities according to Janeczek Portalska *et al.*, MELs can be functionally distinguished from MSCs by their stronger capacity to form pseudo-tubes *in vitro* [24] in agreement with [22, 23].

The results of the present study clearly indicate that both MSCs and MELs completely restore blood flow (primary endpoint) in comparison with BMCs. To our knowledge, this is the first report to establish this property of MELs obtained from CLI-patients in the same model. Interestingly, MELs restored blood flow earlier than MSCs.

We further demonstrated that MSCs and MELs could improve clinical recovery as well as limb salvage. According to Iwase 2005, MSCs were more effective than BMCs to save limb. Our results indicate that MELs were also more effective than MSCs [32].

Interestingly, our results clearly show that MELs not only enhance neovascularization but also favor the development of vascular muscle cells suggesting the formation of stable capillaries [33]. The fact that MELs favor the formation of neovessels lined with muscle cells suggests that newly formed capillaries are mature and stable. Furthermore, as MELs also improves skeletal muscle repair, this could explain the efficacy of MELs to reduce the

amputation rate. Indeed, we showed for the first time that MELs could improve skeletal muscle repair after ischemia. To evaluate muscle repair, we quantified myofibers with central nucleus location. Indeed, muscle regeneration is characterized by the activation of myogenic cells which leads to the formation of new myofibers. These fibers are recognized by a centrally located myonucleus [28-30, 34].

MSCs are well-recognized for their high proliferation and differentiation potential and their proangiogenic properties. Moreover, MSCs support a significant paracrine effect through the secretion of proangiogenic cytokines which provide anti-apoptotic effects and stimulate revascularization [35, 36]. *In vitro*, studies have demonstrated that a cell-free medium obtained from MSCs could favor angiogenesis by activating VEGF-A expression and through cytokine and growth factor secretion [37]. Furthermore, it was shown in an animal model that MSCs derived from human Wharton's jelly promote neovascularization by secreting growth factors [38]. For such properties, MSCs have been suggested to be a promising alternative source for ischemic diseases [39].

MSCs have been evaluated in clinical trials in the last decade [21, 40-46] and have included a total population of 121 MSCs-treated patients. These studies have established the safety of such cells [43, 45] which may be at least partly explained by their immunomodulatory properties. Clinical trial results were in favor of efficacy, one randomized clinical trial concluding that MSCs were more effective than BMCs [21]. Furthermore, BMCs harvesting in CT needs approximately 500 mL of BM aspiration under general anesthesia whereas, due to their high proliferative potential, MSCs harvesting could require less than 50 mL under local anesthesia [21, 42]. This is an important advantage because CLI population is elderly and experiences cardiovascular risks.

CONCLUSIONS

The present study shows that CLI-patients' MELs can be obtained from the bone marrow of patients presenting severe PAD and that these cells can restore blood flow as efficiently as MSCs and more potently than BMCs. A major issue of CT in PAD is to provide a fully stable and mature vascular network. In this regard, MELs are promising candidates as they restore flow in CLI and provide muscle repair. Other sources of MSCs such as adipose tissue, cord blood or Wharton's jelly could be used since they can differentiate in MELs. One may expect that these cells may be easier to obtain with even more potent proangiogenic capacity

LIST OF ABBREVIATIONS

BALI: Bone Marrow Autograft in Limb Ischemia; BM: bone marrow; BMCs: bone marrow derived cells; cb-ECFCs: cord blood endothelial colony-forming cells; CFU-F: colony forming unit-fibroblast; CLI: critical limb ischemia; CT: cell therapy; ECs: endothelial cells; DMSO: dimethyl sulfoxide; EGF: epidermal growth factor; FBS: fetal bovine serum; FC: flow cytometry; FITC: fluorescein; FGF: fibroblast growth factor; HE: hematoxylin eosin; HLA-DR: human leukocyte antigen-D related; HLIM: hind limb ischemia model; HSCs: hematopoietic stem cells; IDS: interdigital spacing; IGF: insulin-like growth factor-1; IM: intramuscular; MELs: endothelial-like mesenchymal stem cells; MNCs: mononuclear cells; MSCs: mesenchymal stem cells; NO-CLI: "no-option CLI"; OCT: Optimal Cutting temperature; PAD: peripheral arterial disease; PBS: phosphate buffer saline; PE: phycoerythrin; PECAM: anti-platelet endothelial cell adhesion molecule; PLTs: platelets; SMA: smooth muscle actin; TcPO₂: transcutaneous partial pressure of oxygen; VEGF: vascular endothelial growth factor; HLIM: hind limb ischemia model

DECLARATIONS

- ***Ethics approval and consent to participate***

The Bone Marrow Autograft in Limb Ischemia (BALI) protocol was approved by the French National Agency for Medicines and Health Products Safety and by an Institutional Review Board. The trial was registered on www.clinicaltrials.gov (identifier NCT00904501). Registered May 19, 2009, Study ID Numbers: PHRC2007- N11-02

Animal protocols were approved by the C2EA-56 (ethics committee in animal experimentation of Reims Champagne Ardenne, authorization number 2016022412165910).

- ***Consent for publication***

Patients were eligible for the BALI trial if they were ≥ 18 years of age. All patients admitted to the hospital where the study was carried out sign a written informed consent for use of their data for research purposes, as approved by the institutional Ethics Committee.

- ***Availability of data and material***

The data supporting the conclusions of this article are included within the article

- ***Competing interests***

The authors declare that they have no competing interests

- ***Funding***

This study was supported by the European Science Research funding "FEDER" (Fonds européen de développement régional) and the Champagne Ardenne region.

- ***Authors' contributions***

CT^{1,2} and PN conceived the project. RA-R, NB, GP, CB-V, CT⁴ and CF performed the experiments. MAS selected the eligible patients and created the clinical trial. CT^{1,2}, RA-R, PN, LK, contributed to the acquisition, analysis and interpretation of the data. CT^{1,2}, RA-R, and PN wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

CT^{1,2}: Claire Tournois

CT⁴ : Christine Terryn

¹ EA-3801, SFR CAP-santé, Université de Reims Champagne-Ardenne, France.

² Laboratoire d'Hématologie, CHU Robert Debré, Reims, France.

⁴ Plateforme PICT, Université de Reims Champagne Ardenne, Reims, France.

- ***Acknowledgements***

The authors appreciated the contribution of Bernard Pignon, Blandine Dizier, Damien Jolly, Zoubir Djerada, Catherine Macé, Catherine Deroche, Caroline Fichel, Aurore Bruhier, Lucie Rigolot and Victor Fournier

LEGENDS OF FIGURES and TABLES

Figure 1: Study design

Hindlimb ischemia was induced by femoral artery ligation in *Nude* mice. Cells (BMC, MSCs, MELs) or vehicle were injected in the *Gastrocnemius*. Hindlimb perfusion, Necrose detection and functional tests were performed during 28 days. At day 28 muscles were harvested for histological analysis.

Figure 2: Cells observation and characterization by flow cytometry

A and D: BMCs characterization

B and E: MSCs characterization

C and F: MELs characterization

Figure 3: Analysis of cord-like structures on Matrigel

A: MSCs and MELs form cord-like structures when grown on Matrigel

B: MELs form more cord-like structures than MSCs (cb-ECFC are used as positive control and MRC5 as negative control).

Figure 4: Hindlimb blood flow recovery

A. Hindlimb blood flow recovery after femoral artery ligation and BMCs, MSCs, MELs or vehicle injection.

B. Cell therapy by BMCs transplantation (blue) was effective in comparison with vehicle (green) injection for blood flow recovery at day 28 but BMCs did not restore completely the blood flow. In contrast MSCs (red) provided complete recovery at day 20 whereas MELs (violet) were effective to completely restore blood flow at day 14

(* Comparison of MSCs group *versus* BMCs group; # MELs *versus* BMCs; ¥ MELs *versus* MSCs; § BMCs *versus* vehicle; Δ MSCs *versus* vehicle; ∞ MELs *versus* vehicle).

Figure 5: Limb survival

A. MELs provide complete limb salvage in comparison with MSCs and BMCs.

B. In comparison with vehicle, BMCs provided better limb salvage ($p < 0.001$). There was no difference between BMCs and MSCs treatment. MELs were the most protective compared to BMCs and MSCs ($p < 0.05$).

Figure 6: Static test

A. MSCs and MELs were significantly more effective than BMCs and vehicle to improve IDS

B. MSCs (red) and MELs (violet) provided significantly higher ratios at day 28 in comparison with BMCs (blue). There was no difference between the MSCs and MELs groups.

(* Comparison of MSCs group *versus* BMCs group; # MELs *versus* BMCs; ¥ MELs *versus* MSCs; § BMCs *versus* vehicle; Δ MSCs *versus* vehicle; ∞ MELs *versus* vehicle).

Figure 7: Dynamic test

MELs, MSCs and BMCs were effective to restore a normal walk in comparison with vehicle.

(* Comparison of MSCs group *versus* BMCs group; # MELs *versus* BMCs; ¥ MELs *versus* MSCs; § BMCs *versus* vehicle; Δ MSCs *versus* vehicle; ∞ MELs *versus* vehicle).

Figure 8: Neovessels visualization with CD31 and αSMA labelling

A and B: MSCs induced higher CD31+ capillaries rate than BMCs. MELs developed the highest CD31 rate in comparison with MSCs.

C and D: αSMA labelling indicated no significant difference between BMCs or vehicle. However MSCs provided a higher ratio than BMCs. MELs led to the highest αSMA + capillaries.

(* Comparison of MSCs group *versus* BMCs group; # MELs *versus* BMCs; ¥ MELs *versus* MSCs; § BMCs *versus* vehicle; Δ MSCs *versus* vehicle; ∞ MELs *versus* vehicle).

Figure 9: Evaluation of muscle repair

There was no significant difference between BMCs and vehicle. MSCs induced higher muscle repair than BMCs. MELs led to the highest muscle repair in comparison with MSCs.

(* Comparison of MSCs group *versus* BMCs group; # MELs *versus* BMCs; ¥ MELs *versus* MSCs; § BMCs *versus* vehicle; Δ MSCs *versus* vehicle; ∞ MELs *versus* vehicle).

Table 1: Patient characteristics

Quantitative variables are expressed as median or absolute value. Biologic markers measured in 7 NO-CLI patients on day 0 (baseline) before cell therapy.

^a cardioprotective drugs use: antiplatelet therapy (AT), statins (S), angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACEI)

^b Other cells: blasts, immature granulocytes and plasma cells.

^c CFU-F number/ 1.10^6 nucleated cells

∅: Patient alive without any major amputation

Table 1 Patient characteristics

	1	2	3	4	5	6	7
Patients characteristics:							
Age (years)	74	57	52	57	74	62	42
Gender (M: male; F: female)	M	M	M	M	F	M	M
BMI (kg/m ²)	27	25	26	32	20	22	21
Smoker	no	past	past	past	no	past	current
Arterial hypertension	yes	yes	no	no	no	yes	no
Hyperlipidemia	yes	no	yes	no	yes	no	no
Diabetes mellitus	yes	no	yes	no	no	no	no
<i>Disease characteristics:</i>							
- TcPO ₂ (mmHg)	26	30	64	35	45	1	7
- Presence of ulcers	no	no	yes	no	no	no	no
<i>Cardioprotective drugs use^a:</i>							
	AT, ACEI	AT, ACEI, S	AT, ACEI, S	AT, ACEI, S	AT	AT, S	AT, S
BMC characterization							
PLTs (G/L):	746	740	478	590	384	1296	1118
Total nucleated cells (G/L):	47	60	38	48	50	76	71
<i>Total MNCs:</i>							
- Lymphocytes (%):	46	47	39	41	48	46	54
- Monocytes (%):	18	12	28	18	19	14	13
- Erythroblasts and other cells ^b (%):	10.5	14.3	10.4	19.8	12.7	13.2	14.5
Mature granulocytes (%):	23	23	18	16	17	23	16
HSCs (CD34+ cells) (%):	2.5	3.7	4.6	5.2	3.3	3.8	2.5
MSCs ^c :	42	38	34	58	28	12	60
Placebo or BMCs group	BMCs	BMCs	Placebo	Placebo	BMCs	BMCs	Placebo
Clinical outcome at 6 months	∅	∅	∅	∅	∅	Revascularization at day 126	Major amputation at day 114
Clinical outcome at 12 months	Revascularization at day 332	∅	∅	∅	∅	∅	∅

Figure 1. Study design

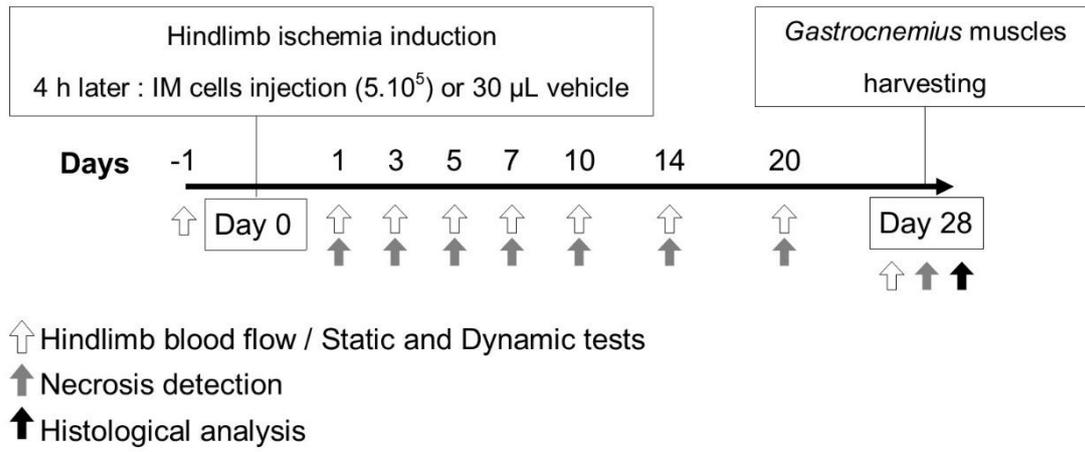


Figure 2. Cells observation and characterization by flow cytometry

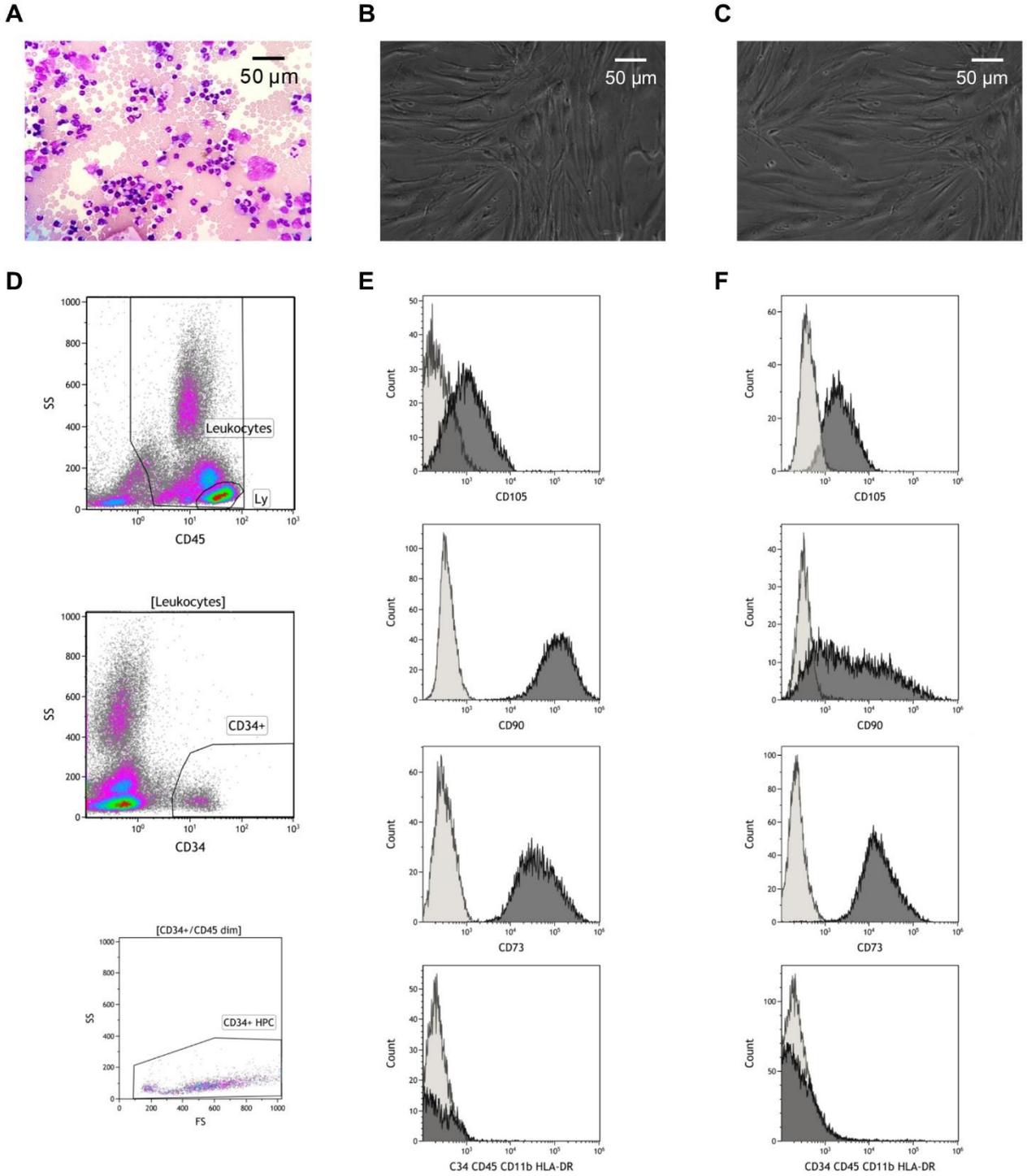


Figure 3. Analysis of cord-like structures on Matrigel

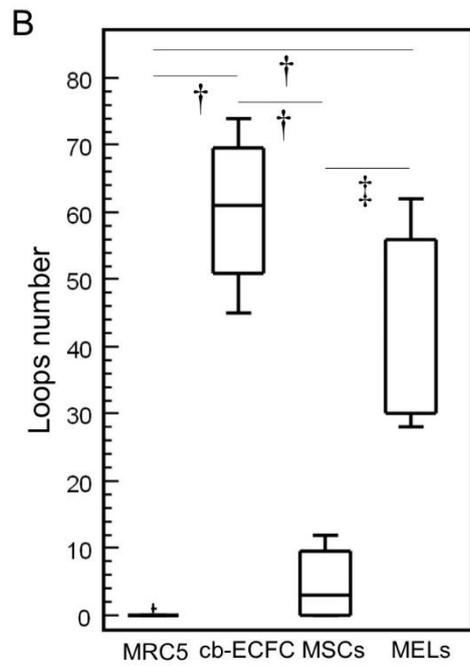
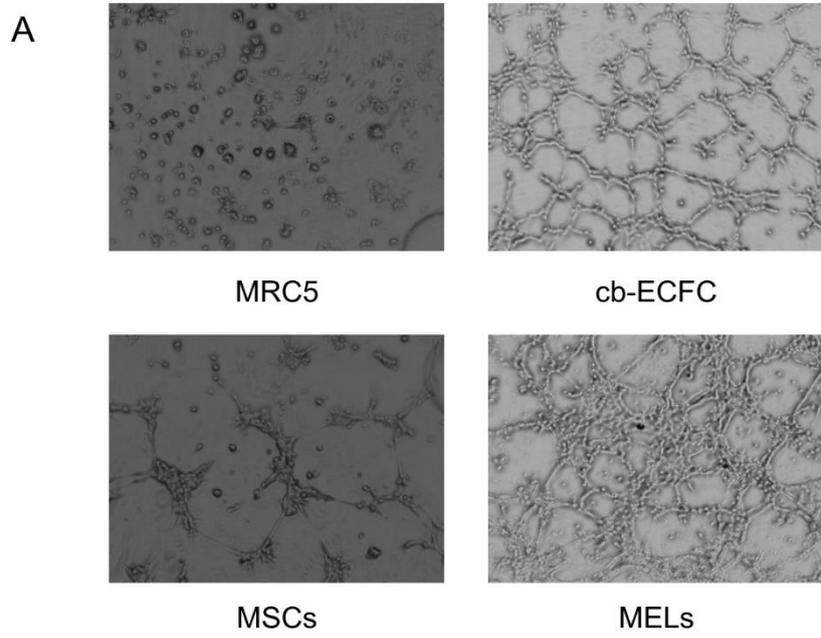


Figure 5. Limb survival

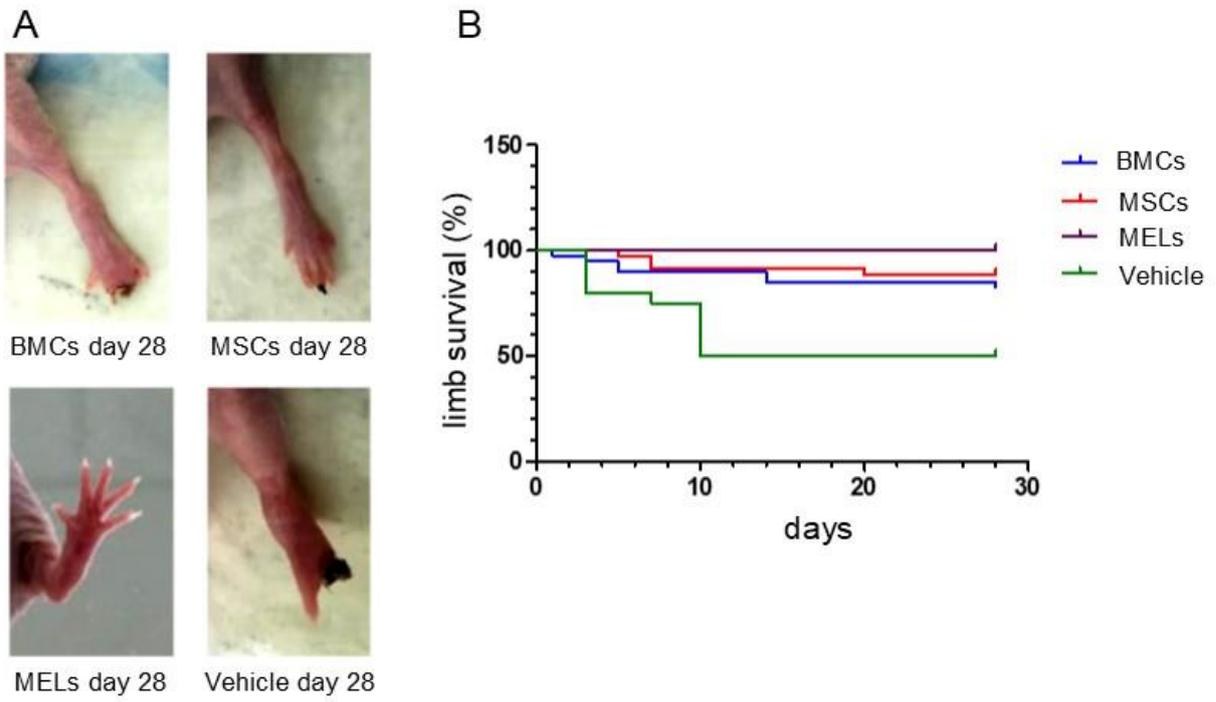


Figure 6. Static test

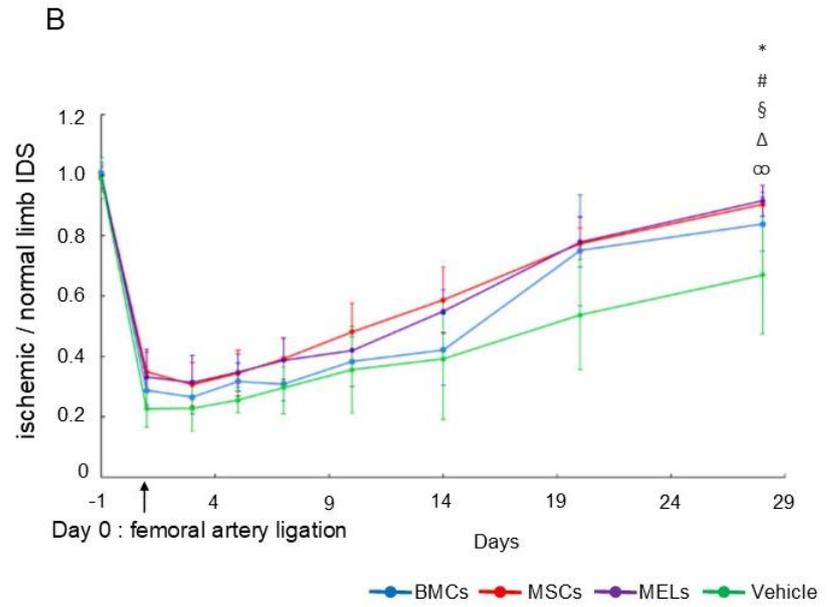
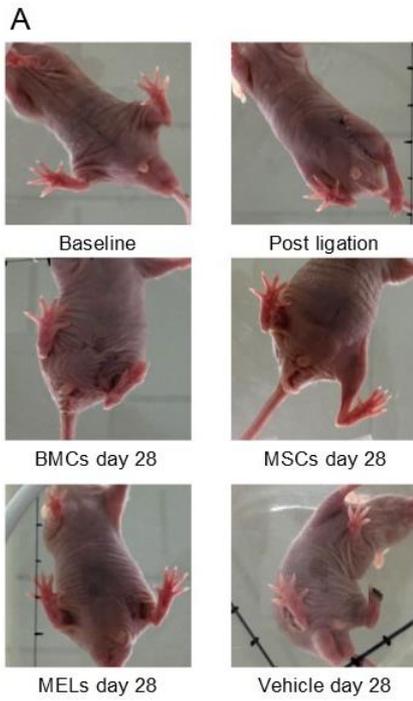


