

Caractérisation des progéniteurs endothéliaux et stratégies d'expansion *in vitro*

David M. Smadja et Pascale Gaussem

Université Paris Descartes Inserm Unité 765, Faculté de Pharmacie AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service d'Hématologie Biologique, 75000 Paris, France

Auteur correspondant : Pascale Gaussem, pascale.gaussem@egp.aphp.fr

Reçu le 8 janvier 2008

Résumé – L'injection de progéniteurs endothéliaux (PEC) cultivés *ex vivo* a montré une efficacité dans les modèles précliniques de néovascularisation; cependant l'origine et la définition exacte de la population de cellules responsables de ces bénéfices cliniques restent controversées. Étant donné l'utilité potentielle des PEC comme produit de thérapie cellulaire, leur caractérisation moléculaire est primordiale. Nous décrivons ici les deux principaux types de PEC obtenus en culture cellulaire, et la mise en évidence par notre équipe des BMP2/4 comme marqueurs de PEC tardifs qui, de plus, jouent un rôle important dans la différenciation et l'expansion des PEC. Cette revue récapitule ensuite ce que l'on sait actuellement des différentes méthodes d'expansion *ex vivo* des PEC. Dans cette optique, nous avons choisi d'activer le récepteur PAR-1 de la thrombine. Nous rapportons une amélioration des propriétés angiogéniques des PEC activées *via* la participation des voies du SDF-1, des angiopoïétines et la synthèse de l'IL-8.

Mots clés : Progéniteurs endothéliaux / thrombine / PAR-1 / BMP / expansion

Abstract – Characterization of endothelial progenitor cells and putative strategies to improve their expansion.

Injection of endothelial progenitor cells (EPC) expanded *ex vivo* has been shown to increase neovascularization in preclinical models of ischemia and in adult patients, but the precise origin and identity of the cell population responsible for these clinical benefits are controversial. Given the potential usefulness of EPC as a cell therapy product, their thorough characterization is of major importance. This review describes the two cell populations currently called EPC and the means to find differential phenotypic markers. We have shown that BMP2/4 are specific markers of late EPC and play a key role in EPC commitment and outgrowth during neovascularization. Several authors have attempted to expand EPC *ex vivo* in order to obtain a homogeneous cell therapy product. One possible mean of expanding EPC *ex vivo* is to activate the thrombin receptor PAR-1 with the specific peptide SFLLRN. Indeed, PAR-1 activation increases angiogenic properties of EPC through activation of SDF-1, angiopoietin and IL-8 pathways. This review summarizes the characterization of EPC and different methods of *ex vivo* expansion.

Key words: Endothelial progenitor cells / thrombin / PAR-1 / bone morphogenetic proteins / expansion

Chez l'adulte, l'angiogenèse permet le développement d'un réseau de capillaires par bourgeonnement des vaisseaux préexistants. Depuis 1997, un nouveau

concept a émergé, basé sur la découverte dans le sang périphérique adulte de précurseurs des cellules endothéliales capables de revasculariser un

tissu ischémique dans des modèles pré-cliniques (Asahara *et al.*, 1997). Ces cellules, appelées cellules progénitrices endothéliales (PEC), possèdent une capacité d'expansion qui leur confère une utilité potentielle dans le domaine de la thérapie cellulaire angiogénique autologue pour le traitement des pathologies ischémiques (Urbich & Dimmeler, 2004; Smadja *et al.*, 2007b). Dans les très nombreux articles publiés depuis la découverte des PEC en 1997, ce que l'on appelle un « progéniteur endothélial » par abus de langage est en fait un précurseur engagé dans la lignée endothéliale. Cette cellule est dérivée d'un progéniteur d'origine probablement médullaire dont la nature est mal définie. La moelle adulte contient les cellules souches multipotentes (MAPC) qui, comme leur nom le suggère, peuvent se différencier dans un grand nombre de types cellulaires, y compris les cellules endothéliales (Reyes *et al.*, 2002). Un hémangioblaste – le précurseur commun des cellules souches hématopoïétiques et des cellules endothéliales – a toutefois été identifié chez l'adulte alors qu'on le croyait exister seulement au cours du développement embryonnaire (Pelosi *et al.*, 2002).