Figure 7. Dynamic test

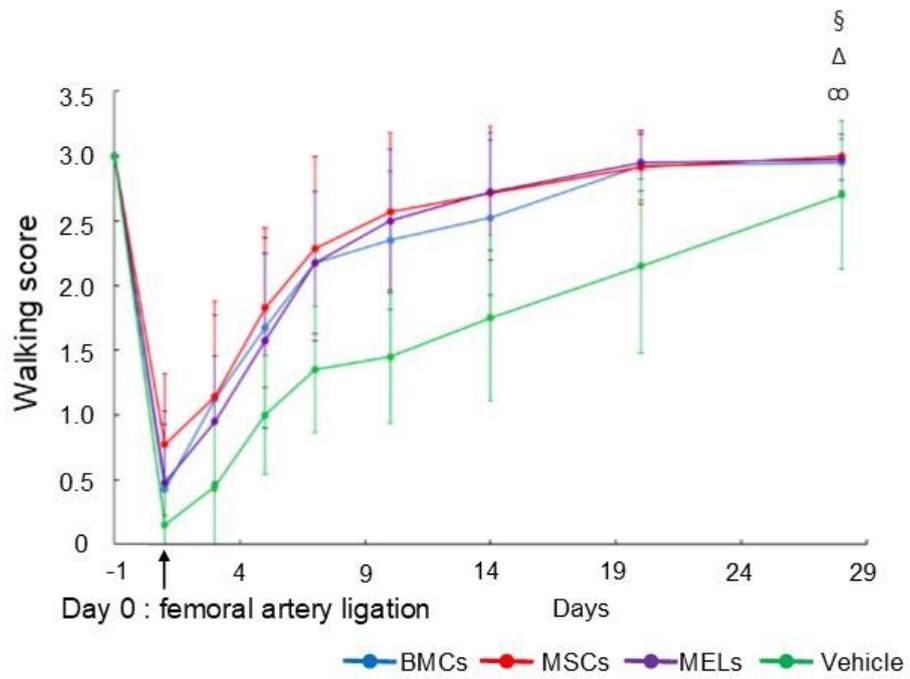


Figure 8. Neovessels visualization with CD31 and α SMA labelling

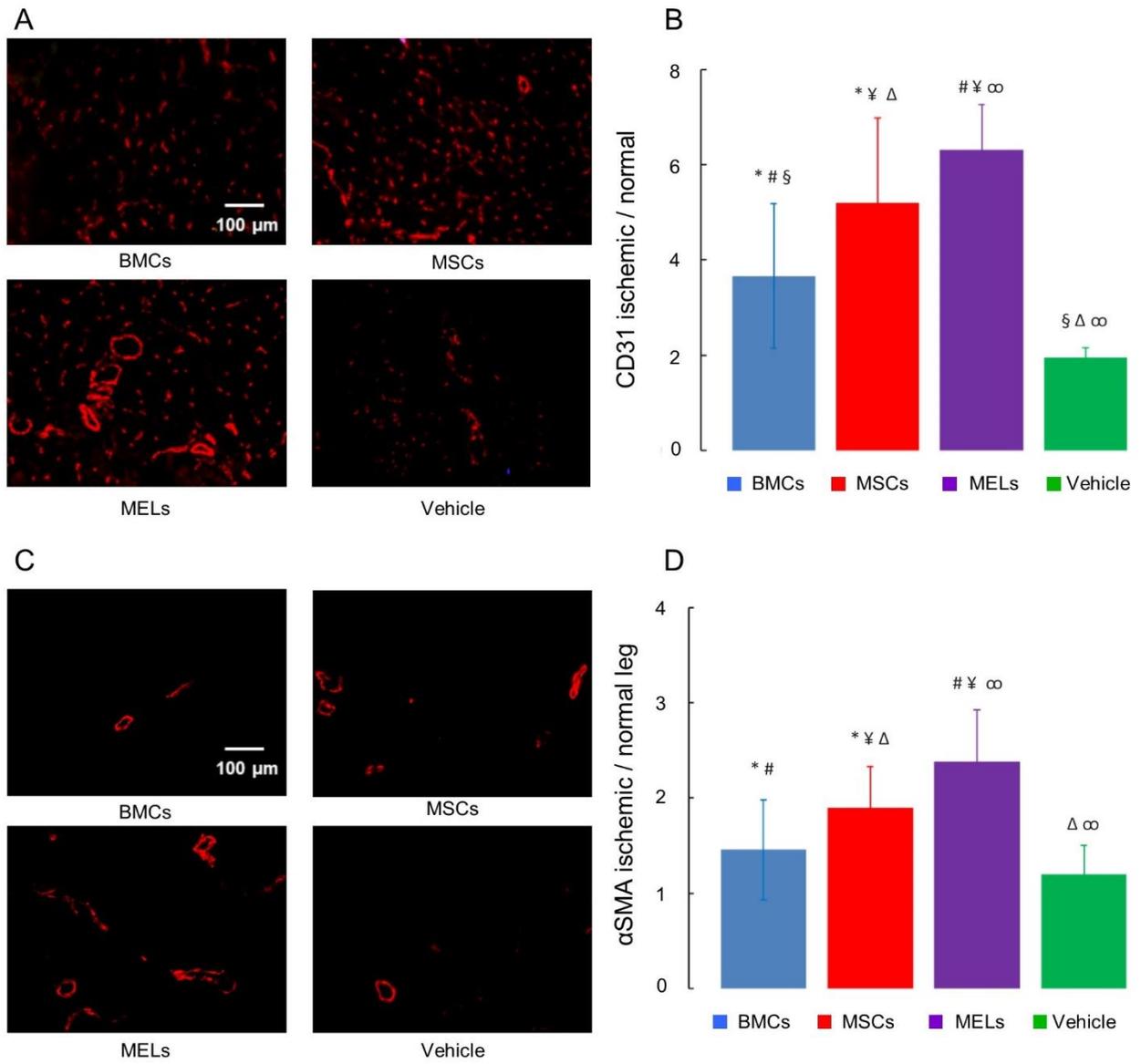
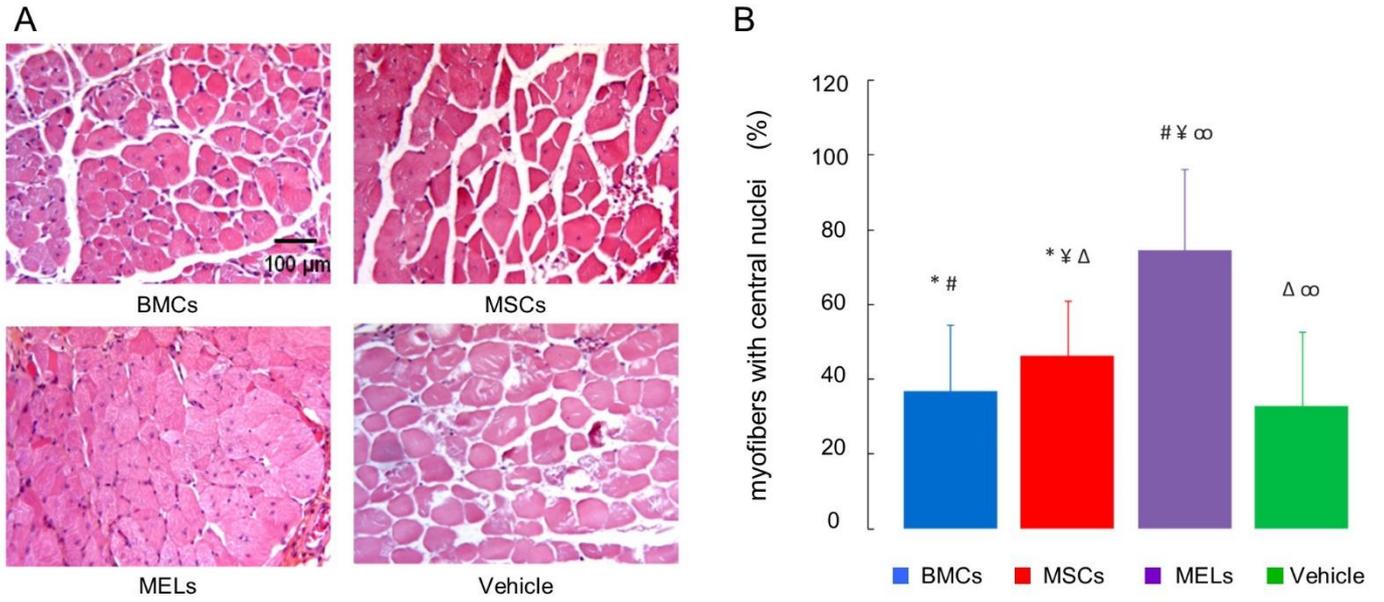


Figure 9. Evaluation of muscle repair



REFERENCES

1. Criqui MH, Aboyans V: Epidemiology of peripheral artery disease. *Circ Res* 2015, **116**:1509-1526.
2. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG: Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg* 2007, **45 Suppl S**:S5-67.
3. Gupta NK, Armstrong EJ, Parikh SA: The current state of stem cell therapy for peripheral artery disease. *Curr Cardiol Rep* 2014, **16**:447.
4. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, et al: 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**:427-435.
5. Matoba S, Tatsumi T, Murohara T, Imaizumi T, Katsuda Y, Ito M, Saito Y, Uemura S, Suzuki H, Fukumoto S, et al: 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**:1010-1018.
6. Van Tongeren RB, Hamming JF, Fibbe WE, Van Weel V, Frerichs SJ, Stiggelbout AM, Van Bockel JH, Lindeman JH: Intramuscular or combined intramuscular/intra-arterial administration of bone marrow mononuclear cells: a clinical trial in patients with advanced limb ischemia. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2008, **49**:51-58.
7. Prochazka V, Gumulec J, Jaluvka F, Salounova D, Jonszta T, Czerny D, Krajca J, Urbanec R, Klement P, Martinek J, Klement GL: Cell therapy, a new standard in management of chronic critical limb ischemia and foot ulcer. *Cell Transplant* 2010, **19**:1413-1424.
8. Walter DH, Krankenberg H, Balzer JO, Kalka C, Baumgartner I, Schluter M, Tonn T, Seeger F, Dimmeler S, Lindhoff-Last E, Zeiher AM: 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**:26-37.

9. Benoit E, O'Donnell TF, Patel AN: Safety and efficacy of autologous cell therapy in critical limb ischemia: a systematic review. *Cell Transplant* 2013, **22**:545-562.
10. Li M, Zhou H, Jin X, Wang M, Zhang S, Xu L: Autologous bone marrow mononuclear cells transplant in patients with critical leg ischemia: preliminary clinical results. *Exp Clin Transplant* 2013, **11**:435-439.
11. Teraa M, Sprengers RW, Schutgens RE, Slaper-Cortenbach IC, van der Graaf Y, Algra A, van der Tweel I, Doevendans PA, Mali WP, Moll FL, Verhaar MC: Effect of repetitive intra-arterial infusion of bone marrow mononuclear cells in patients with no-option limb ischemia: the randomized, double-blind, placebo-controlled Rejuvenating Endothelial Progenitor Cells via Transcutaneous Intra-arterial Supplementation (JUVENTAS) trial. *Circulation* 2015, **131**:851-860.
12. Peeters Weem SM, Teraa M, de Borst GJ, Verhaar MC, Moll FL: Bone Marrow derived Cell Therapy in Critical Limb Ischemia: A Meta-analysis of Randomized Placebo Controlled Trials. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2015, **50**:775-783.
13. Dimmeler S, Leri A: Aging and disease as modifiers of efficacy of cell therapy. *Circ Res* 2008, **102**:1319-1330.
14. Pignon B, Sevestre MA, Kanagaratnam L, Pernod G, Stephan D, Emmerich J, Clement C, Sarlon G, Boulon C, Tournois C, Nguyen P: Autologous Bone Marrow Mononuclear Cell Implantation and Its Impact on the Outcome of Patients With Critical Limb Ischemia- Results of a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Circ J* 2017, **81**:1713-1720.
15. Tournois C, Pignon B, Sevestre MA, Al-Rifai R, Creuza V, Poitevin G, Francois C, Nguyen P: Cell therapy in critical limb ischemia: A comprehensive analysis of two cell therapy products. *Cytotherapy* 2017, **19**:299-310.
16. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN: Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976, **4**:267-274.
17. Liew A, O'Brien T: Therapeutic potential for mesenchymal stem cell transplantation in critical limb ischemia. *Stem Cell Res Ther* 2012, **3**:28.
18. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J: Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007, **25**:2739-2749.

19. Lawall H, Bramlage P, Amann B: Treatment of peripheral arterial disease using stem and progenitor cell therapy. *J Vasc Surg* 2011, **53**:445-453.
20. Rice CM, Scolding NJ: Adult human mesenchymal cells proliferate and migrate in response to chemokines expressed in demyelination. *Cell Adh Migr* 2010, **4**:235-240.
21. Lu D, Chen B, Liang Z, Deng W, Jiang Y, Li S, Xu J, Wu Q, Zhang Z, Xie B, Chen S: Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: a double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Res Clin Pract* 2011, **92**:26-36.
22. Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhauser M, Werner C: Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 2004, **22**:377-384.
23. Liu JW, Dunoyer-Geindre S, Serre-Beinier V, Mai G, Lambert JF, Fish RJ, Pernod G, Buehler L, Bounameaux H, Kruithof EK: Characterization of endothelial-like cells derived from human mesenchymal stem cells. *J Thromb Haemost* 2007, **5**:826-834.
24. Janeczek Portalska K, Leferink A, Groen N, Fernandes H, Moroni L, van Blitterswijk C, de Boer J: Endothelial differentiation of mesenchymal stromal cells. *PLoS One* 2012, **7**:e46842.
25. Cucuini W, Poitevin S, Poitevin G, Dignat-George F, Cornillet-Lefebvre P, Sabatier F, Nguyen P: Tissue factor up-regulation in proinflammatory conditions confers thrombin generation capacity to endothelial colony-forming cells without influencing non-coagulant properties in vitro. *J Thromb Haemost* 2010, **8**:2042-2052.
26. Limbourg A, Korff T, Napp LC, Schaper W, Drexler H, Limbourg FP: Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia. *Nat Protoc* 2009, **4**:1737-1746.
27. Brenes RA, Jadowiec CC, Bear M, Hashim P, Protack CD, Li X, Lv W, Collins MJ, Dardik A: Toward a mouse model of hind limb ischemia to test therapeutic angiogenesis. *J Vasc Surg* 2012, **56**:1669-1679; discussion 1679.
28. Cadot B, Gache V, Gomes ER: Moving and positioning the nucleus in skeletal muscle - one step at a time. *Nucleus* 2015, **6**:373-381.

29. Roman W, Gomes ER: Nuclear positioning in skeletal muscle. *Semin Cell Dev Biol* 2017.
30. Koutakis P, Myers SA, Cluff K, Ha DM, Haynatzki G, McComb RD, Uchida K, Miserlis D, Papoutsi E, Johanning JM, et al: Abnormal myofiber morphology and limb dysfunction in claudication. *J Surg Res* 2015, **196**:172-179.
31. Smadja DM, d'Audigier C, Guerin CL, Mauge L, Dizier B, Silvestre JS, Dal Cortivo L, Gaussem P, Emmerich J: Angiogenic potential of BM MSCs derived from patients with critical leg ischemia. *Bone Marrow Transplant* 2012, **47**:997-1000.
32. Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Murakami S, Matsumoto T, Kangawa K, Kitamura S: Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. *Cardiovasc Res* 2005, **66**:543-551.
33. Bergers G, Song S: The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol* 2005, **7**:452-464.
34. Heemskerk AM, Strijkers GJ, Drost MR, van Bochove GS, Nicolay K: Skeletal muscle degeneration and regeneration after femoral artery ligation in mice: monitoring with diffusion MR imaging. *Radiology* 2007, **243**:413-421.
35. Li Z, Wilson KD, Smith B, Kraft DL, Jia F, Huang M, Xie X, Robbins RC, Gambhir SS, Weissman IL, Wu JC: Functional and transcriptional characterization of human embryonic stem cell-derived endothelial cells for treatment of myocardial infarction. *PLoS One* 2009, **4**:e8443.
36. Zimmerlin L, Park TS, Zambidis ET, Donnenberg VS, Donnenberg AD: Mesenchymal stem cell secretome and regenerative therapy after cancer. *Biochimie* 2013, **95**:2235-2245.
37. Bussche L, Van de Walle GR: Peripheral Blood-Derived Mesenchymal Stromal Cells Promote Angiogenesis via Paracrine Stimulation of Vascular Endothelial Growth Factor Secretion in the Equine Model. *Stem Cells Transl Med* 2014, **3**:1514-1525.
38. Choi M, Lee HS, Naidansaren P, Kim HK, O E, Cha JH, Ahn HY, Yang PI, Shin JC, Joe YA: Proangiogenic features of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal/stem cells and their ability to form functional vessels. *Int J Biochem Cell Biol* 2013, **45**:560-570.

39. Chen L, Xu Y, Zhao J, Zhang Z, Yang R, Xie J, Liu X, Qi S: Conditioned medium from hypoxic bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhances wound healing in mice. *PLoS One* 2014, **9**:e96161.
40. Kim SW, Han H, Chae GT, Lee SH, Bo S, Yoon JH, Lee YS, Lee KS, Park HK, Kang KS: Successful stem cell therapy using umbilical cord blood-derived multipotent stem cells for Buerger's disease and ischemic limb disease animal model. *Stem Cells* 2006, **24**:1620-1626.
41. Dash NR, Dash SN, Routray P, Mohapatra S, Mohapatra PC: Targeting nonhealing ulcers of lower extremity in human through autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Rejuvenation Res* 2009, **12**:359-366.
42. Lasala GP, Silva JA, Gardner PA, Minguell JJ: Combination stem cell therapy for the treatment of severe limb ischemia: safety and efficacy analysis. *Angiology* 2010, **61**:551-556.
43. Powell RJ, Comerota AJ, Berceci SA, Guzman R, Henry TD, Tzeng E, Velazquez O, Marston WA, Bartel RL, Longcore A, et al: Interim analysis results from the RESTORE-CLI, a randomized, double-blind multicenter phase II trial comparing expanded autologous bone marrow-derived tissue repair cells and placebo in patients with critical limb ischemia. *J Vasc Surg* 2011, **54**:1032-1041.
44. Lasala GP, Silva JA, Minguell JJ: Therapeutic angiogenesis in patients with severe limb ischemia by transplantation of a combination stem cell product. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012, **144**:377-382.
45. Gupta PK, Chullikana A, Parakh R, Desai S, Das A, Gottipamula S, Krishnamurthy S, Anthony N, Pherwani A, Majumdar AS: A double blind randomized placebo controlled phase I/II study assessing the safety and efficacy of allogeneic bone marrow derived mesenchymal stem cell in critical limb ischemia. *J Transl Med* 2013, **11**:143.
46. Bura A, Planat-Benard V, Bourin P, Silvestre JS, Gross F, Grolleau JL, Saint-Lebesse B, Peyrafitte JA, Fleury S, Gadelorge M, et al: Phase I trial: the use of autologous cultured adipose-derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia. *Cytotherapy* 2014, **16**:245-257.

IX. ARTICLE 3

SUBCUTANEOUS AND TRANSCUTANEOUS MONITORING OF MURINE HINDLIMB ISCHEMIA BY *IN VIVO* RAMAN SPECTROSCOPY

Rida Al-Rifai², Claire Tournois^{1,2}, Samar Kheirallah³, Nicole Bouland⁴, Gaël Poitevin², Philippe Nguyen^{1,2}, Abdelilah Beljebbar⁵

¹ Laboratoire d'Hématologie, CHU Robert Debré, Reims, France.

² EA-3801, SFR CAP-santé, Université de Reims Champagne-Ardenne, France.

³ Service d'anatomopathologie, CHU, Reims, France.

⁴ Laboratoire d'anatomopathologie, Université de Reims Champagne-Ardenne, France

⁵ BioSpectroscopy Translationnelle BioSpecT, EA 7506, Université de Reims Champagne-Ardenne, UFR de Pharmacie, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims, France.

Introduction :

Il existe actuellement très peu de données publiées se rapportant au site d'implantation des cellules en TC de l'AOMI. Il est pourtant logique de penser que l'ischémie crée un environnement défavorable à la survie cellulaire : hypoxie, acidose, remaniements tissulaires, phénomènes inflammatoires, toxicité des radicaux libres générés localement. Ces remaniements délétères pourraient expliquer pourquoi certains des patients que nous avons traités ont été amputés très précocement (7 à 9 jours post-implantation). Il est indispensable, pour progresser dans la TC, de disposer d'une cartographie des lésions ischémiques.

Les résultats de l'article 2 nous ont permis de faire la lumière sur l'importance de la régénération musculaire post-ischémique. Ce tissu, affecté par l'ischémie, se dégrade puis développe des mécanismes de régénération qui sont indispensables à une récupération fonctionnelle. Nous nous sommes aperçus que les MELs permettaient

d'induire un taux de régénération musculaire supérieur aux autres cellules. Il apparaît également que l'analyse du site implantatoire est un élément majeur dans la réussite de TC. Cependant, cette analyse histologique est invasive et à l'heure actuelle, il n'existe pas de moyen d'explorer le tissu musculaire de manière non invasive. L'objectif de cet article a été de développer chez un modèle animal une méthode non invasive du tissu musculaire en s'appuyant sur la Spectroscopie Raman. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr Abdelilah Beljebbar de l'unité BioSpecT (Translational BioSpectroscopy EA 7506, Université de Reims Champagne-Ardenne).

Matériel et Méthodes :

Modèle animal :

Une ligature de l'artère fémorale commune gauche a été réalisée chez 26 souris mâle BALB/c. Les souris ont été réparties en deux lots : un groupe a été réservé pour les analyses en sous-cutané (n=12) et un groupe pour les analyses en transcutané (n=14). Le groupe « sous-cutané » a également été subdivisé en sous-groupes de deux souris pour chaque jour d'étude.

Suivi du flux sanguin par PeriCam® :

Le flux sanguin a été contrôlé par PeriCam® dans les membres inférieurs durant 55 jours. Les souris sont anesthésiées à l'isoflurane durant la mesure. Les résultats sont exprimés en ratio de perfusion du membre ischémié / membre sain.

Spectroscopie Raman :

Les acquisitions sont réalisées sur animal anesthésié sur l'ensemble de la patte saine ainsi que la patte ischémiée durant 55 jours.

- ✓ **Pour le groupe « sous-cutané » :** A chaque jour d'étude, un sous-groupe de 2 souris est utilisé. Dans un premier temps, les acquisitions sont faites à travers la peau. Afin de s'affranchir de l'interférence spectrale de la peau, celle-ci est retirée. Dans un second temps, de nouvelles acquisitions sont faites directement sur le muscle. A la fin de l'analyse, l'animal est sacrifié et les muscles prélevés.

- ✓ **Pour le groupe « transcutané »** : les acquisitions sont réalisées à travers la peau pour chaque jour d'étude jusqu'au 55^{ème} jour (analyse longitudinale).

Tests fonctionnels :

La récupération fonctionnelle a été évaluée par l'utilisation d'un test statique et d'un teste dynamique durant 28 jours. Le test statique repose sur la mesure de l'espace interdigital entre le 1^{er} et le 5^{ème} orteil de chaque patte. Le test dynamique évalue le score de marche des souris.

Histologie :

Les muscles *Gastrocnemius* sont prélevés afin d'évaluer la réparation musculaire. Celle-ci est estimée par le pourcentage de fibres musculaires présentant des noyaux centraux après coloration des biopsies à l'hématoxyline éosine.

Résultats et Discussion :

La durée moyenne de suivi des rongeurs dans les essais précliniques publiés est limitée à une trentaine de jours. Leur critère principal de jugement est le rétablissement du flux sanguin à l'état basal

Un flux sanguin restauré ne suffit pas à récupérer une fonctionnalité :

Les souris retrouvent un flux sanguin de base à J22 post-intervention chirurgicale. Cependant, l'espace interdigital n'est rétabli que plus tard. Ceci concorde avec les données de la littérature selon lesquelles la fonctionnalité et le flux sanguin ne sont pas corrélés.

Le muscle squelettique engage un processus de réparation post-ischémique :

Le tissu musculaire squelettique est affecté par l'ischémie et se dégrade dans les heures suivant l'installation de la ligature. Cette dégradation est marquée par la présence de fibres musculaires très atrophiées avec des espaces lacunaires importants pouvant suggérer le développement d'un œdème. Ce dernier peut se constater chez l'animal *in vivo* car le membre ischémié paraît gonflé et tendu jusqu'à 24 heures post induction de l'ischémie. Les jours suivants, des cellules inflammatoires

s'infiltrer dans le tissu et persistent jusqu'à 15 jours. Les premières fibres en régénération apparaissent à ce stade également. Conformément aux données de la littérature, les fibres ont un aspect plus arrondi et possèdent des noyaux centraux.

Le flux sanguin et la réparation musculaire ne sont pas simultanés :

En effet à J22, il persiste des traces d'inflammation, d'atrophie et le nombre des fibres en régénération continue de croître. A ce stade, les fibres n'ont pas récupéré leur forme polygonale et les noyaux ne sont toujours pas refoulés en périphérie. Le flux sanguin ne paraît donc pas suffisant pour nous informer de l'état du tissu musculaire dont la régénération suit des mécanismes indépendants.

La Spectroscopie Raman discrimine le tissu sain du tissu en ischémié :

Les signatures spectrales acquises au cours de ce travail indiquent que la spectroscopie Raman est un outil non invasif permettant de discriminer la patte saine de la patte ischémiée sans la peau dans un premier temps (preuve de concept) puis dans un second temps à travers la peau d'un animal vivant immobilisé. La spectroscopie Raman a été capable de discriminer chaque jour d'étude jusqu'au 55^{ème} jour alors que le flux sanguin avait rejoint son taux basal dès le 22^{ème} jour. La spectroscopie Raman est une technique non invasive et indolore qui pourrait dans notre hypothèse de travail discriminer les zones tissulaires ischémiées

Subcutaneous and transcutaneous monitoring of murine Hindlimb ischemia by *in vivo*

Raman spectroscopy

Rida Al-Rifai¹, Claire Tournois^{1,2}, Samar Kheirallah³, Nicole Bouland⁴, Gaël Poitevin¹,
Philippe Nguyen^{1,2}, Abdelilah Beljebbar^{5*}

¹ EA 3801, SFR CAP-santé, Université de Reims Champagne-Ardenne, France

² Laboratoire d'Hématologie, CHU Robert Debré, Reims, France.

³ Service d'anatomopathologie, CHU, Reims, France.

⁴ Laboratoire d'anatomopathologie, Université de Reims Champagne-Ardenne, France.

⁵ BioSpectroscopie Translationnelle BioSpecT, EA 7506, Université de Reims Champagne-Ardenne, France.

*: Correspondence should be sent to:

Dr. Abdelilah BELJEBBAR
BioSpectroscopie Translationnelle, EA 7506
UFR de Pharmacie, SFR CAP-Santé FED4231
Université de Reims Champagne-Ardenne
51, rue Cognacq-Jay,
51096 Reims CEDEX, France

Phone: (33) 3 2691-8376
Fax: (33) 3 2691-8282
E-mail: abdelilah.beljebbar@univ-reims.fr

Key words: Ischemia, Hindlimb blood flow, Peripheral arterial disease, Functional Tests, *In vivo* Raman spectroscopy, Spectroscopic markers

ABSTRACT

We have investigated the murine Hindlimb ischemia development from day 1 to day 55 after femoral artery ligation (FAL) using blood flow analysis, functional tests, histopathological staining, and *in vivo* Raman spectroscopy coupled to InPhotonics fiber optical probe. FAL resulted in hindlimb blood deprivation and loss of functionality as attested by blood flow analysis and functional tests respectively. The limbs recovered progressively a normal circulation without recovering complete functionality. Histological analysis showed changes in the muscle fibers morphology with intense inflammation. From day 22 to day 55 post-ischemia, a fiber regeneration was observed with a different form of myofibers. Raman spectroscopic results related to subcutaneous analysis have identified changes in biochemical constituents of hindlimb muscles during disease progression. Ischemia was characterized by a quantitative increase in lipid content and a decrease in protein content. The lipid to protein ratio could be used as a spectroscopic marker to score the severity of ischemia. Multivariate statistical analysis PC-LDA (Principal Component-Linear Discriminant Analysis) was used to classify all data measured on normal and ischemic tissues. This classification illustrated an excellent separation between control and ischemia, and this at any time during the course of ischemic development. *In vivo* Raman spectroscopy was then applied to assess the potential of this technique as a screening tool to explore non-invasively (transcutaneously) an ischemic disease. For this purpose, the influence of skin on diagnostic accuracy was evaluated: Transcutaneous analysis revealed the accuracy of this technique indicating its potential for the monitoring, *in situ*, muscle structural changes during ischemia.

INTRODUCTION

Critical limb ischemia (CLI) is the most severe form of atherosclerotic peripheral arterial disease (PAD). PAD is characterized by the atherosclerotic obstruction of arteries supplying the lower extremities, which causes a progressive ischemic injury to the skeletal muscles. This disease incidence was predicted to double by 2050 due to increasing rates of obesity and risk factors in an aging population.¹ The PAD symptoms, including claudication, pain, ulcers and amputation have been presumed to be entirely due to reduced blood flow. The prevalence of this disease is difficult to estimate because almost 50% of patients with PAD are asymptomatic. The pathophysiology of PAD involves changes occurring on multiple levels including reduced blood flow, altered metabolic processes and muscle degeneration.² The muscles affected by PAD undergo significant metabolic and biochemical changes in the molecular content of its main constituents such as proteins, lipids and nucleotides. These biochemical alterations are not well understood.³ The ankle brachial index (ABI) test is widely used to screen asymptomatic and symptomatic patients and to monitor patients who have undergone radiological or surgical intervention. Many studies demonstrate that a myopathy in the skeletal muscles of symptomatic PAD patients may be a significant additional factor in the disease pathophysiology. Repeated episodes of ischemia have deleterious effects on limb skeletal musculature and are responsible of an inflammatory response.⁴ Other non-invasive methods such as ultrasonography and angiography (computed tomography and magnetic resonance imaging) provide information regarding blood flow, vessel wall thickness and plaque characteristics.⁵ The main limitations of these techniques concern the lack in the evaluation of the consequences of PAD on the chronically ischemic leg and muscles.⁶ There would be a great clinical interest in developing a rapid and non-invasive methodology enabling to monitor in real time and over time the morphological and biochemical changes occurring in muscle ischemia upon femoral artery ligation (FAL).

Raman spectroscopy is non-invasive and non-destructive providing intrinsic chemical composition on the sample without staining or labelling (label-free). This technique is based on the inelastic scattering of the light by molecules that are present in a biological sample such as cells and tissues. The technique is sensitive to changes in molecular composition as well as in molecular conformation that occur during tissue transformation. In the field of biomedical diagnosis, Raman spectroscopy has been widely applied to probe the alterations in the quantitative and qualitative molecular composition of tissues.⁷⁻¹⁰ Raman spectroscopy has been previously used to diagnosis of ischemia diseases especially for the biochemical characterization of the hippocampus after cerebral ischemia,¹¹ the analysis of the effect of ischemia on blood serum,¹² and the detection of myocardial ischemia.¹³ Cluff *et al.*, have demonstrated the potential of Raman spectroscopy to correlate the Raman spectral signature of muscle biochemistry with the severity of atherosclerosis in the legs as determined by the ABI.⁶ Other studies using spontaneous and coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) spectroscopic techniques allowed to discriminate healthy from ischemic tissues of human *Gastrocnemius* biopsies of control and PAD patients.¹⁴ One of the key advantages of Raman spectroscopy is its ability to be used for *in vivo* studies.

The main objective of this study was to evaluate the ability of Raman spectroscopy to discriminate *in vivo* ischemia from control. For this, we used a mouse model of hindlimb ischemia that mimics human critical limb ischemia (CLI). Subcutaneous *in vivo* measurements were performed on mouse hindlimb to assess the potential of this technique as screening tool to explore the ischemia disease progression. Non-invasive transcutaneous measurements allowed us to evaluate the influence of skin on the accuracy of this tool to discriminate between healthy and ischemic hindlimbs.

To our knowledge, this is the first study on the use of *in vivo* Raman spectroscopy to characterize biochemical changes resulting from PAD. Blood flow analysis and functional tests

were applied to probe the vascular repair of hindlimb and muscle regeneration. At the end of each experiment, animals were sacrificed and histopathological analysis was performed to describe muscle morphological changes during hindlimb ischemia progression. These results were correlated with spectroscopic data to identify the specific Raman spectroscopic markers of this disease.

MATERIEL AND METHODS

Murine hindlimb ischemia model (HLIM)

All protocols were approved by C2EA-56 (ethics committee in animal experimentation of Reims Champagne Ardenne, authorization number 2016022412165910). Twenty-six male BALB/c mice (Charles River Laboratories, l'Arbresle, France), 11 weeks of age were used for all experiments. Mice were housed two per cage in a temperature- and humidity-controlled room that was maintained on 12/12 hour-light/dark cycles. Animals had free access to food and water. Surgical procedures were performed to create hindlimb ischemia in mice. Animals were placed on a 38°C heating pad and were anesthetized by continuous inhalation of isoflurane (5% in induction and 2% during the intervention). Exposure was obtained by performing an incision in the skin overlying the high portion of the left hindlimb next to the inguinal ligament. The common left femoral artery was ligated with a non-absorbable 6.0 silk thread. Then the skin was closed with absorbable sutures. Buprenorphine was administered as analgesic (0.05 mg/kg twice a day for three days).

Study design

Twenty six mice were used. The day before inducing ischemia (day-1), animals were anesthetized and hindlimb blood flow (HBF), static and dynamic tests (SDT) and *in vivo* Raman spectroscopy (IVRS) were performed on both hindlimbs (left ischemic leg and right normal leg used as internal control). These measurements were used as control. Figure 1 showed the flow diagram and study design. The animals were then divided in two groups for subcutaneous (n=12) and transcutaneous (n=14) analysis:

- **For subcutaneous analysis**, ischemia was induced on the left hindlimb of each mouse by a left FAL (day 0). In order to describe the course of ischemia overtime, ischemic

mice were divided in 7 subgroups of 2 animals, which were analyzed and sacrificed at day 1, 5, 8, 15, 19, 22, and up 55, to obtain histological samples. In each subgroup, HBF and SDT were recorded on both mice hindlimbs. The mice hindlimbs skin was then gently removed in order to expose the underlying muscle tissues. Ten *in vivo* Raman spectra were recorded at different location on tissue. After Raman analysis, the mice were sacrificed for histological examination.

- **For transcutaneous group**, mouse hair were removed from the hindlimbs with an appropriate cream, rinsed several times with alcohol then with water before each IVRS measurements. For each day experiment, Raman spectra were performed in identical experimental conditions than for the subcutaneous group. The animals were then housed under standard conditions until the next measurement over 55 days.

Blood Flow Analysis

Perfusion of lower limbs was monitored with PeriCam® perfusion imaging (PeriCam® PSI, Perimed, Craponne, France) before and after the interventional or surgical procedure (days -1, 1, 5, 8, 15, 19, 22 and 55 post surgery). Measurements were taken under anesthesia with isoflurane and on a heating pad at 38°C. Low or no blood perfusion was displayed as dark blue, whereas the highest perfusion was displayed as red. After blood flow was acquired during 30 seconds, stored records were analyzed with PimSoft® software and the mean flows of ischemic and non-ischemic limbs were quantified. The average blood flow was calculated and the LDI index was determined as the ratio of ischemic to non-ischemic hindlimb blood perfusion. The data were expressed as means ± standard deviation (SD).

Functional Tests

Two functional tests were used to evaluate clinical recovery after ischemia induction:

- **A static test** was used to quantify the evolution of the interdigital spacing (IDS). Indeed, after surgical ligation, ischemic mouse paw retracted. Mice were placed in a transparent container and were observed from the bottom to visualize their IDS between the first and the 5th toe. IDS was measured using Image J software®. Measurements were taken at day -1, 1, 5, 8, 15, 19, 22, and 55 post surgery. Clinical improvement was testified by the gradual recovery of IDS. The results were expressed as ratio ischemic / normal IDS. The mean and the SD were used per group.
- **A dynamic test** was performed to evaluate the impaired use of ischemic limb. Mice progressed in a transparent corridor to quantify their walk (score 0: the mouse does not use the ischemic paw - score 0.3: the mouse can rely on the ischemic paw - score 0.67: the mouse can use it ischemic paw but claudicates - score 1: normal walk). Measures were taken at day -1, 1, 5, 8, 15, 19, 22 and 55 post surgery.

Raman Spectroscopy

Spectra were recorded with HE-785 commercial Raman spectrometer (Jobin-Vyon-Horiba, France). The spectrometer consists in a high efficiency (HE) spectrograph with a fixed 950 gr/mm grating coupled to a matrix charge coupled device (CCD) detector cooled by a Peltier effect at 200 K (Andor Technologies, South Windsor, CT, USA). Commercially available In Photonics (Inc, Downy St. USA) fiberoptic probe was used to couple excitation source and detection system. A fiber probe composed of a 100- μm excitation fiber and a 200- μm collection fiber was used (Inphotonics, USA). A bandpass filter, a beam splitter, a lens, a mirror, and a longpass filter were integrated in the compact probe head. The laser light was transmitted through a 100- μm fiber to the sample; the 200- μm fiber probe collected the Raman signals from the sample and directed it to the spectrometer. This fiber probe has a focal distance of 5 mm. The excitation source (785 nm) was provided by OEM diode laser (Process Instruments Inc.,

Salt Lake City, USA). The output power at the distal end of the excitation fiber was 120 mW. This laser power did not induce any thermal damages. Ten spectra were recorded from each sample at different points. All spectra were acquired using a 10 sec integration time in the range from 200 to 3200 cm^{-1} . Data acquisition was performed using the Labspec 5.0 software (HORIBA Jobin Yvon).

Prior to and after each measurement, the probe was rinsed with 70% (v/v) ethanol, then washed with sterile distilled water, and dried before use in order to avoid the contamination of the probe and reduce the infection risk.

Spectral pre-treatment:

Various data processing were performed to extract the tissue Raman signal from the raw measured spectra. Data pretreatment consisted in fluorescence background subtraction, cosmic ray removal, wavenumber calibration, instrument response correction, and subsequent linearization of the wavenumber axis. Wavenumber calibration was performed using two Raman calibration standards, 4-acetamidophenol and cyclohexane, along with the emission lines of neon lamp. The wavelength-dependent signal detection efficiency of the setup was measured using a calibration standard (standard reference material number- 2241; NIST, Gaithersburg, MD, USA). Cosmic rays were removed from the spectra. The broad background spectrum due to tissue autofluorescence was subtracted using a fifth order polynomial fit.

Data treatment

Before multivariate statistical analysis, data were smoothed using a seven point Savitzky-Golay algorithm. The resulting spectra were then normalized using a Standard Normal Variate (SNV) procedure. Principal Component-Linear Discriminant Analysis (PC-LDA) was employed for data analysis. PCA was performed on the data set to reduce the dimension of Raman spectral space while retaining the most significant information for classification. The PCs, accounting

for 95% of the variance captured served as input for LDA. LDA followed by Leave-One-Out (LOO) cross-validation was used to build the discrimination model between normal and ischemia. The classification accuracy was verified using the leave-one-out method. In this method, one spectrum was excluded from the dataset and the classifier was trained with the remaining samples. The excluded signal was then used as test data and the classification accuracy is determined. This was repeated for all samples of the dataset. The results of PC-LDA was displayed as scatter plots, generated by plotting various combinations of scores of factors used for discrimination. The processing on Raman data was performed with Matlab (Version 7.6, MathWorks)

Histological analysis

Immediately after *in vivo* Raman analysis, mice were sacrificed, and muscles from ischemic and contralateral limbs were harvested for histological analysis. Tissues were embedded in optimal cutting temperature (OCT) compound (F/KMA-0100-00A, MM France, Francheville, France) and frozen in liquid nitrogen. Frozen sections of 5- μ m thickness were cut using a cryomicrotome, and mounted on superfrost glass slides, and fixed in cold acetone for 20 minutes before staining with hematoxylin eosin. Thereafter, morphometric analysis was performed on hematoxylin eosin stained sections by an experienced pathologist. The correlation between Raman spectroscopy and histopathological analysis were achieved at each time point.

RESULTS AND DISCUSSION

Blood Flow and Functional recovery

As shown on figure 2A (Day 1), FAL led to blood deprivation in the downstream network. HBF recovery developed progressively in the ischemic limb from upstream to downstream (Figure 2A). The toes and whole limb were completely perfused at day 22 post-ligation (Figure 2A and 2C). This is in agreement with published data.^{15, 16} Indeed, as described by Limbourg *et al.*, HLIM could be obtained on BALB/c mice by ligating femoral artery immediately distal to the origin of the deep femoral branch. This procedure involved acute interruption of arterial supply and remained the most commonly used pre-clinical *in vivo* CLI-model. Moreover, BALB/c mouse is the most frequently used model.¹⁶ In figure 2C, results are expressed as perfusion ratios of the ischemic / control limb over time. FAL resulted in a decrease of the perfusion ratio from 1 to 0.34 ± 0.06 . This is approximately a target ratio to create ischemia in mice but while avoiding amputation.¹⁷ At day 5, $53\% \pm 8\%$ were recovered and at day 15, $82\% \pm 11\%$ were restored. HBF was completely restored from day 22 to the end of the study. For static test, the paw appeared completely retracted at day 1 post-ligation (Figure 2B).

As shown in figure 2C, the results are expressed as ischemic / control IDS ratio. FAL induced a reduction of IDS from 0.95 ± 0.07 at baseline to 0.13 ± 0.08 at day 1. IDS increased gradually over time. At day 8, IDS increased to 0.30 ± 0.02 . It was not completely restored at day 22 but was normal at day 55 post-ligation (Figure 2B and C). Interestingly, blood flow normalized before static test indicating that a normal blood flow is not sufficient to restore a complete limb function. According to literature, restoration of blood flow does not correlate with functionality indicating that a myopathy exists despite blood flow recovery.⁴ Indeed a carefully designed study, Pernow *et al.*, found no association between blood flow and walking parameters in PAD

patients and concluded that there is a poor correlation between leg perfusion and functional disability in PAD patients.¹⁸

In contrast to IDS, the walking score (Figure 2C) decreased from 1 to 0 after FAL but increased more rapidly than IDS and was restored at day 22. This fast recovery could be explained by the fact that mouse can easily use three limbs to move and to compensate the ischemic one.

Histological analysis

After subcutaneous Raman measurements, mice were sacrificed. Histological analysis was performed on muscle tissue sections to investigate the morphological changes between normal (day -1) and ischemia progression at 1; 5; 8; 15; 19; 22 and 55 post surgery (Figure 3). This analysis revealed that healthy muscle consisted of fiber bundles arranged in striated manner. These muscle fibers were polygonal in shape with relatively uniform fiber size distribution (Figure 3). The nuclei were located predominantly at periphery of the fibers. At day 1 of ischemia, muscle showed more pronounced morphological alterations compared to control. The fibers were severely atrophied with large interstitial spaces between myocyte. Myocytes were shrunken, with irregular shape, reduced size, and less cell nuclei. An intense inflammation, characterized by infiltrating mononuclear and some granulocytes, was observed at day 5. This inflammation increased until day 8 and then decreased from day 15 to day 19. At day 8, the myocytes showed centralized and hypertrophic nuclei in the vicinity of inflammatory infiltrates. The morphology of myocytes indicated a muscle regeneration as assessed by increased volume and centralized cell nuclei.^{19, 20} Furthermore, the size of the myofibers increased from day 15 to reach a normal volume at day 22. At day 55, myocytes were contiguous and inflammation has completely resolved. However, the muscles did not completely recover their normal state

since cell nuclei were still central and myocytes kept a round shape suggesting a regeneration in progress.

Our results demonstrated that the severity of the muscle damage was strongly correlated with functional disability. This finding is consistent with previously published data describing the morphological changes during recovery from ischemia in soleus.²¹ The histological characteristics and the kinetics of muscle repair are not specific of ischemia. They have also been described after other mechanisms of muscle injury.²² Interestingly, the process of muscle repair is quite comparable to that of patients with PAD.²³

Subcutaneous *in vivo* Raman study of ischemia

The advantage of using Raman spectroscopy is its ability to provide a non-invasive, real-time, and objective diagnosis of lesions. Prior to apply this technique for *in vivo* analysis, the first aim of this study was to characterize Raman fingerprint of muscle tissue during the development of ischemic disease using portable Raman spectrometer coupled to InPhotonics fiber probe in order to identify a spectroscopic marker describing ischemia development. The skin was removed from ischemic hindlimb to reveal the underlying muscles. Raman spectra were recorded on muscle before and after induction of ischemia at days 1, 5, 8, 15, 19, 22 and 55 post-surgery. Figure 4A showed the average Raman spectra of control (D-1) and different days post-ischemia. These spectra displayed common Raman bands with changes in the relative intensity of some bands associated to proteins or lipids. The Raman spectrum of control sample (D-1) showed bands at 1002 cm^{-1} related to breathing mode of phenylalanine of the proteins and bands at 1655 cm^{-1} and 1264 cm^{-1} were assigned to the amide I, amide III. These protein bands (1655 cm^{-1} , 1264 cm^{-1}) strongly overlapped with C=C and =CH bonds of unsaturated fatty acids lipid chains. The bands at 934 cm^{-1} and 1336 cm^{-1} were attributed to C-C bond of peptide backbone and CH₃/CH₂ twisting of proteins and nucleic acids respectively. The band

at 1447 cm^{-1} was assigned to CH_2 deformation mode arising from both proteins and lipids. Other bands 1339 cm^{-1} , 1301 cm^{-1} , and 1091 cm^{-1} were originated from CH_3/CH_2 wagging, CH_2 twist and wagging vibrations, and PO_2 symmetric stretching respectively. The band at 1737 cm^{-1} was related $\text{C}=\text{O}$ stretching mode of lipid ester bond. In the high wavenumber region, the band at 2858 cm^{-1} was attributed to CH_2 symmetrical stretching of lipids and 2934 cm^{-1} to asymmetrical stretching vibration of proteins. The vibration at 2897 cm^{-1} and 3066 cm^{-1} were related to CH_2 deformation and $=\text{C}-\text{H}$ stretching vibration of lipid and fatty acids respectively.

The comparison between Raman spectra of control (D-1) and ischemia development in fingerprint region showed differences in the relative intensity of some bands such as 1737 , 1576 , 1336 , 1301 , 1091 , and 934 cm^{-1} (Figure 4A). The intensity of the bands at 1737 cm^{-1} , 1301 cm^{-1} , and 1091 cm^{-1} were very low in the control spectrum. These bands increased from day 1 post-surgery to day 22, and then decreased in the Raman spectrum corresponding to 55 days post-surgery. These three bands were related to the lipid content in the muscle suggesting that ischemia was characterized by an increase in the lipid concentration during ischemic progression. However, the behavior of the bands at 936 cm^{-1} , 1336 cm^{-1} and 2934 cm^{-1} was completely different from that of lipid vibrations. Indeed, these proteins bands decreased from control to 55 days suggesting a reduction of the protein content during the course of ischemia. In addition, to better visualize and confirm these molecular changes in the muscle constituents during ischemia development with respect to control, the difference spectra were calculated by subtracting mean ischemia spectra at different day measurements (1, 5, 8, 15, 19, 22 and 55 post-ligation) from normal spectrum (Figure 4B). These different spectra revealed many biomolecular changes between normal and ischemic tissues. Indeed, positive and negative peaks in the difference spectra gave a good estimation on molecular species and concentrations present respectively in ischemia tissues and the control. Positive peaks at 2855 , 1743 , 1447 , 1299 , 1264 , and 1076 cm^{-1} were associated to lipid. A positive band at 3019 cm^{-1} attributed to

lipid appeared only in the different spectra. The intensity of these lipid bands increased from day 1 to day 55 in the different spectra suggesting an increase in lipid content of the muscle during the course of ischemia. However, negative bands such as 1336, 1655 and 2934 cm^{-1} were related to protein content meaning that the development of ischemia was characterized by the decrease in the protein content. These results are in agreement Mc Dermott *et al.*, and Koutakis *et al.*, who described a fatty infiltration during ischemia²⁴ and myofibers atrophy²⁰ during PAD. Jung *et al.*, reported that protein and lipid contents could be used to distinguish between normal and ischemia tissues. The lipid / protein ratio has been previously used as the diagnostic marker of many other models and diseases such as brain hypoperfusion (in rats),²⁵ atherosclerosis,²⁶ atopic eczema²⁷ and breast cancer.²⁸

Multivariate statistical technique (PC-LDA) was applied to Raman spectral data to discriminate between normal and ischemic tissues from day -1 to day 55 (Figure 5). The classification scatter plot illustrated a good separation between the seven subgroups defined by the date of evaluation after surgery. Linear discriminant components 1 vs 2 and 1 vs 3 showed a clear differences between normal (D-1) and D8, D19, and D22 ischemic tissues, which were clustered in a strongly compact group and were well-separated with non-overlap between subgroups. This classification further confirmed the significant changes in spectral profiles during the process of tissue transformation from normal to ischemic tissues. However, the D1, D5, D15 post-surgical spectral profiles, were well- separated, but to a lesser extent than at D8 and after D15. Additionally, it was not possible to discriminate between D5 and D55 ischemia disease state. The use of LD1 vs LD4 showed a clear separation of spectral profiles during the course of ischemia except at D5 and D55. Overall, these results indicated that Raman spectroscopy combined with LDA-PCA could be used to discriminate between normal and ischemia tissues as well as between different stages of ischemia progression from 1 to 22 days after FAL in

agreement with histological analysis (Figure 3). However, in spite the fact that at D5 and D55 spectral profiles were comparable, histological patterns were different. This is compatible with the fact that the ischemic tissue is highly unstable in the following days after acute ischemia. At D55, histological changes reflect the healing process. Raman spectroscopy may be helpful to characterize healing. This should be confirmed by a further study aiming at evaluating Raman spectroscopy during a longer period of time after FAL.

Transcutaneous *in vivo* Raman study of ischemia development

Molecular diagnostics using Raman spectroscopy is attracting a great deal of attention because of its ability to perform *in situ* analysis in living organisms. Indeed, this method may be suitable for routine use as it is fast, easy to use and at relatively low cost.