Les PEC diffèrent des cellules endothéliales circulantes, qui proviennent d'une lésion de l'endothélium vasculaire (Blann *et al.*, 2005; Delorme *et al.*, 2005; Bonello *et al.*, 2006a; Bonello *et al.*, 2006b) par un potentiel de prolifération supérieur en culture dans un milieu contenant des facteurs de croissance spécifiques. Quand les PEC sont injectés chez des souris immunodéprimées ayant subi une ischémie d'un membre inférieur, ils contribuent à la formation de nouveaux vaisseaux et à la récupération du flux, permettant de sauver le membre ischémié.

Cette revue a pour but de rassembler les données actuelles sur la caractérisation phénotypique et fonctionnelle des PEC et de donner quelques pistes pour conditionner et multiplier ces cellules dans le but de promouvoir un produit de thérapie cellulaire.

1 Isolement des progéniteurs endothéliaux en culture : deux entités cellulaires

Les PEC peuvent être isolés à partir de la moelle osseuse (Quirici *et al.*, 2001), du sang périphérique adulte (Asahara *et al.*, 1997), de sang de cordon ombilical (Murohara *et al.*, 2000), ou encore à partir de foie fœtal (Peichev *et al.*, 2000) ou de tissu adipeux (Planat-Benard *et al.*, 2004). Les méthodes d'isolement classiques sont la mise en culture des cellules mononucléées totales après séparation sur gradient de Ficoll ou après une sélection positive par l'utilisation de microbilles recouvertes d'anticorps spécifiques de marqueurs d'immaturité (CD133, CD34), endothéliaux (CD146) ou monocytaires (CD14).

Les nombreux travaux consacrés à la biologie des PEC au cours des dernières années font apparaître une hétérogénéité phénotypique avec obtention en culture d'au moins deux types de cellules (Gulati *et al.*, 2003; Hur *et al.*, 2004; Yoon *et al.*, 2005) :

- Des cellules adhérentes dites « précoces » (*early*) qui, après 4 à 7 jours de culture, présentent des caractères phénotypiques de cellules endothéliales. Leur potentiel de prolifération est faible et elles expriment, en outre, les marqueurs leucocytaires CD14 et CD45. Cependant, elles sécrètent de nombreuses cytokines qui participeraient à leurs propriétés angiogéniques *in vivo*.
- Des cellules « tardives » (*late*), donnant naissance à des colonies adhérentes, apparaissant en 2 à 3 semaines, à fort potentiel de prolifération. Les cellules qui en dérivent après expansion ont un phénotype endothélial. Ces PEC tardifs expriment le CD34 et le récepteur du VEGF (VEGFR2 ou KDR). Selon leur origine, le potentiel de prolifération de ces cellules est différent, ce qui a conduit l'équipe d'Ingram à établir une hiérarchie à l'intérieur de ces progéniteurs tardifs, similaire à la classification établie pour les cellules souches hématopoïétiques (Ingram *et al.*, 2004; Ingram *et al.*, 2005a; Ingram *et al.*, 2005b).

La distinction en cellules précoces et tardives évoquée par Hur *et al.* en 2004 a clarifié la dénomination des PEC. En effet, jusqu'à présent, ces différents types cellulaires étaient dénommés progéniteurs endothéliaux, avec quelques variantes listées dans la figure 1.

Les PEC précoces, qui expriment le CD14, sont les cellules identifiées par Asahara *et al.* en 1997, et au sujet desquelles la majorité des travaux ont été publiés. Cependant, leur origine et leur réelle appartenance aux cellules progénitrices sont encore discutées.

Plus récemment, l'équipe de Elsheikh (Elsheikh *et al.*, 2005) a tenté d'isoler la sous-population qui possédait des propriétés de cellules endothéliales progénitrices au sein des cellules mononucléées du sang circulant. La population CD14+VEGFR2+ semble être la population cellulaire à l'origine de la revascularisation observée avec des cellules CD14+. Une sous-population de cellules CD14+VEGFR2+ étudiée par l'équipe de Romagnani (Romagnani *et al.*, 2005) présente une expression faible de CD34 (CD34 *low*) ainsi qu'une expression de marqueurs d'immaturité NANOG et OCT4, ce qui suggère qu'il s'agit bien de cellules progénitrices à phénotype endothélial. Enfin, l'équipe de Pampee Young a récemment mis en évidence l'origine myéloïde des PEC précoces obtenus *ex vivo* dans un modèle d'angiogenèse tumorale (Sharpe *et al.*, 2006). Ces différentes données suggèrent que les PEC sont issus de deux voies distinctes de différenciation, dont une au moins fait intervenir un progéniteur myélo-monocytaire.