In order to assess the clinical relevance of Raman spectroscopy to detect and follow the course of ischemia *in vivo*, we next evaluated transcutaneous analysis. For this, animals were monitored as previously i.e before FAL and at days 1, 5, 8, 15, 19, 22 and 55 post-ligature. These transcutaneous spectra showed similar bands that those obtained with subcutaneous measurements. Figure 6 displays the mean averaged spectra measured before and during ischemia development. The profile of all spectra correspond mostly to lipids (2855, 1742, 1447, 1299, 1264, and 1076 cm^{-1}) with a low contribution of proteins (1336, 1655 and 2934 cm^{-1}). Whatever the time of measurement, the protein contribution in the transcutaneous spectra (Figure 6) was consistently lower in comparison with subcutaneous spectra. As previously, a multivariate statistical analysis was performed to describe a classification model to distinguish ischemia from normal. The classification scatter plot, in figure 7, illustrates the high level of discrimination of the technique during the course of ischemia. Indeed, linear discriminant components 1 vs 2, 1 vs 3, and 1 vs 4 showed a clear separation between the normal and ischemic data, which were clustered in a highly compact group and well-separated with little overlap,

except days 5 and 55. In this respect, these results were comparable with those obtained subcutaneously. This study demonstrated that Raman spectroscopy combined to LDA-PCA can be used to discriminate between normal and ischemia tissues as well as to monitor the ischemia progression. In a comparable mouse model of critical limb ischemia, it has been proposed that magnetic resonance imaging could provide quantitative information about damage after ischemia and subsequent vascular and muscle regeneration.²⁹ Raman spectroscopy was evaluated in a rodent model of myocardial ischemia showing that early ischemic was characterized by two peaks at 750 and 1127 cm^{-1} , reflecting reduced cytochromes c and b.¹³ It should be interesting to evaluate the activity of cytochromes in our *in vivo* model, as mitochondrial activity increases in PAD.⁶

CONCLUSION

The combination of *in vivo* Raman spectroscopy with blood flow analysis, functional tests, and histological examination has a clear potential in providing an objective diagnostic complimentary information helping to a better understanding of the molecular changes associated to ischemia over the time. To the best of our knowledge, this is the first study, using *in vivo* Raman spectroscopy, to probe the hindlimb mice ischemia development. Our results revealed that molecular changes between non-ischemic and ischemic muscles were mainly related to qualitative and quantitative changes in lipid and proteins contents. We have next investigated the clinically relevant utility of *in vivo* Raman spectroscopy for the detection of ischemia development using transcutaneous measurements. In this non-invasive condition, it was indeed possible to develop a classification algorithm able to discriminate with a high accuracy ischemia from normal. These spectroscopic results were validated by histological analysis. In fact, the histological analysis reported that at day 1 after artery dissection, tissue alteration was visible, reaching a maximum tissue damage at day 5. The muscle fiber regeneration started at day 8, with a clear improvement at 55 days.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Platform of Cellular and Tissular Imaging (PICT) for the equipment availability, Pr Aude Marchal and Rémi Tilmont.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest

REFERENCES

1. M. H. Criqui, V. Aboyans. *Circ Res.* 2015;116(9):1509-26.
2. K. J. Stewart, W. R. Hiatt, J. G. Regensteiner, A. T. Hirsch. *N Engl J Med.* 2002;347(24):1941-51.
3. R. A. Becker, K. Cluff, N. Duraisamy, G. P. Casale, Pipinos, II. *J Surg Res.* 2017;220:79-87.
4. Pipinos, II, A. R. Judge, J. T. Selsby, Z. Zhu, S. A. Swanson, A. A. Nella, et al. *Vasc Endovascular Surg.* 2007;41(6):481-9.
5. J. P. Salenius, J. F. Brennan, 3rd, A. Miller, Y. Wang, T. Aretz, B. Sacks, et al. *J Vasc Surg.* 1998;27(4):710-9.
6. K. Cluff, A. M. Kelly, P. Koutakis, X. N. He, X. Huang, Y. F. Lu, et al. *Physiol Rep.* 2014;2(9).
7. K. Esmonde-White. *Appl Spectrosc.* 2014;68(11):1203-18.
8. E. Brauchle, K. Schenke-Layland. *Biotechnol J.* 2013;8(3):288-97.
9. A. Sharma, S. Sharma, A. Zarrow, R. A. Schwartz, W. C. Lambert. *Indian J Dermatol.* 2016;61(1):1-8.
10. C. C. Moura, R. S. Tare, R. O. Oreffo, S. Mahajan. *J R Soc Interface.* 2016;13(118).
11. G. B. Jung, S. W. Kang, G. J. Lee, D. Kim. *Appl Spectrosc.* 2018;72(10):1479-86.
12. I. M. V. A.N. Baranov, and A.M. Saletsky *Laser Phys Lett.* 2004;No. 11, :555–9.
13. S. Ohira, H. Tanaka, Y. Harada, T. Minamikawa, Y. Kumamoto, S. Matoba, et al. *Sci Rep.* 2017;7:42401.
14. X. Huang, S. Irmak, Y. F. Lu, I. Pipinos, G. Casale, J. Subbiah. *Biomed Opt Express.* 2015;6(8):2766-77.
15. A. Limbourg, T. Korff, L. C. Napp, W. Schaper, H. Drexler, F. P. Limbourg. *Nat Protoc.* 2009;4(12):1737-46.

16. S. Lotfi, A. S. Patel, K. Mattock, S. Egginton, A. Smith, B. Modarai. *Atherosclerosis*. 2013;227(1):1-8.
17. D. Scholz, T. Ziegelhoeffer, A. Helisch, S. Wagner, C. Friedrich, T. Podzuweit, et al. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34(7):775-87.
18. B. Pernow, S. Zetterquist. *Scand J Clin Lab Invest*. 1968;21(3):277-87.
19. A. M. Heemskerk, G. J. Strijkers, M. R. Drost, G. S. van Bochove, K. Nicolay. *Radiology*. 2007;243(2):413-21.
20. P. Koutakis, S. A. Myers, K. Cluff, D. M. Ha, G. Haynatzki, R. D. McComb, et al. *J Surg Res*. 2015;196(1):172-9.
21. N. F. Paoni, F. Peale, F. Wang, C. Errett-Baroncini, H. Steinmetz, K. Toy, et al. *Physiol Genomics*. 2002;11(3):263-72.
22. J. Lagrota-Candido, I. Canella, D. F. Pinheiro, L. P. Santos-Silva, R. S. Ferreira, F. J. Guimaraes-Joca, et al. *Int J Exp Pathol*. 2010;91(6):522-9.
23. K. Cluff, D. Miserlis, G. K. Naganathan, Pipinos, II, P. Koutakis, A. Samal, et al. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013;305(3):R291-9.
24. M. M. McDermott, F. Hoff, L. Ferrucci, W. H. Pearce, J. M. Guralnik, L. Tian, et al. *J Am Geriatr Soc*. 2007;55(3):400-6.
25. Z. F. Toyran N, Dönmez G, Oğe K, Severcan F. *Eur Biophys J*. 2004;33(6):549-54.
26. K. Kochan, K. Chrabaszcz, B. Szczur, E. Maslak, J. Dybas, K. M. Marzec. *Analyst*. 2016;141(18):5329-38.
27. M. Janssens, J. van Smeden, G. J. Puppels, A. P. Lavrijsen, P. J. Caspers, J. A. Bouwstra. *Br J Dermatol*. 2014;170(6):1248-55.
28. B. E. Pacia MZ, Blazejczyk A, Gregorius A, Wietrzyk J, Chlopicki S, Baranska M, Kaczor A. *Anal Bioanal Chem*. 2016;408(13):3381-7.

29. G. Zaccagnini, A. Palmisano, T. Canu, B. Maimone, F. M. Lo Russo, F. Ambrogi, et al.
PLoS One. 2015;10(11):e0142111.

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1: Overview of study design applied to investigate the functional, morphological, and molecular changes in lower limb muscle during ischemia development using hindlimb blood flow (HBF), static and dynamic tests (SDT) and for *in vivo* Raman spectroscopy (IVRS).

Figure 2: Blood flow analysis (A) and interdigital distance between 1st and 5th toe (B) on lowers normal right limb (Day-1) and during left limb ischemia at days 1, 5, 8, 15, 19, 22 and 55 after FAL. The average blood flow was calculated and the LDI index was determined as the ratio of ischemic to non-ischemic hindlimb blood perfusion. Functional tests were used to evaluate clinical recovery after ischemia induction. Ischemic / normal IDS ratio (C) to evaluate clinical recovery after ischemia induction.

Figure 3: Photomicrographs (hematoxylin eosin staining) of control *Gastrocnemius* muscle and ischemia development at days 1, 5, 8, 15, 19, 22 and 55 post-surgery. After subcutaneous *in vivo* Raman measurements, the corresponding mice were sacrificed. From each muscle, one 5 μm thick section was placed on a glass microscope slide and stained with hematoxylin eosin for histological examination. These images displayed the changes in the morphological characteristics of skeletal muscle due to the ischemia disease development.

Figure 4: Subcutaneous *in vivo* mean averaged Raman spectra measured on control and ischemia development at days 1, 5, 8, 15, 19, 22 and 55 post-ligature (Panel A). From each animal, 10 spectra were measurement on ischemic left and normal right limb in the region $900 - 3100 \text{ cm}^{-1}$ with acquisition time of 10 seconds. These spectra were accompanied by their standard deviations (shaded area). Panel B displayed the difference spectra between mean ischemia spectra from different day measurements (1, 5, 8, 15, 19, 22, and 55 post-surgery) from normal muscle spectrum.

Figure 5: LDA-PCA scatter plots from significant linear discriminant variables (LD1 vs LD2; LD1 vs LD3; LD1 vs LD4) on subcutaneous *In vivo* Raman spectra measured on control *Gastrocnemius* muscle and ischemia development at days 1, 5, 8, 15, 19, 22 and 55 post-surgery. These scatter plots illustrated a good classification of data in 7 well separated clusters.

Figure 6: Transcutaneous *in vivo* mean averaged Raman spectra measured on control and ischemia development at days 1, 5, 8, 15, 19, 22 and 55 post-ligature. From each animal, 10 spectra were measurement on ischemic left and normal right limb in the region $900 - 3100 \text{ cm}^{-1}$ with acquisition time of 10 seconds. These spectra were accompanied by their standard deviations (shaded area).

Figure 7: LDA-PCA scatter plots from significant linear discriminant variables (LD1 vs LD2; LD1 vs LD3; LD1 vs LD4) on transcutaneous *in vivo* Raman spectra measured on control *Gastrocnemius* muscle and ischemia development at days 1, 5, 8, 15, 19, 22 and 55 post-surgery. These scatter plots illustrated a good classification of data in 7 well separated clusters.

Figure 1

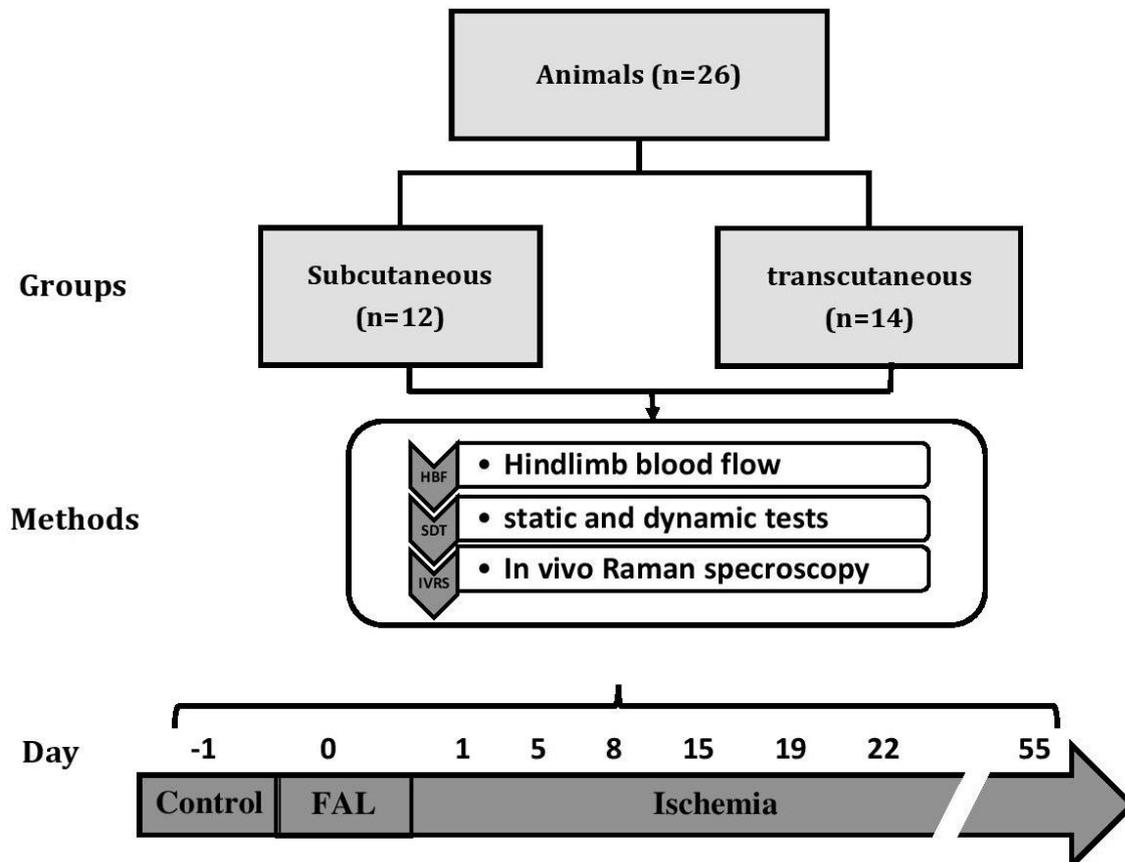


Figure 2

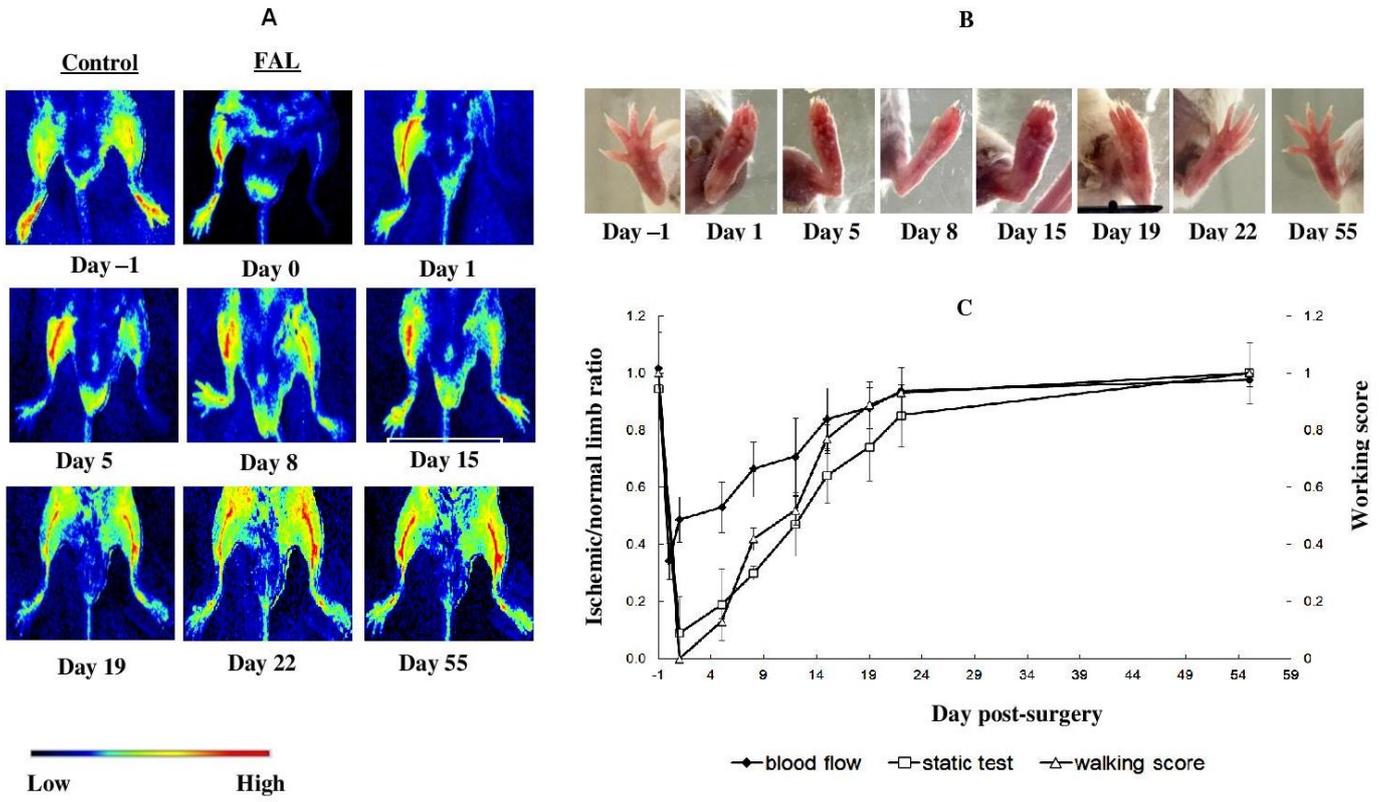


Figure 3

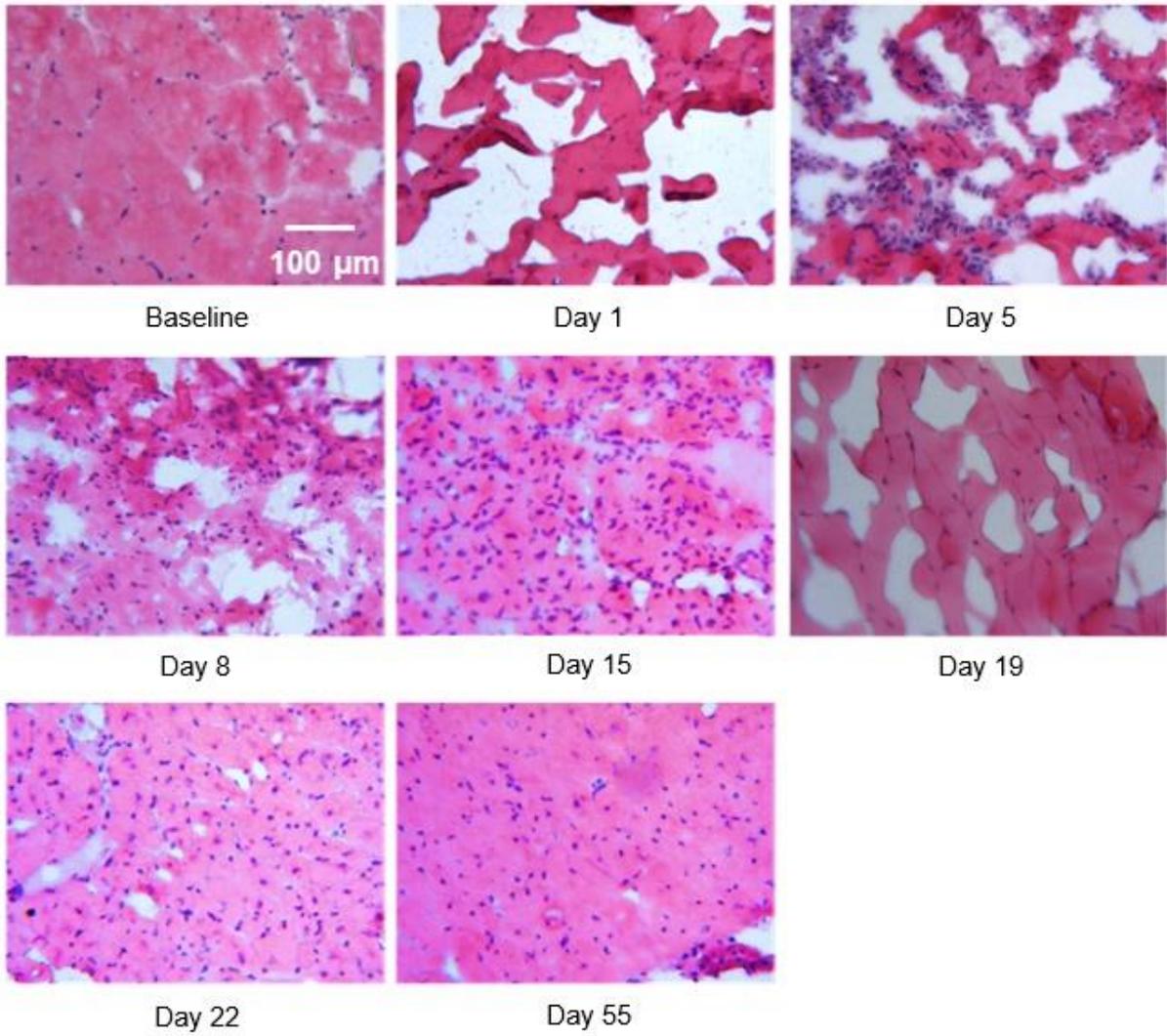


Figure 4

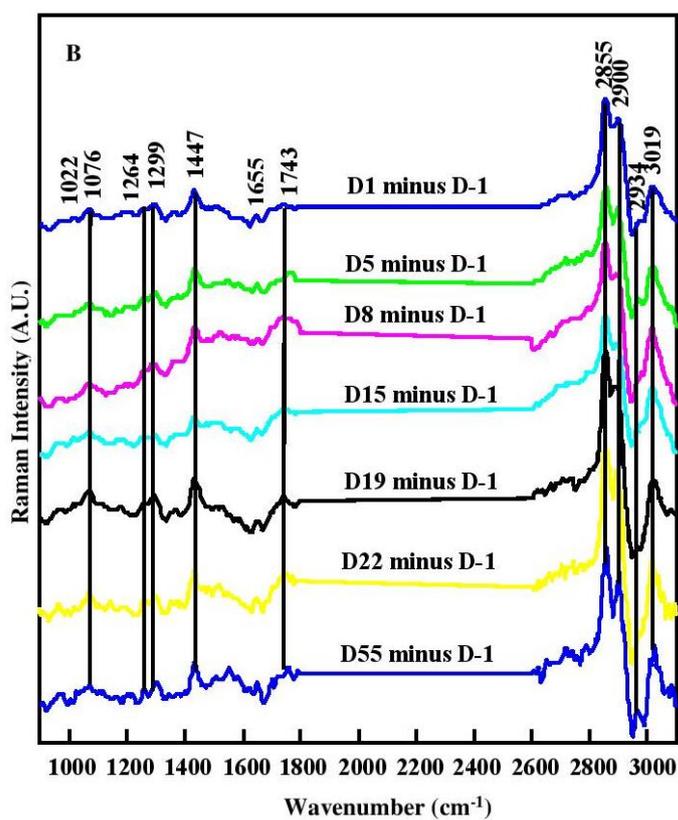
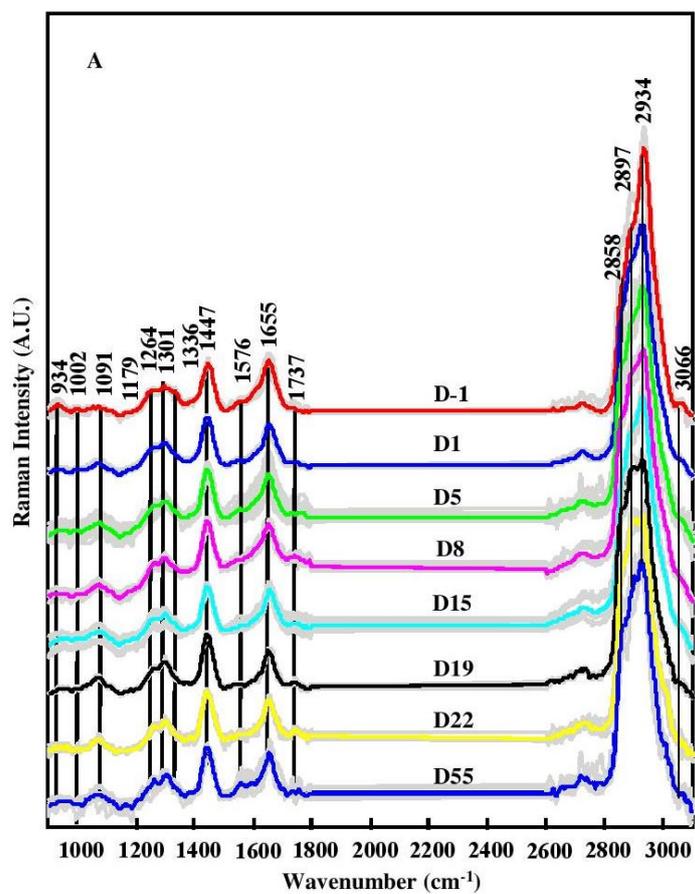


Figure 6

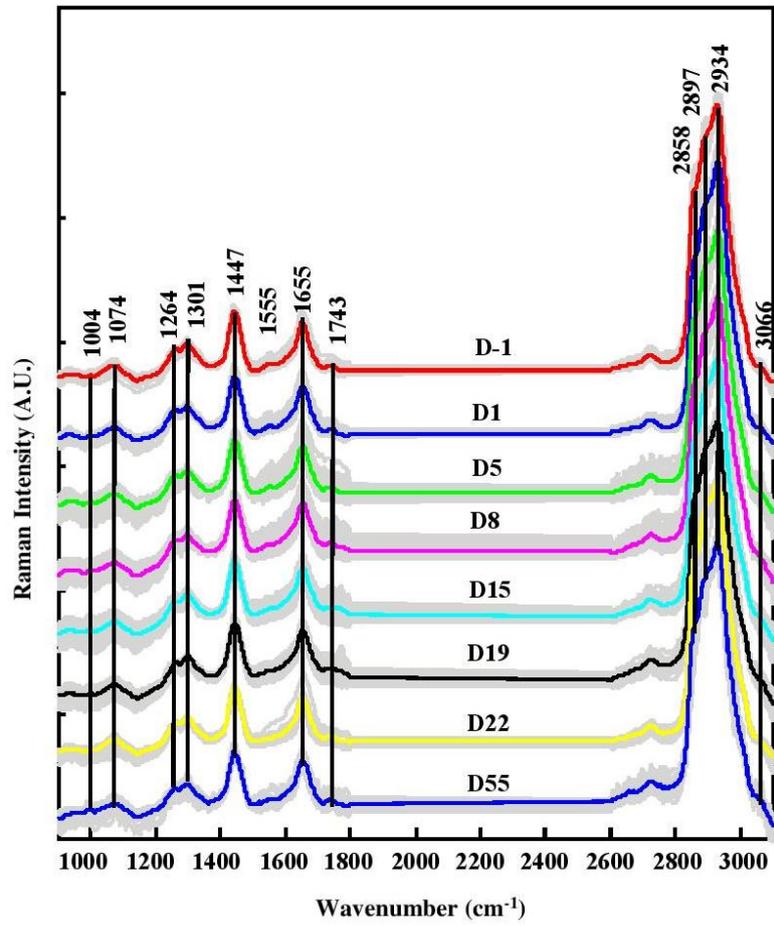
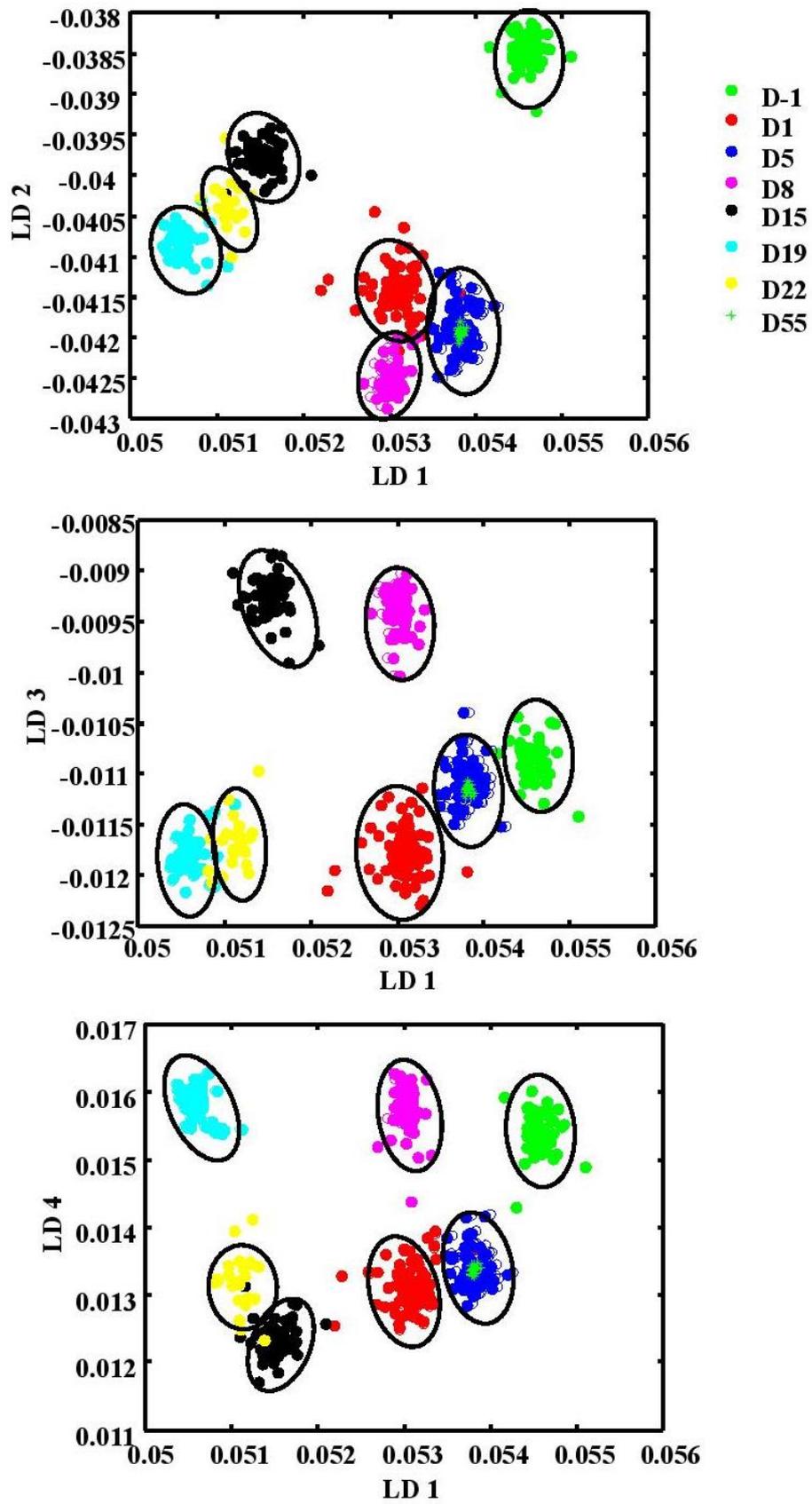


Figure 7



X. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Depuis quelques années, la TC a fait l'objet de nombreux travaux précliniques puis cliniques chez les patients atteints d'AOMI et en impasse thérapeutique (« *NO-option* »).

Les méta-analyses découlant des essais randomisés sont en faveur d'une efficacité, sur des critères d'amélioration clinique tels que la cicatrisation des ulcères, l'augmentation de la TcPO₂ et la diminution de la douleur. En revanche, lorsque les critères principaux de jugement sont fondés sur la mortalité, les méta-analyses ne parviennent pas à démontrer de façon claire l'efficacité de la TC [297, 312].

Les PTC sont très hétérogènes selon les études. Ces PTC sont décrits généralement de façon assez stéréotypée par une description sommaire de la composition cellulaire ainsi que par des indices classiques en TC telle que la viabilité cellulaire et la quantité de cellules CD34⁺. En effet, le rationnel reposait essentiellement sur l'idée selon laquelle le mécanisme d'action serait entièrement fondé sur la différenciation des cellules injectées. Des EPCs sont identifiables au sein des PTC mais leur très grande rareté incite à envisager d'autres mécanismes d'action notamment paracrines [100].

A notre connaissance, aucune étude clinique n'a réalisé une caractérisation extensive des PTC dans l'objectif de mieux comprendre les échecs de la TC et de dégager des pistes d'amélioration. Par ailleurs, s'agissant d'implanter des cellules rares dans un environnement très défavorable parce qu'altéré par l'ischémie et l'inflammation, l'analyse du site implantatoire apparaît comme un paramètre essentiel. En effet, la physiopathologie de l'AOMI a longtemps été attribuée uniquement aux obstructions athéroscléreuses et à la réduction du flux sanguin dans les membres inférieurs. Les techniques actuelles d'exploration se focalisent essentiellement sur l'évaluation du flux sanguin et sur la qualité des vaisseaux. Or, la maladie concerne aussi bien la diminution du flux que l'atteinte musculaire et des données de la littérature indiquent qu'une myopathie se développe secondairement à l'atteinte vasculaire [316].

Les objectifs de ce travail ont été :

- 1- De caractériser de façon très extensive des PTC autologues, provenant de patients présentant une AOMI et ayant bénéficié de TC,

- 2- D'analyser le site implantatoire en utilisant un modèle animal validé et en comparant les analyses histologiques et de flux à des évaluations fonctionnelles,
- 3- D'identifier des sous-populations d'intérêt au sein de ces PTC d'origine autologue,
- 4- D'évaluer par un essai pilote le potentiel de l'analyse *in vivo* par spectroscopie Raman des tissus ischémiés.

Le CHU de Reims dispose d'une collection unique d'échantillons biologiques provenant de patients présentant une ICMI à haut risque d'amputation et candidats à la TC. Les caractéristiques cliniques et biologiques de ces patients sont parfaitement colligées. Ces échantillons ont été obtenus lors de la réalisation d'un premier essai clinique de phase I/II de TC initié en 2004 en collaboration avec le CHU d'Amiens (*Trial number*: NCT00533104 sur le site : www.clinicaltrials.gov), poursuivi en 2009 par un plus large essai national, de phase III randomisé en double aveugle contre placebo intitulé BALI ("*Bone marrow Autograft in Limb Ischemia*") (*Trial number*: NCT00904501) [259]. Ces essais ont utilisé soit la fraction nucléée de la MO (BM-CTPs : *Bone Marrow cell therapy products*) après ponction-aspiration de la MO soit celles du sang périphérique (PB-CTPs : *Peripheral Blood cell therapy products*), obtenues par cytophérèse non mobilisée. Les PTC ont été caractérisés précisément [299] et les évaluations cliniques ont démontré leur bonne tolérance et une nette amélioration clinique chez certains patients [296].

Dans « *Cell therapy in critical limb ischemia: A comprehensive analysis of two cell therapy product* », nous décrivons la complexité des PTC en termes de composition cellulaire et les différences majeures entre BM-CTPs et PB-CTPs. Quelle que soit leur source, médullaire ou périphérique, ces PTC sont très hétérogènes reflétant probablement des paramètres liés aux patients eux-mêmes très hétérogènes en termes d'âge, de facteurs de risque, de comorbidités, de thérapeutiques associées *etc...* [281].

L'analyse cellulaire des PTC retrouve néanmoins des taux de cellules CD34⁺ très faibles, ce qui confirme les données de la littérature. Ainsi, le taux de cellules CD34⁺ dans les PTC est inversement corrélé à l'âge des patients [281]. Bien que les effectifs

dans la population restent faibles, nous avons observé que la présence d'un syndrome inflammatoire ainsi que l'accumulation de facteurs de risque cardiovasculaires sont inversement corrélés aux concentrations de cellules CD34⁺ circulantes.

De même, les EPCs sont présents en très faible quantité (1/8000 cellules nucléées dans la MO et 1/124 000 cellules nucléées dans le sang). Cette quantité infime de cellules souches et progénitrices est en accord avec les données de la littérature indiquant que les PTC jouent un rôle essentiellement paracrine en sécrétant des facteurs pro-antigéniques et en recrutant des EPCs locaux [343].

L'effet des cellules matures présentes dans les PTC ne doit pas être négligé. Ainsi, l'effet paracrine pourrait être plus important avec les PB-CTPs, très riches en monocytes [153] et en plaquettes [344], sources potentielles de facteurs pro-angiogéniques et de facteurs de croissance [281].

A l'inverse, les PNN très présents dans certains PTC pourraient être délétères compte tenu de leurs propriétés protéolytiques et cytotoxiques sachant que les PTC sont implantés dans des sites ischémiques déjà très inflammatoires. Lors de nos études, nous avons observé que l'expression d'un profil inflammatoire chez les patients était associée à une évolution défavorable après TC. Les cellules mésenchymateuses ont donc un intérêt majeur dans l'AOMI dans la mesure où ces cellules sont immunomodulatrices, d'où l'idée d'un effet anti-inflammatoire au niveau du site implantatoire des PTC.

Dans notre étude, nous montrons l'existence d'une sous-population de MSCs dans les PTC. Ces cellules sont rares mais présentes (1/28 000 cellules nucléées dans la MO et 1/114 000 cellules nucléées dans le sang) chez le patient ayant une AOMI évoluée. Les MSCs se distinguent des ECFCs dans la mesure où il est possible de les amplifier plus facilement en culture, tout en préservant leurs propriétés [345, 346].

Ainsi, en dépit de leur rareté, il est envisageable d'obtenir des PTC y compris en situation autologue et en quantité suffisante pour les rendre exploitables en TC. D'autres sources de MSCs peuvent, par ailleurs, s'envisager.

L'intérêt des MSCs a été corroboré par des études précliniques ayant utilisé des MSCs dans un modèle d'ICMI et ont établi leur supériorité par rapport aux BM-MNCs [181]. En 2012, Smadja *et al.*, ont mis en évidence l'efficacité de MSCs issues de patients ICMI dans un modèle murin d'ICMI [342]. Ces MSCs issues présentaient un pouvoir pro-angiogénique supérieur aux BM-MNCs issues des mêmes patients et équivalent

aux MSCs issues de donneurs du même âge, exempts de facteurs de risque cardiovasculaires. Ceci suggère que, malgré une raréfaction de ces cellules au cours de la vie, les MSCs conservent un potentiel pro-angiogénique stable, probablement paracrine.

Dans ce contexte, des études *in vitro* et *in vivo* ont analysé les capacités de transdifférenciation endothéliale des MSCs et envisagé des pistes d'amélioration de leur pouvoir pro-angiogénique. Ainsi, la surexpression de facteurs pro-angiogéniques (HGF, HIF-2 α , PDGF-BB, FGFb) par transfection stable *via* des vecteurs viraux [167-169] améliore l'efficacité pro-angiogénique des cellules par rapport aux MSCs indifférenciées. D'autre part, le pré-conditionnement hypoxique *in vitro* (1% d'O₂) des MSCs augmente l'activité pro-angiogénique de ces cellules [170].

A partir des MSCs, une population a été décrite comme cellules *endothelial-like* MSCs (MELs) dans la mesure où elle est obtenue par culture des MSCs dans un milieu enrichi en FCs pro-angiogéniques [177]. Ces cellules présentent le même phénotype que les MSCs indifférenciées mais leur fonctionnalité est distincte puisque ces cellules se transdifférencient en ECs, lorsqu'elles sont cultivées en présence de composés de la MEC. Par ailleurs, les MELs forment des pseudo-tubes *in vitro* plus importants que ceux formés par les MSCs [177-179]. Dans un modèle de Matrigel *in vivo*, elles induisent la formation de vaisseaux fonctionnels [179].

L'un des objectifs de notre travail a été de mettre en évidence la présence de MELs dans les PTC issus de la MO (BMCs) provenant des patients présentant une ICMI à haut risque d'amputation.

Les résultats de ce travail sont présentés dans le deuxième article « *In vivo efficacy of endothelial like mesenchymal stem cells derived from patients with critical limb ischemia* ». Ils montrent que des MELs sont présents dans les PTC d'origine médullaire issus de patients « *NO-option* ». Nous confirmons que les MELs présentent un phénotype comparable à celui des MSCs mais des propriétés fonctionnelles plus intéressantes que ces dernières. Il est donc nécessaire de poursuivre les investigations de façon à distinguer les types de population cellulaire. L'analyse des profils sécrétoires de ces cellules est en cours, afin de mieux comprendre l'avantage fonctionnel des MELs voire de proposer des marqueurs phénotypiques les distinguant.

Dans le modèle murin d'ischémie aiguë chez la souris *Nude*, les MELs favorisent la restauration complète du flux sanguin dans la patte ischémisée, de façon comparable aux MSCs mais bien supérieures aux BMCs d'origine. De plus, elles permettent de réduire très significativement le taux d'amputation. Ce modèle présente quelques limites puisque l'ICMI humaine résulte généralement d'un processus chronique. Les mécanismes de revascularisation impliqués dans ces deux phénomènes, aigus ou chroniques, sont différents [87]. De plus, l'utilisation de souris jeunes qui ne présentent pas de co-morbidités associées telles que l'HTA ou le diabète peut être discutée. Une des perspectives de ce travail serait de faire vieillir des souris dans un environnement enfumé (le tabac étant le 1^{er} facteur de risque dans l'AOMI), de les rendre obèses et diabétiques, hypertendues. Une étape finale de ligature de l'artère fémorale serait peut-être nécessaire pour induire une ischémie aiguë caractéristique de l'ICMI. Nos conclusions rejoignent celles de Smadja *et al.*, 2012, évoquant un avantage possible des MSCs issues de patients ICMI par rapport aux BMCs d'origine [342]. De façon intéressante, Smadja *et al.*, ont indiqué que le potentiel pro-angiogénique des MSCs ne décroît pas lorsque les patients présentent des facteurs de risque cardiovasculaires.

Les analyses fonctionnelles montrent que l'implantation des MELs ou des MSCs, favorisent la récupération de la distance interdigitale et la marche. Parmi les évaluations fonctionnelles, le test dit « statique » offre l'intérêt d'une information précise sur la fonctionnalité du membre. Le test « dynamique », plus représentatif de la marche, nous semble un moins bon indicateur de la réparation vasculaire dans la mesure où les animaux mettent en place des mécanismes rapides de compensation.

L'analyse immuno-histologique du site implantatoire montre que les MELs semblent favoriser la réparation vasculaire puisque leur implantation induit un marquage endothélial CD31⁺ supérieur par rapport aux 3 autres lots de souris (MSCs, BMCs et véhicule). Janeczek-Portlaska *et al.*, 2012, ont rapporté la capacité de MELs humaines à se différencier en ECs, et ce, après contact avec des composés de la MEC.

Nos résultats montrent que l'implantation des MELs favorise l'apparition de cellules α SMA⁺. Ces cellules sont impliquées dans la formation d'un réseau vasculaire, lequel serait plus stable lorsque les deux marqueurs CD31⁺ et α SMA⁺ sont associés [347]. Si les réseaux formés à la suite à l'implantation de cellules quel que soit leur origine sont

instables, alors la réparation vasculaire est insuffisante à moyen terme puisqu'elle ne permet pas de subvenir aux besoins des tissus [343].

Selon certaines données de la littérature, il semblerait que les cellules injectées se grefferaient transitoirement aux tissus ischémiques [289] et induiraient l'activation de la revascularisation par des mécanismes essentiellement paracrines. Nous avons réalisé des analyses immuno-histologiques en utilisant un anticorps anti-noyau humain sur les coupes musculaires des souris *Nude* 28 jours après l'implantation des 3 lots de cellules humaines (BMCs, MSCs et MELs). Nous n'avons pas mis en évidence de cellules d'origine humaine au sein du muscle *Gastrocnemius* murin. Cette absence a été confirmée secondairement par une analyse transcriptomique des muscles en utilisant des oligonucléotides sondes spécifiquement humains (résultats non présentés). En perspective de ce travail, il serait intéressant d'utiliser des cellules marquées afin de pouvoir suivre leur comportement *in vivo*.

Dans notre approche, il nous semble important d'associer l'étude des processus de réparation vasculaire à celle de la réparation musculaire, ce qui est peu abordé dans la littérature à ce jour. Nos résultats indiquent que les MELs ainsi que les MSCs ont permis d'obtenir une réparation musculaire supérieure aux BMCs. En effet, suite à la ligature de l'artère fémorale commune, il se produit une dégénérescence musculaire rapide laquelle est suivie de processus de régénération. Des cellules myogéniques, présentes entre les fibres, permettent d'obtenir de nouvelles fibres musculaires caractérisées, au cours de la régénération musculaire, par un plus petit calibre et des noyaux situés en position centrale [348]. Ce mécanisme a été également décrit au cours de l'ICMI humaine [349]. Il apparaît donc crucial de suivre l'évolution des processus post-ischémiques touchant le tissu musculaire au cours de l'ICMI afin de prédire au mieux l'issue de la TC.

L'analyse des sites ischémiques est un enjeu majeur pour la TC dans la mesure où elle permet de réfléchir sur la stratégie d'implantation notamment en termes de site favorable ou défavorable pour une telle implantation. L'analyse des sites d'implantation pourrait également être utile au suivi des patients traités par TC. Ainsi, des approches non invasives sont à privilégier.

Parmi les outils innovants possibles, nous proposons la spectroscopie Raman. En effet, l'Université de Reims Champagne-Ardenne accueille une équipe de recherche

reconnue internationalement dans ce domaine. Cette équipe a démontré la capacité de la spectroscopie Raman à analyser des tissus. Dans la littérature, les travaux de Cluff *et al.*, en 2014 ont utilisé la spectroscopie Raman dans l'analyse de biopsies musculaires provenant de patients ICMI et ont pu évaluer la dégénérescence musculaire [323].

L'article « *Subcutaneous and transcutaneous monitoring of murine Hindlimb ischemia by in vivo Raman spectroscopy* » présente l'étude que nous avons réalisée en collaboration avec le Dr Abdelilah BELJEBBAR et l'unité EA 7506 (BioSpectroscopy Translational group BioSpecT) dirigée par le Pr Olivier PIOT. Ce travail montre l'apport de la spectroscopie Raman dans l'analyse *in vivo* et en temps réel du site ischémié. Les empreintes spectrales fournies par l'étude permettent de discriminer, au cours du temps, les tissus sains des tissus ischémiés, de manière non invasive. Au cours de l'étude, nous avons constaté que, 22 jours après l'induction de l'ischémie, et malgré une restauration complète du flux sanguin, il persiste une défaillance fonctionnelle. Ceci confirme les données de la littérature selon lesquelles la fonctionnalité du membre ischémié n'est pas exclusivement dépendante du flux sanguin [316]. De plus, les données spectrales obtenues à J22 post-ischémie sont différentes de celles recueillies chez le contrôle, ce qui suggère que le tissu cicatriciel post-ischémie n'a pas la même structure qu'un tissu sain. Cette hypothèse est confirmée par l'analyse histologique des muscles gastrocnémiens qui montrent la présence de fibres caractéristiques d'une régénération musculaire incomplète. Par ailleurs, l'analyse spectrale du site ischémié montre une augmentation des lipides et une baisse des protéines. Cette évolution des contenus en lipides/protéines est cohérente avec des données publiées montrant en histologie, une infiltration adipocytaire du tissu ischémié associé à une atrophie musculaire [349, 350].

En perspective de notre travail, il serait intéressant d'utiliser une méthode de microspectroscopie Raman à partir de biopsies murines, afin de cartographier les tissus, selon les différents composants identifiés par l'analyse spectrale.

L'ensemble de ces données fournit un argument en faveur de l'utilisation *in vivo* et en temps réel de la spectroscopie Raman dans l'analyse du site ischémié.

A plus long terme, la spectroscopie Raman est extrêmement prometteuse dans la mesure où il s'agit d'une technique non invasive donnant des informations

comparables aux analyses histologiques. Compte tenu des limites des méthodes d'imagerie et de la difficulté d'utiliser des indicateurs pertinents et sensibles indiquant la revascularisation, la spectroscopie Raman pourrait permettre non seulement de diagnostiquer et de cartographier les lésions ischémiques, mais également de suivre la réparation tissulaires des patients après revascularisation, et ce quelle que soit la méthode utilisée. En ce qui concerne la TC, l'analyse Raman pourrait guider l'implantation des cellules en déterminant les sites favorables à cette implantation.

En conclusion, ce travail nous a montré l'intérêt des MSCs et des MELs, lesquelles sont présentes chez les patients atteints d'une ICMI à haut risque d'amputation, d'où une possibilité d'utiliser ces cellules dans une TC autologue. Il semble nécessaire de mieux caractériser les cellules MELs afin d'élucider leur potentiel de réparation vasculaire mais également musculaires.

Le programme de recherche clinique d'utilisation de la TC se poursuit au CHU de Reims un la mise en place d'un nouvel essai clinique évaluant des MSCs provenant du cordon ombilical chez les patients présentant une AOMI. Ce projet est coordonné par le Pr Ambroise DUPREY. A l'occasion de l'élaboration de ce projet, les critères de suivi sont discutés. Pour cet essai, des indices classiques de mesure ($TcPO_2$) seront retenus. Pour autant, il nous semble intéressant de poursuivre les travaux menés avec la spectroscopie Raman afin d'envisager le développement de cette technique dans l'évaluation du patient présentant une AOMI, notamment dans le suivi des patients traités par des techniques de revascularisation intégrant la TC.

Les cellules humaines utilisées à des fins médicales sont considérées aujourd'hui comme des médicaments (MTI : « médicaments de thérapie innovante » et MTI-PP : « médicaments de thérapie innovante préparés ponctuellement ») et la réglementation européenne en vigueur extrêmement draconienne pourrait constituer à elle-seule une étape limitante à leur utilisation chez l'homme.

XI. REFERENCES

1. Kullo IJ, Rooke TW: **CLINICAL PRACTICE. Peripheral Artery Disease.** *N Engl J Med* 2016, **374**(9):861-871.
2. Gallino A, Aboyans V, Diehm C, Cosentino F, Stricker H, Falk E, Schouten O, Lekakis J, Amann-Vesti B, Siclari F *et al*: **Non-coronary atherosclerosis.** *Eur Heart J* 2014, **35**(17):1112-1119.
3. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG: **Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II).** *J Vasc Surg* 2007, **45 Suppl S**:S5-67.
4. Fowkes FG, Rudan D, Rudan I, Aboyans V, Denenberg JO, McDermott MM, Norman PE, Sampson UK, Williams LJ, Mensah GA *et al*: **Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis.** *Lancet* 2013, **382**(9901):1329-1340.
5. Criqui MH, Fronek A, Barrett-Connor E, Klauber MR, Gabriel S, Goodman D: **The prevalence of peripheral arterial disease in a defined population.** *Circulation* 1985, **71**(3):510-515.
6. Kroger K, Stang A, Kondratieva J, Moebus S, Beck E, Schmermund A, Mohlenkamp S, Dragano N, Siegrist J, Jockel KH *et al*: **Prevalence of peripheral arterial disease - results of the Heinz Nixdorf recall study.** *Eur J Epidemiol* 2006, **21**(4):279-285.
7. Diehm C, Schuster A, Allenberg JR, Darius H, Haberl R, Lange S, Pittrow D, von Stritzky B, Tepohl G, Trampisch HJ: **High prevalence of peripheral arterial disease and co-morbidity in 6880 primary care patients: cross-sectional study.** *Atherosclerosis* 2004, **172**(1):95-105.
8. Meijer WT, Hoes AW, Rutgers D, Bots ML, Hofman A, Grobbee DE: **Peripheral arterial disease in the elderly: The Rotterdam Study.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998, **18**(2):185-192.
9. Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzler NR, Bakal CW, Creager MA, Halperin JL, Hiratzka LF, Murphy WR, Olin JW, Puschett JB *et al*: **ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation.** *Circulation* 2006, **113**(11):e463-654.

10. Reinecke H, Unrath M, Freisinger E, Bunzemeier H, Meyborg M, Luders F, Gebauer K, Roeder N, Berger K, Malyar NM: **Peripheral arterial disease and critical limb ischaemia: still poor outcomes and lack of guideline adherence.** *Eur Heart J* 2015, **36**(15):932-938.
11. Criqui MH, Langer RD, Fronek A, Feigelson HS, Klauber MR, McCann TJ, Browner D: **Mortality over a period of 10 years in patients with peripheral arterial disease.** *N Engl J Med* 1992, **326**(6):381-386.
12. Nehler MR, Duval S, Diao L, Annex BH, Hiatt WR, Rogers K, Zakharyan A, Hirsch AT: **Epidemiology of peripheral arterial disease and critical limb ischemia in an insured national population.** *J Vasc Surg* 2014, **60**(3):686-695 e682.
13. Kannel WB, Wilson PW: **Risk factors that attenuate the female coronary disease advantage.** *Arch Intern Med* 1995, **155**(1):57-61.
14. Wilson PW, Castelli WP, Kannel WB: **Coronary risk prediction in adults (the Framingham Heart Study).** *Am J Cardiol* 1987, **59**(14):91G-94G.
15. Murabito JM, Evans JC, Nieto K, Larson MG, Levy D, Wilson PW: **Prevalence and clinical correlates of peripheral arterial disease in the Framingham Offspring Study.** *Am Heart J* 2002, **143**(6):961-965.
16. Selvin E, Erlinger TP: **Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000.** *Circulation* 2004, **110**(6):738-743.
17. Criqui MH, Aboyans V: **Epidemiology of peripheral artery disease.** *Circ Res* 2015, **116**(9):1509-1526.
18. Cambou JP, Aboyans V, Constans J, Lacroix P, Dentans C, Bura A: **Characteristics and outcome of patients hospitalised for lower extremity peripheral artery disease in France: the COPART Registry.** *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2010, **39**(5):577-585.
19. Willigendael EM, Teijink JA, Bartelink ML, Peters RJ, Buller HR, Prins MH: **Smoking and the patency of lower extremity bypass grafts: a meta-analysis.** *J Vasc Surg* 2005, **42**(1):67-74.
20. Ambrose JA, Barua RS: **The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update.** *J Am Coll Cardiol* 2004, **43**(10):1731-1737.
21. Newman AB, Siscovick DS, Manolio TA, Polak J, Fried LP, Borhani NO, Wolfson SK: **Ankle-arm index as a marker of atherosclerosis in the Cardiovascular Health Study. Cardiovascular Health Study (CHS) Collaborative Research Group.** *Circulation* 1993, **88**(3):837-845.
22. Al-Delaimy WK, Merchant AT, Rimm EB, Willett WC, Stampfer MJ, Hu FB: **Effect of type 2 diabetes and its duration on the risk of peripheral arterial disease among men.** *Am J Med* 2004, **116**(4):236-240.
23. Selvin E, Marinopoulos S, Berkenblit G, Rami T, Brancati FL, Powe NR, Golden SH: **Meta-analysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus.** *Ann Intern Med* 2004, **141**(6):421-431.

24. Adler AI, Stevens RJ, Neil A, Stratton IM, Boulton AJ, Holman RR: **UKPDS 59: hyperglycemia and other potentially modifiable risk factors for peripheral vascular disease in type 2 diabetes.** *Diabetes Care* 2002, **25**(5):894-899.
25. Murabito JM, D'Agostino RB, Silbershatz H, Wilson WF: **Intermittent claudication. A risk profile from The Framingham Heart Study.** *Circulation* 1997, **96**(1):44-49.
26. Fowkes FG, Aboyans V, Fowkes FJ, McDermott MM, Sampson UK, Criqui MH: **Peripheral artery disease: epidemiology and global perspectives.** *Nat Rev Cardiol* 2017, **14**(3):156-170.
27. Aboyans V, Sevestre MA, Desormais I, Lacroix P, Fowkes G, Criqui MH: **[Epidemiology of lower extremity artery disease].** *Presse Med* 2018, **47**(1):38-46.
28. Tendera M, Aboyans V, Bartelink ML, Baumgartner I, Clement D, Collet JP, Cremonesi A, De Carlo M, Erbel R, Fowkes FG *et al*: **ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases: Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries: the Task Force on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Artery Diseases of the European Society of Cardiology (ESC).** *Eur Heart J* 2011, **32**(22):2851-2906.
29. Baigent C, Blackwell L, Collins R, Emberson J, Godwin J, Peto R, Buring J, Hennekens C, Kearney P, Meade T *et al*: **Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials.** *Lancet* 2009, **373**(9678):1849-1860.
30. Rose GA: **The diagnosis of ischaemic heart pain and intermittent claudication in field surveys.** *Bull World Health Organ* 1962, **27**:645-658.
31. Criqui MH, Denenberg JO, Bird CE, Fronck A, Klauber MR, Langer RD: **The correlation between symptoms and non-invasive test results in patients referred for peripheral arterial disease testing.** *Vasc Med* 1996, **1**(1):65-71.
32. Morley RL, Sharma A, Horsch AD, Hinchliffe RJ: **Peripheral artery disease.** *BMJ* 2018, **360**:j5842.
33. Farber A: **Chronic Limb-Threatening Ischemia.** *N Engl J Med* 2018, **379**(2):171-180.
34. Mascarenhas JV, Albayati MA, Shearman CP, Jude EB: **Peripheral arterial disease.** *Endocrinol Metab Clin North Am* 2014, **43**(1):149-166.
35. Winsor T: **Influence of arterial disease on the systolic blood pressure gradients of the extremity.** *Am J Med Sci* 1950, **220**(2):117-126.
36. Petznick AM, Shubrook JH: **Treatment of specific macrovascular beds in patients with diabetes mellitus.** *Osteopath Med Prim Care* 2010, **4**:5.
37. Yao ST, Hobbs JT, Irvine WT: **Ankle systolic pressure measurements in arterial disease affecting the lower extremities.** *Br J Surg* 1969, **56**(9):676-679.

38. Ouriel K, McDonnell AE, Metz CE, Zarins CK: **Critical evaluation of stress testing in the diagnosis of peripheral vascular disease.** *Surgery* 1982, **91**(6):686-693.
39. Aboyans V, Lacroix P, Lebourdon A, Preux PM, Ferrieres J, Laskar M: **The intra- and interobserver variability of ankle-arm blood pressure index according to its mode of calculation.** *J Clin Epidemiol* 2003, **56**(3):215-220.
40. Aboyans V, Criqui MH, Abraham P, Allison MA, Creager MA, Diehm C, Fowkes FG, Hiatt WR, Jonsson B, Lacroix P *et al*: **Measurement and interpretation of the ankle-brachial index: a scientific statement from the American Heart Association.** *Circulation* 2012, **126**(24):2890-2909.
41. **Peripheral arterial disease in people with diabetes.** *Diabetes Care* 2003, **26**(12):3333-3341.
42. Pecoraro RE, Ahroni JH, Boyko EJ, Stensel VL: **Chronology and determinants of tissue repair in diabetic lower-extremity ulcers.** *Diabetes* 1991, **40**(10):1305-1313.
43. Collins R, Burch J, Cranny G, Aguiar-Ibanez R, Craig D, Wright K, Berry E, Gough M, Kleijnen J, Westwood M: **Duplex ultrasonography, magnetic resonance angiography, and computed tomography angiography for diagnosis and assessment of symptomatic, lower limb peripheral arterial disease: systematic review.** *BMJ* 2007, **334**(7606):1257.
44. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA: **10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes.** *N Engl J Med* 2008, **359**(15):1577-1589.
45. Vainas T, Stassen FR, de Graaf R, Twiss EL, Hengreen SB, Welten RJ, van den Akker LH, van Dieijen-Visser MP, Bruggeman CA, Kitslaar PJ: **C-reactive protein in peripheral arterial disease: relation to severity of the disease and to future cardiovascular events.** *J Vasc Surg* 2005, **42**(2):243-251.
46. Albayati MA, Shearman CP: **Peripheral arterial disease and bypass surgery in the diabetic lower limb.** *Med Clin North Am* 2013, **97**(5):821-834.
47. Doweik L, Maca T, Schillinger M, Budinsky A, Sabeti S, Minar E: **Fibrinogen predicts mortality in high risk patients with peripheral artery disease.** *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003, **26**(4):381-386.
48. Vidula H, Tian L, Liu K, Criqui MH, Ferrucci L, Pearce WH, Greenland P, Green D, Tan J, Garside DB *et al*: **Biomarkers of inflammation and thrombosis as predictors of near-term mortality in patients with peripheral arterial disease: a cohort study.** *Ann Intern Med* 2008, **148**(2):85-93.
49. **Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients.** *BMJ* 2002, **324**(7329):71-86.
50. **A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee.** *Lancet* 1996, **348**(9038):1329-1339.
51. **Standards of medical care in diabetes--2006.** *Diabetes Care* 2006, **29** Suppl 1:S4-42.

52. **MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial.** *Lancet* 2002, **360**(9326):7-22.
53. **2003 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension.** *J Hypertens* 2003, **21**(6):1011-1053.
54. Sleight P: **The HOPE Study (Heart Outcomes Prevention Evaluation).** *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2000, **1**(1):18-20.
55. Jones WS, Mi X, Qualls LG, Vemulapalli S, Peterson ED, Patel MR, Curtis LH: **Trends in settings for peripheral vascular intervention and the effect of changes in the outpatient prospective payment system.** *J Am Coll Cardiol* 2015, **65**(9):920-927.
56. Hong MS, Beck AW, Nelson PR: **Emerging national trends in the management and outcomes of lower extremity peripheral arterial disease.** *Ann Vasc Surg* 2011, **25**(1):44-54.
57. Carthy ER: **Lower limb peripheral arterial disease (clinical guideline 147): a guideline summary.** *Ann Med Surg (Lond)* 2013, **2**(1):26-30.
58. Adam DJ, Beard JD, Cleveland T, Bell J, Bradbury AW, Forbes JF, Fowkes FG, Gillespie I, Ruckley CV, Raab G *et al*: **Bypass versus angioplasty in severe ischaemia of the leg (BASIL): multicentre, randomised controlled trial.** *Lancet* 2005, **366**(9501):1925-1934.
59. Marui N, Offermann MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, Alexander RW, Medford RM: **Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells.** *J Clin Invest* 1993, **92**(4):1866-1874.
60. Libby P: **Inflammation in atherosclerosis.** *Nature* 2002, **420**(6917):868-874.
61. Farzaneh-Far A, Rudd J, Weissberg PL: **Inflammatory mechanisms.** *Br Med Bull* 2001, **59**:55-68.
62. Murrant CL: **Structural and functional limitations of the collateral circulation in peripheral artery disease.** *J Physiol* 2008, **586**(24):5845.
63. Vajanto I, Korpisalo P, Karjalainen J, Hakala T, Mäkinen K, Ylä-Herttuala S: **Antegrade flow and peripheral resistance determine the level of endogenous arteriogenesis in patients with superficial femoral artery occlusion.** *Eur J Clin Invest* 2009, **39**(12):1048-1054.
64. Aranguren XL, Verfaillie CM, Luttun A: **Emerging hurdles in stem cell therapy for peripheral vascular disease.** *J Mol Med (Berl)* 2009, **87**(1):3-16.
65. Hudlicka O, Brown MD, Egginton S, Dawson JM: **Effect of long-term electrical stimulation on vascular supply and fatigue in chronically ischemic muscles.** *J Appl Physiol (1985)* 1994, **77**(3):1317-1324.
66. Dragneva G, Korpisalo P, Ylä-Herttuala S: **Promoting blood vessel growth in ischemic diseases: challenges in translating preclinical potential into clinical success.** *Dis Model Mech* 2013, **6**(2):312-322.

67. Baffour R, Garb JL, Kaufman J, Berman J, Rhee SW, Norris MA, Friedmann P: **Angiogenic therapy for the chronically ischemic lower limb in a rabbit model.** *J Surg Res* 2000, **93**(2):219-229.
68. Tang GL, Chang DS, Sarkar R, Wang R, Messina LM: **The effect of gradual or acute arterial occlusion on skeletal muscle blood flow, arteriogenesis, and inflammation in rat hindlimb ischemia.** *J Vasc Surg* 2005, **41**(2):312-320.
69. Madeddu P, Emanuelli C, Spillmann F, Meloni M, Bouby N, Richer C, Alhenc-Gelas F, Van Weel V, Eefting D, Quax PH *et al*: **Murine models of myocardial and limb ischemia: diagnostic end-points and relevance to clinical problems.** *Vascul Pharmacol* 2006, **45**(5):281-301.
70. 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):1546-1558.
71. Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W: **Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb.** *J Clin Invest* 1998, **101**(1):40-50.
72. Burkhardt GE, Spencer JR, Gifford SM, Propper B, Jones L, Sumner N, Cowart J, Rasmussen TE: **A large animal survival model (*Sus scrofa*) of extremity ischemia/reperfusion and neuromuscular outcomes assessment: a pilot study.** *J Trauma* 2010, **69** Suppl 1:S146-153.
73. Nakada MT, Montgomery MO, Nedelman MA, Guerrero JL, Cohen SA, Barnathan ES, Jordan RE: **Clot lysis in a primate model of peripheral arterial occlusive disease with use of systemic or intraarterial reteplase: addition of abciximab results in improved vessel reperfusion.** *J Vasc Interv Radiol* 2004, **15**(2 Pt 1):169-176.
74. Rosenthal SL, Guyton AC: **Hemodynamics of collateral vasodilatation following femoral artery occlusion in anesthetized dogs.** *Circ Res* 1968, **23**(2):239-248.
75. Komai Y, Nakano A, Niimi H: **Capillary angiogenesis and remodeling induced in rat limb by arteriovenous shunting.** *Clin Hemorheol Microcirc* 2005, **32**(3):199-208.
76. Limbourg A, Korff T, Napp LC, Schaper W, Drexler H, Limbourg FP: **Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia.** *Nat Protoc* 2009, **4**(12):1737-1746.
77. Brevetti LS, Paek R, Brady SE, Hoffman JI, Sarkar R, Messina LM: **Exercise-induced hyperemia unmasks regional blood flow deficit in experimental hindlimb ischemia.** *J Surg Res* 2001, **98**(1):21-26.
78. Hellingman AA, Bastiaansen AJ, de Vries MR, Seghers L, Lijkwan MA, Lowik CW, Hamming JF, Quax PH: **Variations in surgical procedures for hind limb ischaemia mouse models result in differences in collateral formation.** *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2010, **40**(6):796-803.

79. Masaki I, Yonemitsu Y, Yamashita A, Sata S, Tanii M, Komori K, Nakagawa K, Hou X, Nagai Y, Hasegawa M *et al*: **Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia: acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor 165 but not of fibroblast growth factor-2.** *Circ Res* 2002, **90**(9):966-973.
80. Bentzon JF, Falk E: **Atherosclerotic lesions in mouse and man: is it the same disease?** *Curr Opin Lipidol* 2010, **21**(5):434-440.
81. Zbinden S, Clavijo LC, Kantor B, Morsli H, Cortes GA, Andrews JA, Jang GJ, Burnett MS, Epstein SE: **Interanimal variability in preexisting collaterals is a major factor determining outcome in experimental angiogenesis trials.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007, **292**(4):H1891-1897.
82. Schaper W: **Collateral circulation: past and present.** *Basic Res Cardiol* 2009, **104**(1):5-21.
83. Zhang H, Prabhakar P, Sealock R, Faber JE: **Wide genetic variation in the native pial collateral circulation is a major determinant of variation in severity of stroke.** *J Cereb Blood Flow Metab* 2010, **30**(5):923-934.
84. Helisch A, Wagner S, Khan N, Drinane M, Wolfram S, Heil M, Ziegelhoeffer T, Brandt U, Pearlman JD, Swartz HM *et al*: **Impact of mouse strain differences in innate hindlimb collateral vasculature.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006, **26**(3):520-526.
85. Marques SM, Campos PP, Castro PR, Cardoso CC, Ferreira MA, Andrade SP: **Genetic background determines mouse strain differences in inflammatory angiogenesis.** *Microvasc Res* 2011, **82**(3):246-252.
86. Buschmann I, Schaper W: **Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth.** *News Physiol Sci* 1999, **14**:121-125.
87. Lotfi S, Patel AS, Mattock K, Egginton S, Smith A, Modarai B: **Towards a more relevant hind limb model of muscle ischaemia.** *Atherosclerosis* 2013, **227**(1):1-8.
88. Austad SN: **Comparative biology of aging.** *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2009, **64**(2):199-201.
89. Westvik TS, Fitzgerald TN, Muto A, Maloney SP, Pimiento JM, Fancher TT, Magri D, Westvik HH, Nishibe T, Velazquez OC *et al*: **Limb ischemia after iliac ligation in aged mice stimulates angiogenesis without arteriogenesis.** *J Vasc Surg* 2009, **49**(2):464-473.
90. Wang J, Peng X, Lassance-Soares RM, Najafi AH, Alderman LO, Sood S, Xue Z, Chan R, Faber JE, Epstein SE *et al*: **Aging-induced collateral dysfunction: impaired responsiveness of collaterals and susceptibility to apoptosis via dysfunctional eNOS signaling.** *J Cardiovasc Transl Res* 2011, **4**(6):779-789.
91. Bosch-Marce M, Okuyama H, Wesley JB, Sarkar K, Kimura H, Liu YV, Zhang H, Strazza M, Rey S, Savino L *et al*: **Effects of aging and hypoxia-inducible factor-1 activity on angiogenic cell mobilization and recovery of perfusion after limb ischemia.** *Circ Res* 2007, **101**(12):1310-1318.

92. Tesch GH, Lim AK: **Recent insights into diabetic renal injury from the db/db mouse model of type 2 diabetic nephropathy.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2011, **300**(2):F301-310.
93. Yan J, Tie G, Park B, Yan Y, Nowicki PT, Messina LM: **Recovery from hind limb ischemia is less effective in type 2 than in type 1 diabetic mice: roles of endothelial nitric oxide synthase and endothelial progenitor cells.** *J Vasc Surg* 2009, **50**(6):1412-1422.
94. Fadini GP, Miorin M, Facco M, Bonamico S, Baesso I, Grego F, Menegolo M, de Kreutzenberg SV, Tiengo A, Agostini C *et al*: **Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus.** *J Am Coll Cardiol* 2005, **45**(9):1449-1457.
95. Hazarika S, Dokun AO, Li Y, Popel AS, Kontos CD, Annex BH: **Impaired angiogenesis after hindlimb ischemia in type 2 diabetes mellitus: differential regulation of vascular endothelial growth factor receptor 1 and soluble vascular endothelial growth factor receptor 1.** *Circ Res* 2007, **101**(9):948-956.
96. Seo HS, Lombardi DM, Polinsky P, Powell-Braxton L, Bunting S, Schwartz SM, Rosenfeld ME: **Peripheral vascular stenosis in apolipoprotein E-deficient mice. Potential roles of lipid deposition, medial atrophy, and adventitial inflammation.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997, **17**(12):3593-3601.
97. Balestrieri ML, Lu SJ, de Nigris F, Giovane A, Williams-Ignarro S, D'Armiento FP, Feng Q, Fiorito C, Testa G, Pastore L *et al*: **Therapeutic angiogenesis in diabetic apolipoprotein E-deficient mice using bone marrow cells, functional hemangioblasts and metabolic intervention.** *Atherosclerosis* 2010, **209**(2):403-414.
98. Tirziu D, Moodie KL, Zhuang ZW, Singer K, Helisch A, Dunn JF, Li W, Singh J, Simons M: **Delayed arteriogenesis in hypercholesterolemic mice.** *Circulation* 2005, **112**(16):2501-2509.
99. Plump AS, Lum PY: **Genomics and cardiovascular drug development.** *J Am Coll Cardiol* 2009, **53**(13):1089-1100.
100. Medina RJ, Barber CL, Sabatier F, Dignat-George F, Melero-Martin JM, Khosrotehrani K, Ohneda O, Randi AM, Chan JKY, Yamaguchi T *et al*: **Endothelial Progenitors: A Consensus Statement on Nomenclature.** *Stem Cells Transl Med* 2017, **6**(5):1316-1320.
101. Qadura M, Terenzi DC, Verma S, Al-Omran M, Hess DA: **Concise Review: Cell Therapy for Critical Limb Ischemia: An Integrated Review of Preclinical and Clinical Studies.** *Stem Cells* 2018, **36**(2):161-171.
102. Travlos GS: **Normal structure, function, and histology of the bone marrow.** *Toxicol Pathol* 2006, **34**(5):548-565.
103. Basile DP, Yoder MC: **Circulating and tissue resident endothelial progenitor cells.** *J Cell Physiol* 2014, **229**(1):10-16.
104. Purhonen S, Palm J, Rossi D, Kaskenpaa N, Rajantie I, Yla-Herttuala S, Alitalo K, Weissman IL, Salven P: **Bone marrow-derived circulating endothelial**

- precursors do not contribute to vascular endothelium and are not needed for tumor growth.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(18):6620-6625.
105. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM: **Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis.** *Science* 1997, **275**(5302):964-967.
 106. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA *et al*: **Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors.** *Blood* 2000, **95**(3):952-958.
 107. Vaughan EE, O'Brien T: **Isolation of circulating angiogenic cells.** *Methods Mol Biol* 2012, **916**:351-356.
 108. O'Neill CL, Guduric-Fuchs J, Chambers SE, O'Doherty M, Bottazzi B, Stitt AW, Medina RJ: **Endothelial cell-derived pentraxin 3 limits the vasoreparative therapeutic potential of circulating angiogenic cells.** *Cardiovasc Res* 2016, **112**(3):677-688.
 109. Medina RJ, O'Neill CL, O'Doherty TM, Knott H, Guduric-Fuchs J, Gardiner TA, Stitt AW: **Myeloid angiogenic cells act as alternative M2 macrophages and modulate angiogenesis through interleukin-8.** *Mol Med* 2011, **17**(9-10):1045-1055.
 110. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP: **Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood.** *J Clin Invest* 2000, **105**(1):71-77.
 111. Tasev D, Koolwijk P, van Hinsbergh VW: **Therapeutic Potential of Human-Derived Endothelial Colony-Forming Cells in Animal Models.** *Tissue Eng Part B Rev* 2016, **22**(5):371-382.
 112. Medina RJ, O'Neill CL, O'Doherty TM, Chambers SE, Guduric-Fuchs J, Neisen J, Waugh DJ, Simpson DA, Stitt AW: **Ex vivo expansion of human outgrowth endothelial cells leads to IL-8-mediated replicative senescence and impaired vasoreparative function.** *Stem Cells* 2013, **31**(8):1657-1668.
 113. Poitevin S, Cussac D, Leroyer AS, Albinet V, Sarlon-Bartoli G, Guillet B, Hubert L, Andrieu-Abadie N, Couderc B, Parini A *et al*: **Sphingosine kinase 1 expressed by endothelial colony-forming cells has a critical role in their revascularization activity.** *Cardiovasc Res* 2014, **103**(1):121-130.
 114. Nagano M, Yamashita T, Hamada H, Ohneda K, Kimura K, Nakagawa T, Shibuya M, Yoshikawa H, Ohneda O: **Identification of functional endothelial progenitor cells suitable for the treatment of ischemic tissue using human umbilical cord blood.** *Blood* 2007, **110**(1):151-160.
 115. Fujita Y, Kawamoto A: **Stem cell-based peripheral vascular regeneration.** *Adv Drug Deliv Rev* 2017, **120**:25-40.
 116. Prockop DJ: **Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues.** *Science* 1997, **276**(5309):71-74.
 117. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN: **Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs.** *Exp Hematol* 1976, **4**(5):267-274.

118. Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M: **Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo.** *Clin Orthop Relat Res* 1980(151):294-307.
119. Bab I, Ashton BA, Gazit D, Marx G, Williamson MC, Owen ME: **Kinetics and differentiation of marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo.** *J Cell Sci* 1986, **84**:139-151.
120. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, McKenzie S, Broxmeyer HE, Moore MA: **Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny.** *Blood* 1980, **56**(2):289-301.
121. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ: **Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**(7):3213-3218.
122. Li H, Ghazanfari R, Zacharaki D, Lim HC, Scheduling S: **Isolation and characterization of primary bone marrow mesenchymal stromal cells.** *Ann N Y Acad Sci* 2016, **1370**(1):109-118.
123. Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L: **Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization.** *Handb Exp Pharmacol* 2006(174):249-282.
124. Binato R, de Souza Fernandez T, Lazzarotto-Silva C, Du Rocher B, Mencialha A, Pizzatti L, Bouzas LF, Abdelhay E: **Stability of human mesenchymal stem cells during in vitro culture: considerations for cell therapy.** *Cell Prolif* 2013, **46**(1):10-22.
125. Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, Moretta A, Montagna D, Maccario R, Villa R, Daidone MG *et al*: **Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms.** *Cancer Res* 2007, **67**(19):9142-9149.
126. Tarte K, Gaillard J, Lataillade JJ, Fouillard L, Becker M, Mossafa H, Tchirkov A, Rouard H, Henry C, Splingard M *et al*: **Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation.** *Blood* 2010, **115**(8):1549-1553.
127. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM: **Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow.** *Blood* 2001, **98**(8):2396-2402.
128. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FH, Willemze R, Fibbe WE, Kanhai HH: **Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation.** *Blood* 2003, **102**(4):1548-1549.
129. Nakahara H, Dennis JE, Bruder SP, Haynesworth SE, Lennon DP, Caplan AI: **In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells.** *Exp Cell Res* 1991, **195**(2):492-503.

130. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH: **Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.** *Mol Biol Cell* 2002, **13**(12):4279-4295.
131. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI: **Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies.** *Bone* 1992, **13**(1):69-80.
132. Galmiche MC, Koteliansky VE, Briere J, Herve P, Charbord P: **Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway.** *Blood* 1993, **82**(1):66-76.
133. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR: **Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.** *Science* 1999, **284**(5411):143-147.
134. Conget PA, Minguell JJ: **Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells.** *J Cell Physiol* 1999, **181**(1):67-73.
135. Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ: **Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential.** *Blood* 2004, **103**(5):1662-1668.
136. Le Blanc K, Ringden O: **Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation.** *Biol Blood Marrow Transplant* 2005, **11**(5):321-334.
137. Gotherstrom C, Ringden O, Tammik C, Zetterberg E, Westgren M, Le Blanc K: **Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells.** *Am J Obstet Gynecol* 2004, **190**(1):239-245.
138. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M *et al*: **Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow.** *Nature* 2002, **418**(6893):41-49.
139. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG: **Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(19):10711-10716.
140. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM: **Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli.** *Blood* 2002, **99**(10):3838-3843.
141. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R *et al*: **Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo.** *Exp Hematol* 2002, **30**(1):42-48.
142. Aggarwal S, Pittenger MF: **Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses.** *Blood* 2005, **105**(4):1815-1822.

143. Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, Curtin P, Maziarz RT, Holland HK, Shpall EJ, McCarthy P, Atkinson K, Cooper BW *et al*: **Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients.** *Biol Blood Marrow Transplant* 2005, **11**(5):389-398.
144. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, Ringden O: **Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells.** *Lancet* 2004, **363**(9419):1439-1441.
145. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM *et al*: **Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium.** *Nature* 2001, **410**(6829):701-705.
146. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA: **Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells.** *J Clin Invest* 2001, **107**(11):1395-1402.
147. Gojo S, Gojo N, Takeda Y, Mori T, Abe H, Kyo S, Hata J, Umezawa A: **In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells.** *Exp Cell Res* 2003, **288**(1):51-59.
148. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE: **Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms.** *Circulation* 2004, **109**(12):1543-1549.
149. Kaplan JM, Youd ME, Lodie TA: **Immunomodulatory activity of mesenchymal stem cells.** *Curr Stem Cell Res Ther* 2011, **6**(4):297-316.
150. De Miguel MP, Fuentes-Julian S, Blazquez-Martinez A, Pascual CY, Aller MA, Arias J, Arnalich-Montiel F: **Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications.** *Curr Mol Med* 2012, **12**(5):574-591.
151. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V: **Mesenchymal stem cells in health and disease.** *Nat Rev Immunol* 2008, **8**(9):726-736.
152. Gruber R, Kandler B, Holzmann P, Vogeke-Kadletz M, Losert U, Fischer MB, Watzek G: **Bone marrow stromal cells can provide a local environment that favors migration and formation of tubular structures of endothelial cells.** *Tissue Eng* 2005, **11**(5-6):896-903.
153. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL: **Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells.** *Circulation* 2004, **109**(10):1292-1298.
154. Kim Y, Kim H, Cho H, Bae Y, Suh K, Jung J: **Direct comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissues and bone marrow in mediating neovascularization in response to vascular ischemia.** *Cell Physiol Biochem* 2007, **20**(6):867-876.
155. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE: **Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum**

- of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 2004, **94**(5):678-685.**
156. Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, Semprun-Prieto L, Delafontaine P, Prockop DJ: **Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6.** *Cell Stem Cell* 2009, **5**(1):54-63.
157. de la Garza-Rodea AS, van der Velde-van Dijke I, Boersma H, Goncalves MA, van Bekkum DW, de Vries AA, Knaan-Shanzer S: **Myogenic properties of human mesenchymal stem cells derived from three different sources.** *Cell Transplant* 2012, **21**(1):153-173.
158. Leroux L, Descamps B, Tojais NF, Seguy B, Oses P, Moreau C, Daret D, Ivanovic Z, Boiron JM, Lamaziere JM *et al*: **Hypoxia preconditioned mesenchymal stem cells improve vascular and skeletal muscle fiber regeneration after ischemia through a Wnt4-dependent pathway.** *Mol Ther* 2010, **18**(8):1545-1552.
159. Guan J, Wang F, Li Z, Chen J, Guo X, Liao J, Moldovan NI: **The stimulation of the cardiac differentiation of mesenchymal stem cells in tissue constructs that mimic myocardium structure and biomechanics.** *Biomaterials* 2011, **32**(24):5568-5580.
160. Lian Q, Zhang Y, Zhang J, Zhang HK, Wu X, Lam FF, Kang S, Xia JC, Lai WH, Au KW *et al*: **Functional mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells attenuate limb ischemia in mice.** *Circulation* 2010, **121**(9):1113-1123.
161. Kang Y, Park C, Kim D, Seong CM, Kwon K, Choi C: **Unsorted human adipose tissue-derived stem cells promote angiogenesis and myogenesis in murine ischemic hindlimb model.** *Microvasc Res* 2010, **80**(3):310-316.
162. Zhang P, Baxter J, Vinod K, Tulenko TN, Di Muzio PJ: **Endothelial differentiation of amniotic fluid-derived stem cells: synergism of biochemical and shear force stimuli.** *Stem Cells Dev* 2009, **18**(9):1299-1308.
163. Marchionni C, Bonsi L, Alviano F, Lanzoni G, Di Tullio A, Costa R, Montanari M, Tazzari PL, Ricci F, Pasquinelli G *et al*: **Angiogenic potential of human dental pulp stromal (stem) cells.** *Int J Immunopathol Pharmacol* 2009, **22**(3):699-706.
164. Ning H, Lin G, Lue TF, Lin CS: **Mesenchymal stem cell marker Stro-1 is a 75 kd endothelial antigen.** *Biochem Biophys Res Commun* 2011, **413**(2):353-357.
165. Lin CS, Xin ZC, Dai J, Lue TF: **Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges.** *Histol Histopathol* 2013, **28**(9):1109-1116.
166. Duffy GP, D'Arcy S, Ahsan T, Nerem RM, O'Brien T, Barry F: **Mesenchymal stem cells overexpressing ephrin-b2 rapidly adopt an early endothelial phenotype with simultaneous reduction of osteogenic potential.** *Tissue Eng Part A* 2010, **16**(9):2755-2768.

167. Su GH, Sun YF, Lu YX, Shuai XX, Liao YH, Liu QY, Han J, Luo P: **Hepatocyte growth factor gene-modified bone marrow-derived mesenchymal stem cells transplantation promotes angiogenesis in a rat model of hindlimb ischemia.** *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2013, **33**(4):511-519.
168. Lu W, Chen X, Si Y, Hong S, Shi Z, Fu W: **Transplantation of Rat Mesenchymal Stem Cells Overexpressing Hypoxia-Inducible Factor 2alpha Improves Blood Perfusion and Arteriogenesis in a Rat Hindlimb Ischemia Model.** *Stem Cells Int* 2017, **2017**:3794817.
169. Yin T, He S, Su C, Chen X, Zhang D, Wan Y, Ye T, Shen G, Wang Y, Shi H *et al*: **Genetically modified human placental derived mesenchymal stem cells with FGF2 and PDGFBB enhance neovascularization in a model of hindlimb ischemia.** *Mol Med Rep* 2015, **12**(4):5093-5099.
170. Han KH, Kim AK, Kim MH, Kim DH, Go HN, Kim DI: **Enhancement of angiogenic effects by hypoxia-preconditioned human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in a mouse model of hindlimb ischemia.** *Cell Biol Int* 2016, **40**(1):27-35.
171. Zanette DL, Lorenzi JC, Panepucci RA, Palma PV, Dos Santos DF, Prata KL, Silva WA, Jr.: **Simvastatin modulates mesenchymal stromal cell proliferation and gene expression.** *PLoS One* 2015, **10**(4):e0120137.
172. Zhang Y, Zhang R, Li Y, He G, Zhang D, Zhang F: **Simvastatin augments the efficacy of therapeutic angiogenesis induced by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a murine model of hindlimb ischemia.** *Mol Biol Rep* 2012, **39**(1):285-293.
173. Wang H, Riha GM, Yan S, Li M, Chai H, Yang H, Yao Q, Chen C: **Shear stress induces endothelial differentiation from a murine embryonic mesenchymal progenitor cell line.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, **25**(9):1817-1823.
174. Farahani RM, Xaymardan M: **Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha as a Marker of Mesenchymal Stem Cells in Development and Stem Cell Biology.** *Stem Cells Int* 2015, **2015**:362753.
175. Wang S, Mo M, Wang J, Sadia S, Shi B, Fu X, Yu L, Tredget EE, Wu Y: **Platelet-derived growth factor receptor beta identifies mesenchymal stem cells with enhanced engraftment to tissue injury and pro-angiogenic property.** *Cell Mol Life Sci* 2018, **75**(3):547-561.
176. Lee EJ, Park HW, Jeon HJ, Kim HS, Chang MS: **Potentiated therapeutic angiogenesis by primed human mesenchymal stem cells in a mouse model of hindlimb ischemia.** *Regen Med* 2013, **8**(3):283-293.
177. Janeczek Portalska K, Leferink A, Groen N, Fernandes H, Moroni L, van Blitterswijk C, de Boer J: **Endothelial differentiation of mesenchymal stromal cells.** *PLoS One* 2012, **7**(10):e46842.
178. Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhauser M, Werner C: **Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro.** *Stem Cells* 2004, **22**(3):377-384.

179. Liu JW, Dunoyer-Geindre S, Serre-Beinier V, Mai G, Lambert JF, Fish RJ, Pernod G, Buehler L, Bounameaux H, Kruithof EK: **Characterization of endothelial-like cells derived from human mesenchymal stem cells.** *J Thromb Haemost* 2007, **5**(4):826-834.
180. Liew A, O'Brien T: **Therapeutic potential for mesenchymal stem cell transplantation in critical limb ischemia.** *Stem Cell Res Ther* 2012, **3**(4):28.
181. Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Murakami S, Matsumoto T, Kangawa K, Kitamura S: **Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia.** *Cardiovasc Res* 2005, **66**(3):543-551.
182. Crosby JR, Kaminski WE, Schattman G, Martin PJ, Raines EW, Seifert RA, Bowen-Pope DF: **Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation.** *Circ Res* 2000, **87**(9):728-730.
183. Conway EM, Collen D, Carmeliet P: **Molecular mechanisms of blood vessel growth.** *Cardiovasc Res* 2001, **49**(3):507-521.
184. Silvestre JS, Smadja DM, Levy BI: **Postischemic revascularization: from cellular and molecular mechanisms to clinical applications.** *Physiol Rev* 2013, **93**(4):1743-1802.
185. Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY *et al*: **Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha.** *Genes Dev* 1998, **12**(2):149-162.
186. Loges S, Roncal C, Carmeliet P: **Development of targeted angiogenic medicine.** *J Thromb Haemost* 2009, **7**(1):21-33.
187. Singh H, Hansen TM, Patel N, Brindle NP: **The molecular balance between receptor tyrosine kinases Tie1 and Tie2 is dynamically controlled by VEGF and TNFalpha and regulates angiopoietin signalling.** *PLoS One* 2012, **7**(1):e29319.
188. Rahimi N: **The ubiquitin-proteasome system meets angiogenesis.** *Mol Cancer Ther* 2012, **11**(3):538-548.
189. Semenza GL: **Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine.** *Cell* 2012, **148**(3):399-408.
190. Chang EI, Loh SA, Ceradini DJ, Lin SE, Bastidas N, Aarabi S, Chan DA, Freedman ML, Giaccia AJ, Gurtner GC: **Age decreases endothelial progenitor cell recruitment through decreases in hypoxia-inducible factor 1alpha stabilization during ischemia.** *Circulation* 2007, **116**(24):2818-2829.
191. Hansen TM, Moss AJ, Brindle NP: **Vascular endothelial growth factor and angiopoietins in neurovascular regeneration and protection following stroke.** *Curr Neurovasc Res* 2008, **5**(4):236-245.
192. Park JE, Keller GA, Ferrara N: **The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF.** *Mol Biol Cell* 1993, **4**(12):1317-1326.

193. Hermann DM, Zechariah A: **Implications of vascular endothelial growth factor for postischemic neurovascular remodeling.** *J Cereb Blood Flow Metab* 2009, **29**(10):1620-1643.
194. Mahabeleshwar GH, Feng W, Reddy K, Plow EF, Byzova TV: **Mechanisms of integrin-vascular endothelial growth factor receptor cross-activation in angiogenesis.** *Circ Res* 2007, **101**(6):570-580.
195. Ferrara N: **Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis.** *Kidney Int* 1999, **56**(3):794-814.
196. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J: **Vascular-specific growth factors and blood vessel formation.** *Nature* 2000, **407**(6801):242-248.
197. Gerwins P, Skoldenberg E, Claesson-Welsh L: **Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis.** *Crit Rev Oncol Hematol* 2000, **34**(3):185-194.
198. Argaw AT, Gurfein BT, Zhang Y, Zameer A, John GR: **VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(6):1977-1982.
199. Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, Schoch H, Euler M, Petit E, Risau W: **Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia.** *Am J Pathol* 2000, **156**(3):965-976.
200. Thibaud Valentin DB, Rosine Guimbaud: **Thérapeutiques ciblées « pour les nuls » : modes d'action des anti-EGFR et des anti-VEGF** 2011, **18**:4-16.
201. JJ F: **Les voies de signalisation cellulaire des facteurs angiogènes.** *VEGF actu* 2010, **N° 21**:7-10.
202. Carmeliet P: **Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis.** *Nat Med* 2000, **6**(4):389-395.
203. Brooks AN, Kilgour E, Smith PD: **Molecular pathways: fibroblast growth factor signaling: a new therapeutic opportunity in cancer.** *Clin Cancer Res* 2012, **18**(7):1855-1862.
204. Khurana R, Simons M: **Insights from angiogenesis trials using fibroblast growth factor for advanced arteriosclerotic disease.** *Trends Cardiovasc Med* 2003, **13**(3):116-122.
205. Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J: **Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2005, **16**(2):139-149.
206. Beenken A, Mohammadi M: **The FGF family: biology, pathophysiology and therapy.** *Nat Rev Drug Discov* 2009, **8**(3):235-253.
207. Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P: **Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors.** *EMBO J* 2002, **21**(7):1743-1753.
208. Renner O, Tsimpas A, Kostin S, Valable S, Petit E, Schaper W, Marti HH: **Time- and cell type-specific induction of platelet-derived growth factor receptor-beta during cerebral ischemia.** *Brain Res Mol Brain Res* 2003, **113**(1-2):44-51.

209. Beck L, Jr., D'Amore PA: **Vascular development: cellular and molecular regulation.** *FASEB J* 1997, **11**(5):365-373.
210. Hirschi KK, Rohovsky SA, Beck LH, Smith SR, D'Amore PA: **Endothelial cells modulate the proliferation of mural cell precursors via platelet-derived growth factor-BB and heterotypic cell contact.** *Circ Res* 1999, **84**(3):298-305.
211. Terpolilli NA, Moskowitz MA, Plesnila N: **Nitric oxide: considerations for the treatment of ischemic stroke.** *J Cereb Blood Flow Metab* 2012, **32**(7):1332-1346.
212. Fiedler U, Augustin HG: **Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation.** *Trends Immunol* 2006, **27**(12):552-558.
213. Rey S, Semenza GL: **Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling.** *Cardiovasc Res* 2010, **86**(2):236-242.
214. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E: **Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis.** *Nature* 1992, **359**(6398):843-845.
215. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N: **Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation.** *J Biol Chem* 1998, **273**(46):30336-30343.
216. Nizet V, Johnson RS: **Interdependence of hypoxic and innate immune responses.** *Nat Rev Immunol* 2009, **9**(9):609-617.
217. Culver C, Sundqvist A, Mudie S, Melvin A, Xirodimas D, Rocha S: **Mechanism of hypoxia-induced NF-kappaB.** *Mol Cell Biol* 2010, **30**(20):4901-4921.
218. Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, Johnson RS, Haddad GG, Karin M: **NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha.** *Nature* 2008, **453**(7196):807-811.
219. McMahan S, Charbonneau M, Grandmont S, Richard DE, Dubois CM: **Transforming growth factor beta1 induces hypoxia-inducible factor-1 stabilization through selective inhibition of PHD2 expression.** *J Biol Chem* 2006, **281**(34):24171-24181.
220. Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W: **Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1.** *Blood* 1999, **94**(5):1561-1567.
221. Loffredo FS, Steinhauser ML, Gannon J, Lee RT: **Bone marrow-derived cell therapy stimulates endogenous cardiomyocyte progenitors and promotes cardiac repair.** *Cell Stem Cell* 2011, **8**(4):389-398.
222. Kong T, Scully M, Shelley CS, Colgan SP: **Identification of Pur alpha as a new hypoxia response factor responsible for coordinated induction of the beta 2 integrin family.** *J Immunol* 2007, **179**(3):1934-1941.

223. Silvestre JS, Mallat Z, Tedgui A, Levy BI: **Post-ischaemic neovascularization and inflammation.** *Cardiovasc Res* 2008, **78**(2):242-249.
224. Preston GA, Zarella CS, Pendergraft WF, 3rd, Rudolph EH, Yang JJ, Sekura SB, Jennette JC, Falk RJ: **Novel effects of neutrophil-derived proteinase 3 and elastase on the vascular endothelium involve in vivo cleavage of NF-kappaB and proapoptotic changes in JNK, ERK, and p38 MAPK signaling pathways.** *J Am Soc Nephrol* 2002, **13**(12):2840-2849.
225. Heil M, Schaper W: **Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis).** *Circ Res* 2004, **95**(5):449-458.
226. Johnson C, Sung HJ, Lessner SM, Fini ME, Galis ZS: **Matrix metalloproteinase-9 is required for adequate angiogenic revascularization of ischemic tissues: potential role in capillary branching.** *Circ Res* 2004, **94**(2):262-268.
227. Fantin A, Vieira JM, Gestri G, Denti L, Schwarz Q, Prykhodzhiy S, Peri F, Wilson SW, Ruhrberg C: **Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction.** *Blood* 2010, **116**(5):829-840.
228. Geissmann F, Jung S, Littman DR: **Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties.** *Immunity* 2003, **19**(1):71-82.
229. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A: **Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes.** *Trends Immunol* 2002, **23**(11):549-555.
230. Dussault S, Maingrette F, Menard C, Michaud SE, Haddad P, Groleau J, Turgeon J, Perez G, Rivard A: **Sildenafil increases endothelial progenitor cell function and improves ischemia-induced neovascularization in hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice.** *Hypertension* 2009, **54**(5):1043-1049.
231. Hur J, Yang HM, Yoon CH, Lee CS, Park KW, Kim JH, Kim TY, Kim JY, Kang HJ, Chae IH *et al*: **Identification of a novel role of T cells in postnatal vasculogenesis: characterization of endothelial progenitor cell colonies.** *Circulation* 2007, **116**(15):1671-1682.
232. Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himel H, Rafii S: **Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells.** *Circ Res* 2001, **88**(2):167-174.
233. Moore MA, Hattori K, Heissig B, Shieh JH, Dias S, Crystal RG, Rafii S: **Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector-mediated elevation of serum levels of SDF-1, VEGF, and angiopoietin-1.** *Ann N Y Acad Sci* 2001, **938**:36-45; discussion 45-37.
234. Petit I, Jin D, Rafii S: **The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis.** *Trends Immunol* 2007, **28**(7):299-307.
235. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T: **Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches.** *Immunity* 2006, **25**(6):977-988.

236. Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA *et al*: **Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand.** *Cell* 2002, **109**(5):625-637.
237. Rafii S, Lyden D: **Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration.** *Nat Med* 2003, **9**(6):702-712.
238. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM: **Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation.** *Nature* 1999, **399**(6736):601-605.
239. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T: **Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization.** *Nat Med* 1999, **5**(4):434-438.
240. Hoover-Plow J, Gong Y: **Challenges for heart disease stem cell therapy.** *Vasc Health Risk Manag* 2012, **8**:99-113.
241. Si Y, Tsou CL, Croft K, Charo IF: **CCR2 mediates hematopoietic stem and progenitor cell trafficking to sites of inflammation in mice.** *J Clin Invest* 2010, **120**(4):1192-1203.
242. Ryu J, Lee CW, Hong KH, Shin JA, Lim SH, Park CS, Shim J, Nam KB, Choi KJ, Kim YH *et al*: **Activation of fractalkine/CX3CR1 by vascular endothelial cells induces angiogenesis through VEGF-A/KDR and reverses hindlimb ischaemia.** *Cardiovasc Res* 2008, **78**(2):333-340.
243. Oh IY, Yoon CH, Hur J, Kim JH, Kim TY, Lee CS, Park KW, Chae IH, Oh BH, Park YB *et al*: **Involvement of E-selectin in recruitment of endothelial progenitor cells and angiogenesis in ischemic muscle.** *Blood* 2007, **110**(12):3891-3899.
244. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S: **PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007, **27**(12):2514-2523.
245. Foubert P, Matrone G, Souttou B, Lere-Dean C, Barateau V, Plouet J, Le Ricousse-Roussanne S, Levy BI, Silvestre JS, Tobelem G: **Coadministration of endothelial and smooth muscle progenitor cells enhances the efficiency of proangiogenic cell-based therapy.** *Circ Res* 2008, **103**(7):751-760.
246. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R, Masaki H, Mori Y, Iba O, Tateishi E *et al*: **Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines.** *Circulation* 2001, **104**(9):1046-1052.
247. Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S, Heil M, Voswinckel R, Helisch A, Schaper W: **Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature.** *Circ Res* 2004, **94**(2):230-238.

248. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Epstein SE: **Bone-marrow-derived cells for enhancing collateral development: mechanisms, animal data, and initial clinical experiences.** *Circ Res* 2004, **95**(4):354-363.
249. Cho HJ, Lee N, Lee JY, Choi YJ, Li M, Wecker A, Jeong JO, Curry C, Qin G, Yoon YS: **Role of host tissues for sustained humoral effects after endothelial progenitor cell transplantation into the ischemic heart.** *J Exp Med* 2007, **204**(13):3257-3269.
250. Dubsky M, Jirkovska A, Bem R, Fejfarova V, Pagacova L, Sixta B, Varga M, Langkramer S, Sykova E, Jude EB: **Both autologous bone marrow mononuclear cell and peripheral blood progenitor cell therapies similarly improve ischaemia in patients with diabetic foot in comparison with control treatment.** *Diabetes Metab Res Rev* 2013, **29**(5):369-376.
251. Rajagopalan S, Mohler E, 3rd, Lederman RJ, Saucedo J, Mendelsohn FO, Olin J, Blebea J, Goldman C, Trachtenberg JD, Pressler M *et al*: **Regional Angiogenesis with Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in peripheral arterial disease: Design of the RAVE trial.** *Am Heart J* 2003, **145**(6):1114-1118.
252. Nikol S, Baumgartner I, Van Belle E, Diehm C, Visona A, Capogrossi MC, Ferreira-Maldent N, Gallino A, Wyatt MG, Wijesinghe LD *et al*: **Therapeutic angiogenesis with intramuscular NV1FGF improves amputation-free survival in patients with critical limb ischemia.** *Mol Ther* 2008, **16**(5):972-978.
253. Belch J, Hiatt WR, Baumgartner I, Driver IV, Nikol S, Norgren L, Van Belle E: **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):1929-1937.
254. Hirata K, Li TS, Nishida M, Ito H, Matsuzaki M, Kasaoka S, Hamano K: **Autologous bone marrow cell implantation as therapeutic angiogenesis for ischemic hindlimb in diabetic rat model.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003, **284**(1):H66-70.
255. Iba O, Matsubara H, Nozawa Y, Fujiyama S, Amano K, Mori Y, Kojima H, Iwasaka T: **Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs.** *Circulation* 2002, **106**(15):2019-2025.
256. 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):3422-3427.
257. Al-Khaldi A, Al-Sabti H, Galipeau J, Lachapelle K: **Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model.** *Ann Thorac Surg* 2003, **75**(1):204-209.
258. Cooke JP, Losordo DW: **Modulating the vascular response to limb ischemia: angiogenic and cell therapies.** *Circ Res* 2015, **116**(9):1561-1578.
259. Pignon B, Sevestre MA, Kanagaratnam L, Pernod G, Stephan D, Emmerich J, Clement C, Sarlon G, Boulon C, Tournois C *et al*: **Autologous Bone Marrow**

- Mononuclear Cell Implantation and Its Impact on the Outcome of Patients With Critical Limb Ischemia- Results of a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial.** *Circ J* 2017, **81**(11):1713-1720.
260. Raval Z, Losordo DW: **Cell therapy of peripheral arterial disease: from experimental findings to clinical trials.** *Circ Res* 2013, **112**(9):1288-1302.
261. Matoba S, Tatsumi T, Murohara T, Imaizumi T, Katsuda Y, Ito M, Saito Y, Uemura S, Suzuki H, Fukumoto S *et al*: **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):1010-1018.
262. Moriya J, Minamino T, Tateno K, Shimizu N, Kuwabara Y, Sato Y, Saito Y, Komuro I: **Long-term outcome of therapeutic neovascularization using peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia.** *Circ Cardiovasc Interv* 2009, **2**(3):245-254.
263. Idei N, Soga J, Hata T, Fujii Y, Fujimura N, Mikami S, Maruhashi T, Nishioka K, Hidaka T, Kihara Y *et al*: **Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation reduces long-term major amputation risk in patients with critical limb ischemia: a comparison of atherosclerotic peripheral arterial disease and Buerger disease.** *Circ Cardiovasc Interv* 2011, **4**(1):15-25.
264. Frangogiannis NG: **Cell therapy for peripheral artery disease.** *Curr Opin Pharmacol* 2018, **39**:27-34.
265. Tateno K, Minamino T, Toko H, Akazawa H, Shimizu N, Takeda S, Kunieda T, Miyauchi H, Oyama T, Matsuura K *et al*: **Critical roles of muscle-secreted angiogenic factors in therapeutic neovascularization.** *Circ Res* 2006, **98**(9):1194-1202.
266. Kawamura A, Horie T, Tsuda I, Abe Y, Yamada M, Egawa H, Iida J, Sakata H, Onodera K, Tamaki T *et al*: **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):226-233.
267. Tachi Y, Fukui D, Wada Y, Koshikawa M, Shimodaira S, Ikeda U, Amano J: **Changes in angiogenesis-related factors in serum following autologous bone marrow cell implantation for severe limb ischemia.** *Expert Opin Biol Ther* 2008, **8**(6):705-712.
268. Dubsky M, Jirkovska A, Bem R, Fejfarova V, Varga M, Kolesar L, Pagacova L, Sykova E, Jude EB: **Role of serum levels of angiogenic cytokines in assessment of angiogenesis after stem cell therapy of diabetic patients with critical limb ischemia.** *Cell Transplant* 2014, **23**(12):1517-1523.
269. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H *et al*: **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):427-435.
270. Hernandez P, Cortina L, Artaza H, Pol N, Lam RM, Dorticos E, Macias C, Hernandez C, del Valle L, Blanco A *et al*: **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):e52-56.
271. Benoit E, O'Donnell TF, Jr., Iafrati MD, Asher E, Bandyk DF, Hallett JW, Lumsden AB, Pearl GJ, Roddy SP, Vijayaraghavan K *et al*: **The role of amputation as an outcome measure in cellular therapy for critical limb ischemia: implications for clinical trial design.** *J Transl Med* 2011, **9**:165.
272. Prochazka V, Gumulec J, Jaluvka F, Salounova D, Jonszta T, Czerny D, Krajca J, Urbanec R, Klement P, Martinek J *et al*: **Cell therapy, a new standard in management of chronic critical limb ischemia and foot ulcer.** *Cell Transplant* 2010, **19**(11):1413-1424.
273. 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):2155-2160.
274. Ozturk A, Kucukardali Y, Tangi F, Erikci A, Uzun G, Bashekim C, Sen H, Terekeci H, Narin Y, Ozyurt M *et al*: **Therapeutical potential of autologous peripheral blood mononuclear cell transplantation in patients with type 2 diabetic critical limb ischemia.** *J Diabetes Complications* 2012, **26**(1):29-33.
275. 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):1335-1342.
276. Onodera R, Teramukai S, Tanaka S, Kojima S, Horie T, Matoba S, Murohara T, Matsubara H, Fukushima M: **Bone marrow mononuclear cells versus G-CSF-mobilized peripheral blood mononuclear cells for treatment of lower limb ASO: pooled analysis for long-term prognosis.** *Bone Marrow Transplant* 2011, **46**(2):278-284.
277. Kawachi Y, Watanabe A, Uchida T, Yoshizawa K, Kurooka N, Setsu K: **Acute arterial thrombosis due to platelet aggregation in a patient receiving granulocyte colony-stimulating factor.** *Br J Haematol* 1996, **94**(2):413-416.
278. Fukumoto Y, Miyamoto T, Okamura T, Gondo H, Iwasaki H, Horiuchi T, Yoshizawa S, Inaba S, Harada M, Niho Y: **Angina pectoris occurring during granulocyte colony-stimulating factor-combined preparatory regimen for autologous peripheral blood stem cell transplantation in a patient with acute myelogenous leukaemia.** *Br J Haematol* 1997, **97**(3):666-668.
279. Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, Park KW, Cho HJ, Koo BK, Kim YJ, Soo Lee D, Sohn DW, Han KS *et al*: **Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial.** *Lancet* 2004, **363**(9411):751-756.

280. Caplan AI, Correa D: **The MSC: an injury drugstore.** *Cell Stem Cell* 2011, **9**(1):11-15.
281. Tournois C, Pignon B, Sevestre MA, Al-Rifai R, Creuza V, Poitevin G, Francois C, Nguyen P: **Cell therapy in critical limb ischemia: A comprehensive analysis of two cell therapy products.** *Cytotherapy* 2017, **19**(2):299-310.
282. Benoit E, O'Donnell TF, Patel AN: **Safety and efficacy of autologous cell therapy in critical limb ischemia: a systematic review.** *Cell Transplant* 2013, **22**(3):545-562.
283. Lu D, Chen B, Liang Z, Deng W, Jiang Y, Li S, Xu J, Wu Q, Zhang Z, Xie B *et al*: **Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: a double-blind, randomized, controlled trial.** *Diabetes Res Clin Pract* 2011, **92**(1):26-36.
284. Walter DH, Krankenberg H, Balzer JO, Kalka C, Baumgartner I, Schluter M, Tonn T, Seeger F, Dimmeler S, Lindhoff-Last E *et al*: **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.
285. Klepanec A, Mistrik M, Altaner C, Valachovicova M, Olejarova I, Slysco R, Balazs T, Urandova T, Hladikova D, Liska B *et al*: **No difference in intra-arterial and intramuscular delivery of autologous bone marrow cells in patients with advanced critical limb ischemia.** *Cell Transplant* 2012, **21**(9):1909-1918.
286. Malyar NM, Radtke S, Malyar K, Arjumand J, Horn PA, Kroger K, Freisinger E, Reinecke H, Giebel B, Brock FE: **Autologous bone marrow mononuclear cell therapy improves symptoms in patients with end-stage peripheral arterial disease and reduces inflammation-associated parameters.** *Cytotherapy* 2014, **16**(9):1270-1279.
287. Teraa M, Sprengers RW, Schutgens RE, Slaper-Cortenbach IC, van der Graaf Y, Algra A, van der Tweel I, Doevendans PA, Mali WP, Moll FL *et al*: **Effect of repetitive intra-arterial infusion of bone marrow mononuclear cells in patients with no-option limb ischemia: the randomized, double-blind, placebo-controlled Rejuvenating Endothelial Progenitor Cells via Transcutaneous Intra-arterial Supplementation (JUVENTAS) trial.** *Circulation* 2015, **131**(10):851-860.
288. Aicher A, Rentsch M, Sasaki K, Ellwart JW, Fandrich F, Siebert R, Cooke JP, Dimmeler S, Heeschen C: **Nonbone marrow-derived circulating progenitor cells contribute to postnatal neovascularization following tissue ischemia.** *Circ Res* 2007, **100**(4):581-589.
289. Capoccia BJ, Robson DL, Levac KD, Maxwell DJ, Hohm SA, Neelamkavil MJ, Bell GI, Xenocostas A, Link DC, Piwnicka-Worms D *et al*: **Revascularization of ischemic limbs after transplantation of human bone marrow cells with high aldehyde dehydrogenase activity.** *Blood* 2009, **113**(21):5340-5351.

290. Losordo DW, Dimmeler S: **Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapies.** *Circulation* 2004, **109**(22):2692-2697.
291. Amato B, Compagna R, Della Corte GA, Martino G, Bianco T, Coretti G, Rossi R, Braucci A, Aprea G, Zeppa P *et al*: **Peripheral blood mono-nuclear cells implantation in patients with peripheral arterial disease: a pilot study for clinical and biochemical outcome of neoangiogenesis.** *BMC Surg* 2012, **12** Suppl 1:S1.
292. Sun L, Wu L, Qiao Z, Yu J, Li L, Li S, Liu Q, Hu Y, Xu N, Huang P: **Analysis of possible factors relating to prognosis in autologous peripheral blood mononuclear cell transplantation for critical limb ischemia.** *Cytotherapy* 2014, **16**(8):1110-1116.
293. Napoli C, Farzati B, Sica V, Iannuzzi E, Coppola G, Silvestroni A, Balestrieri ML, Florio A, Matarazzo A: **Beneficial effects of autologous bone marrow cell infusion and antioxidants/L-arginine in patients with chronic critical limb ischemia.** *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2008, **15**(6):709-718.
294. Suzuki J, Shimamura M, Suda H, Wakayama K, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Isobe M, Komuro I, Morishita R: **Current therapies and investigational drugs for peripheral arterial disease.** *Hypertens Res* 2016, **39**(4):183-191.
295. Horie T, Onodera R, Akamastu M, Ichikawa Y, Hoshino J, Kaneko E, Iwashita C, Ishida A, Tsukamoto T, Teramukai S *et al*: **Long-term clinical outcomes for patients with lower limb ischemia implanted with G-CSF-mobilized autologous peripheral blood mononuclear cells.** *Atherosclerosis* 2010, **208**(2):461-466.
296. Tournois C, Pignon B, Sevestre MA, Djerada Z, Capiod JC, Poitevin G, Delloup AM, Nguyen P: **Critical limb ischemia: thrombogenic evaluation of two autologous cell therapy products and biologic profile in treated patients.** *Transfusion* 2015, **55**(11):2692-2701.
297. Peeters Weem SM, Teraa M, de Borst GJ, Verhaar MC, Moll FL: **Bone Marrow derived Cell Therapy in Critical Limb Ischemia: A Meta-analysis of Randomized Placebo Controlled Trials.** *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2015, **50**(6):775-783.
298. Li M, Zhou H, Jin X, Wang M, Zhang S, Xu L: **Autologous bone marrow mononuclear cells transplant in patients with critical leg ischemia: preliminary clinical results.** *Exp Clin Transplant* 2013, **11**(5):435-439.
299. Capiod JC, Tournois C, Vitry F, Sevestre MA, Daliphard S, Reix T, Nguyen P, Lefrere 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):256-265.
300. Ai M, Yan CF, Xia FC, Zhou SL, He J, Li CP: **Safety and efficacy of cell-based therapy on critical limb ischemia: A meta-analysis.** *Cytotherapy* 2016, **18**(6):712-724.
301. Vanneaux V, El-Ayoubi F, Delmau C, Driancourt C, Lecourt S, Grelier A, Cras A, Cucuini W, Soulier J, Lataillade JJ *et al*: **In vitro and in vivo analysis of**

- endothelial progenitor cells from cryopreserved umbilical cord blood: are we ready for clinical application?** *Cell Transplant* 2010, **19**(9):1143-1155.
302. Kawamoto A, Katayama M, Handa N, Kinoshita M, Takano H, Horii M, Sadamoto K, Yokoyama A, Yamanaka T, Onodera R *et al*: **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):2857-2864.
303. Burt RK, Testori A, Oyama Y, Rodriguez HE, Young K, Villa M, Bucha JM, Milanetti F, Sheehan J, Rajamannan N *et al*: **Autologous peripheral blood CD133+ cell implantation for limb salvage in patients with critical limb ischemia.** *Bone Marrow Transplant* 2010, **45**(1):111-116.
304. Perin EC, Murphy MP, March KL, Bolli R, Loughran J, Yang PC, Leeper NJ, Dalman RL, Alexander J, Henry TD *et al*: **Evaluation of Cell Therapy on Exercise Performance and Limb Perfusion in Peripheral Artery Disease: The CCTRN PACE Trial (Patients With Intermittent Claudication Injected With ALDH Bright Cells).** *Circulation* 2017, **135**(15):1417-1428.
305. Kim SW, Han H, Chae GT, Lee SH, Bo S, Yoon JH, Lee YS, Lee KS, Park HK, Kang KS: **Successful stem cell therapy using umbilical cord blood-derived multipotent stem cells for Buerger's disease and ischemic limb disease animal model.** *Stem Cells* 2006, **24**(6):1620-1626.
306. Dash NR, Dash SN, Routray P, Mohapatra S, Mohapatra PC: **Targeting nonhealing ulcers of lower extremity in human through autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells.** *Rejuvenation Res* 2009, **12**(5):359-366.
307. Lasala GP, Silva JA, Minguell JJ: **Therapeutic angiogenesis in patients with severe limb ischemia by transplantation of a combination stem cell product.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012, **144**(2):377-382.
308. Lasala GP, Silva JA, Gardner PA, Minguell JJ: **Combination stem cell therapy for the treatment of severe limb ischemia: safety and efficacy analysis.** *Angiology* 2010, **61**(6):551-556.
309. Gupta PK, Chullikana A, Parakh R, Desai S, Das A, Gottipamula S, Krishnamurthy S, Anthony N, Pherwani A, Majumdar AS: **A double blind randomized placebo controlled phase I/II study assessing the safety and efficacy of allogeneic bone marrow derived mesenchymal stem cell in critical limb ischemia.** *J Transl Med* 2013, **11**:143.
310. Fadini GP, Agostini C, Avogaro A: **Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease meta-analysis and systematic review of the literature.** *Atherosclerosis* 2010, **209**(1):10-17.
311. Liew A, Bhattacharya V, Shaw J, Stansby G: **Cell Therapy for Critical Limb Ischemia: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials.** *Angiology* 2016, **67**(5):444-455.
312. Rigato M, Monami M, Fadini GP: **Autologous Cell Therapy for Peripheral Arterial Disease: Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized,**

- Nonrandomized, and Noncontrolled Studies.** *Circ Res* 2017, **120**(8):1326-1340.
313. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Sasaki K, Duan J, Imaizumi T: **Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation.** *Circulation* 2001, **103**(6):897-903.
314. Pignon B, Sevestre MA, Chatelain D, Albertini JN, Sevestre H: **Histological changes after implantation of autologous bone marrow mononuclear cells for chronic critical limb ischemia.** *Bone Marrow Transplant* 2007, **39**(10):647-648.
315. De Angelis B, Gentile P, Orlandi F, Bocchini I, Di Pasquali C, Agovino A, Gizzi C, Patrizi F, Scioli MG, Orlandi A *et al*: **Limb rescue: a new autologous-peripheral blood mononuclear cells technology in critical limb ischemia and chronic ulcers.** *Tissue Eng Part C Methods* 2015, **21**(5):423-435.
316. Pipinos, II, Judge AR, Selsby JT, Zhu Z, Swanson SA, Nella AA, Dodd SL: **The myopathy of peripheral arterial occlusive disease: part 1. Functional and histomorphological changes and evidence for mitochondrial dysfunction.** *Vasc Endovascular Surg* 2007, **41**(6):481-489.
317. 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):285-290.
318. Hiatt WR, Wolfel EE, Regensteiner JG, Brass EP: **Skeletal muscle carnitine metabolism in patients with unilateral peripheral arterial disease.** *J Appl Physiol (1985)* 1992, **73**(1):346-353.
319. Pipinos, II, Sharov VG, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A, Todor A, Filis KA, Sabbah HN: **Abnormal mitochondrial respiration in skeletal muscle in patients with peripheral arterial disease.** *J Vasc Surg* 2003, **38**(4):827-832.
320. Pipinos, II, Judge AR, Zhu Z, Selsby JT, Swanson SA, Johanning JM, Baxter BT, Lynch TG, Dodd SL: **Mitochondrial defects and oxidative damage in patients with peripheral arterial disease.** *Free Radic Biol Med* 2006, **41**(2):262-269.
321. Anderson JD, Epstein FH, Meyer CH, Hagspiel KD, Wang H, Berr SS, Harthun NL, Weltman A, Dimaria JM, West AM *et al*: **Multifactorial determinants of functional capacity in peripheral arterial disease: uncoupling of calf muscle perfusion and metabolism.** *J Am Coll Cardiol* 2009, **54**(7):628-635.
322. McDermott MM, Liu K, Ferrucci L, Tian L, Guralnik JM, Green D, Tan J, Liao Y, Pearce WH, Schneider JR *et al*: **Circulating blood markers and functional impairment in peripheral arterial disease.** *J Am Geriatr Soc* 2008, **56**(8):1504-1510.
323. Cluff K, Miserlis D, Naganathan GK, Pipinos, II, Koutakis P, Samal A, McComb RD, Subbiah J, Casale GP: **Morphometric analysis of gastrocnemius muscle biopsies from patients with peripheral arterial disease: objective**

- grading of muscle degeneration.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2013, **305**(3):R291-299.
324. Hanlon EB, Manoharan R, Koo TW, Shafer KE, Motz JT, Fitzmaurice M, Kramer JR, Itzkan I, Dasari RR, Feld MS: **Prospects for in vivo Raman spectroscopy.** *Phys Med Biol* 2000, **45**(2):R1-59.
325. Frackowiak D: **The Jablonski diagram.** *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 1988, **2**(3):399.
326. Miljkovic M, Chernenko T, Romeo MJ, Bird B, Matthaus C, Diem M: **Label-free imaging of human cells: algorithms for image reconstruction of Raman hyperspectral datasets.** *Analyst* 2010, **135**(8):2002-2013.
327. Huang YS, Karashima T, Yamamoto M, Hamaguchi HO: **Molecular-level investigation of the structure, transformation, and bioactivity of single living fission yeast cells by time- and space-resolved Raman spectroscopy.** *Biochemistry* 2005, **44**(30):10009-10019.
328. MacNeill BD, Lowe HC, Takano M, Fuster V, Jang IK: **Intravascular modalities for detection of vulnerable plaque: current status.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, **23**(8):1333-1342.
329. Baraga JJ, Feld MS, Rava RP: **In situ optical histochemistry of human artery using near infrared Fourier transform Raman spectroscopy.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**(8):3473-3477.
330. Koljenovic S, Bakker Schut TC, van Meerbeeck JP, Maat AP, Burgers SA, Zondervan PE, Kros JM, Puppels GJ: **Raman microspectroscopic mapping studies of human bronchial tissue.** *J Biomed Opt* 2004, **9**(6):1187-1197.
331. Kirsch M, Schackert G, Salzer R, Krafft C: **Raman spectroscopic imaging for in vivo detection of cerebral brain metastases.** *Anal Bioanal Chem* 2010, **398**(4):1707-1713.
332. Bergholt MS, Zheng W, Lin K, Ho KY, Teh M, Yeoh KG, So JB, Huang Z: **Raman endoscopy for in vivo differentiation between benign and malignant ulcers in the stomach.** *Analyst* 2010, **135**(12):3162-3168.
333. Bonifacio A, Beleites C, Vittur F, Marsich E, Semeraro S, Paoletti S, Sergo V: **Chemical imaging of articular cartilage sections with Raman mapping, employing uni- and multi-variate methods for data analysis.** *Analyst* 2010, **135**(12):3193-3204.
334. Nijssen A, Bakker Schut TC, Heule F, Caspers PJ, Hayes DP, Neumann MH, Puppels GJ: **Discriminating basal cell carcinoma from its surrounding tissue by Raman spectroscopy.** *J Invest Dermatol* 2002, **119**(1):64-69.
335. Shim MG, Song LM, Marcon NE, Wilson BC: **In vivo near-infrared Raman spectroscopy: demonstration of feasibility during clinical gastrointestinal endoscopy.** *Photochem Photobiol* 2000, **72**(1):146-150.
336. Beljebbar A, Dukic S, Amharref N, Manfait M: **Ex vivo and in vivo diagnosis of C6 glioblastoma development by Raman spectroscopy coupled to a microprobe.** *Anal Bioanal Chem* 2010, **398**(1):477-487.

337. Utzinger U HD, Mahadevan-Jansen A, Malpica A, Follen M, and Richards-Kortum R: **Near infrared Raman spectroscopy for in vivo detection of cervical precancers.** *Appl Spectrosc* 2001, **55**::955–959.
338. Jung GB, Kang SW, Lee GJ, Kim D: **Biochemical Characterization of the Brain Hippocampal Areas after Cerebral Ischemia-Reperfusion Using Raman Spectroscopy.** *Appl Spectrosc* 2018, **72**(10):1479-1486.
339. A.N. Baranov IMV, and A.M. Saletsky **Investigation of ischemia damaging action on blood serum by Raman spectroscopy method.** *Laser Phys Lett* 2004, **No. 11**, :555–559.
340. Ohira S, Tanaka H, Harada Y, Minamikawa T, Kumamoto Y, Matoba S, Yaku H, Takamatsu T: **Label-free detection of myocardial ischaemia in the perfused rat heart by spontaneous Raman spectroscopy.** *Sci Rep* 2017, **7**:42401.
341. Cluff K, Kelly AM, Koutakis P, He XN, Huang X, Lu YF, Pipinos, II, Casale GP, Subbiah J: **Surface-enhanced Raman spectral biomarkers correlate with Ankle Brachial Index and characterize leg muscle biochemical composition of patients with peripheral arterial disease.** *Physiol Rep* 2014, **2**(9).
342. Smadja DM, d'Audigier C, Guerin CL, Mauge L, Dizier B, Silvestre JS, Dal Cortivo L, Gaussem P, Emmerich J: **Angiogenic potential of BM MSCs derived from patients with critical leg ischemia.** *Bone Marrow Transplant* 2012, **47**(7):997-1000.
343. Samura M, Hosoyama T, Takeuchi Y, Ueno K, Morikage N, Hamano K: **Therapeutic strategies for cell-based neovascularization in critical limb ischemia.** *J Transl Med* 2017, **15**(1):49.
344. Stellos K, Gawaz M: **Platelet interaction with progenitor cells: potential implications for regenerative medicine.** *Thromb Haemost* 2007, **98**(5):922-929.
345. Blazquez-Prunera A, Diez JM, Gajardo R, Grancha S: **Human mesenchymal stem cells maintain their phenotype, multipotentiality, and genetic stability when cultured using a defined xeno-free human plasma fraction.** *Stem Cell Res Ther* 2017, **8**(1):103.
346. Stultz BG, McGinnis K, Thompson EE, Lo Surdo JL, Bauer SR, Hursh DA: **Chromosomal stability of mesenchymal stromal cells during in vitro culture.** *Cytotherapy* 2016, **18**(3):336-343.
347. Bergers G, Song S: **The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance.** *Neuro Oncol* 2005, **7**(4):452-464.
348. Heemskerk AM, Strijkers GJ, Drost MR, van Bochove GS, Nicolay K: **Skeletal muscle degeneration and regeneration after femoral artery ligation in mice: monitoring with diffusion MR imaging.** *Radiology* 2007, **243**(2):413-421.
349. Koutakis P, Myers SA, Cluff K, Ha DM, Haynatzki G, McComb RD, Uchida K, Miserlis D, Papoutsi E, Johanning JM *et al*: **Abnormal myofiber morphology and limb dysfunction in claudication.** *J Surg Res* 2015, **196**(1):172-179.

350. McDermott MM, Hoff F, Ferrucci L, Pearce WH, Guralnik JM, Tian L, Liu K, Schneider JR, Sharma L, Tan J *et al*: **Lower extremity ischemia, calf skeletal muscle characteristics, and functional impairment in peripheral arterial disease.** *J Am Geriatr Soc* 2007, **55**(3):400-406.

Analyse du site d'implantation de produits de thérapie cellulaire dans un modèle d'ischémie des membres inférieurs :

L'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI) est une affection vasculaire obstructive athéroscléreuse. Elle touche 20% des plus de 70 ans. L'ischémie critique des membres inférieurs (ICMI) est le stade ultime et nécessite une revascularisation. La thérapie cellulaire (TC) tente de promouvoir l'angiogenèse chez les patients en impasse thérapeutique. Les cellules souches mésenchymateuses (MSCs) sont des cellules candidates prometteuses à la TC, car elles associent des propriétés pro-angiogéniques et immunomodulatrices. L'objectif de cette thèse a été : 1) d'évaluer dans un modèle murin d'ischémie de la patte, l'efficacité de deux types de MSCs injectées dans le membre ischémié : les MSCs indifférenciées et les MSCs « *endothelial like* » (MELs) en les comparant aux cellules médullaires de patients atteints d'ICMI; 2) d'analyser le membre ischémié par spectroscopie Raman.

Les MELs et les MSCs ont induit une restauration complète du flux et une amélioration fonctionnelle du membre. Aucune nécrose n'a été signalée après administration des MELs. Histologiquement, les MELs ont induit les taux les plus élevés de néoangiogenèse et de régénération musculaire. La spectroscopie Raman différencie un tissu ischémié d'un tissu sain et indique une augmentation du ratio lipide/protide au cours de l'ischémie.

Notre étude conclut que les MELs rétablissent le flux sanguin et permettent la réparation musculaire. La spectroscopie Raman est une technique non invasive et sensible pouvant être utilisée pour évaluer l'ischémie chez les patients atteints d'ICMI.

Mots clefs : ischémie, cellules souches mésenchymateuses, ischémie des membres inférieurs, thérapie cellulaire

Analysis of the implantation site of cell therapy products in hindlimb ischemia model:

Peripheral artery disease (PAD) is an atherosclerotic obstructive disease affecting lower limbs arteries. It affects nearly 20% of over 70s. Critical limb ischemia (CLI) is the ultimate stage and requires revascularization. Cell therapy (CT) has been proposed for patients with CLI. Mesenchymal stem cells (MSCs) may be a better option as they combine angiogenic and immunomodulatory properties. MSCs can be obtained from bone marrow derived cells (BMCs) of CLI-patients. The aim of this study was first to evaluate, in a murine hindlimb ischemia model, the efficacy of two types of MSCs: undifferentiated MSCs and "endothelial-like" MSCs (MELs) in comparison with currently used BMCs. Secondly, the objective was to perform a non-invasive analysis of ischemic limb using Raman Spectroscopy.

MELs and MSCs induced complete perfusion restoration whereas BMCs did not. The complete flow recovery was significantly earlier with MELs in comparison with MSCs. Both MSCs and MELs improved functionality more efficiently than BMCs. Interestingly, complete limb salvage was observed in the MELs treated group exclusively. In muscles, MELs induced the highest rate of neoangiogenesis and the best muscle repair as shown by the presence of regenerated myofibers. Spectral acquisitions revealed that Raman spectroscopy can discriminate ischemic limb from healthy limb and can grade ischemia over time.

Our study brings evidence that MELs obtained from CLI-patients can restore blood flow and provide muscle repair. Moreover, Raman spectroscopy could be used clinically to assess ischemia in CLI-patients.

Keywords: ischemia, mesenchymal stem cells, peripheral arterial disease, cell therapy

EA 3801, HERVI-Hémostase et Remodelage Vasculaire post-Ischémie