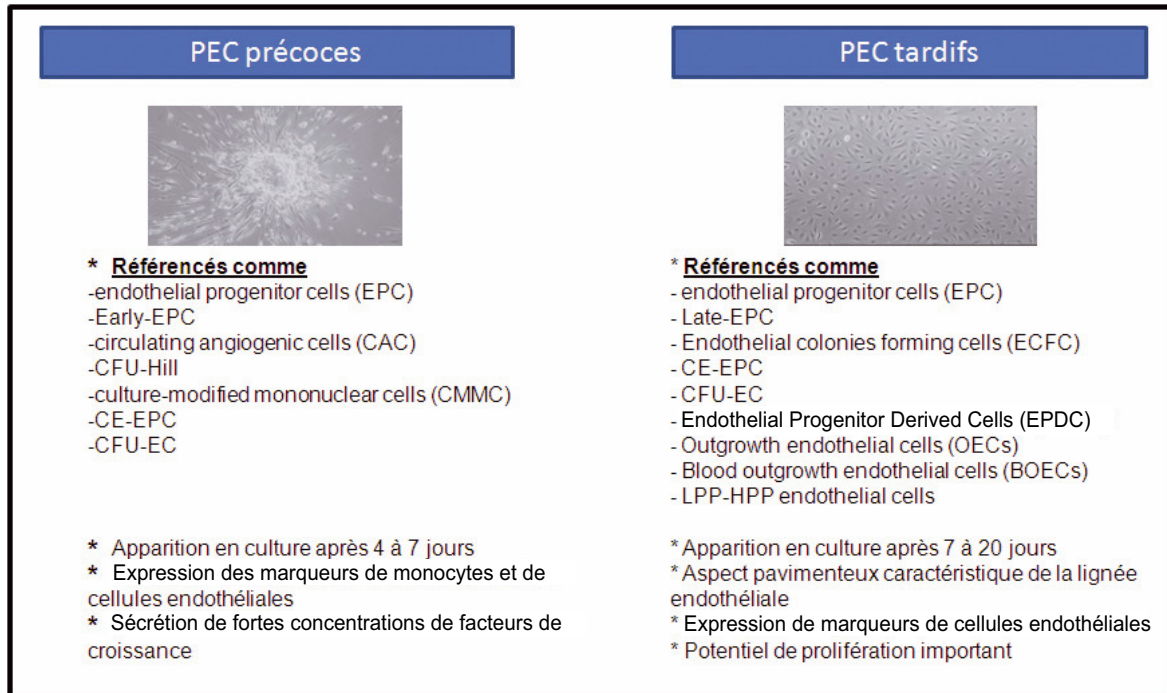


Fig. 1. Caractérisation phénotypique des deux types de progéniteurs endothéliaux.

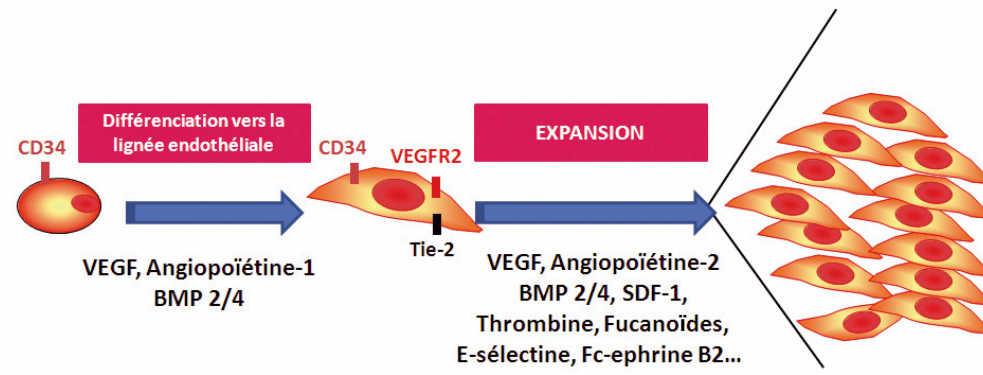


Fig. 2. Facteurs favorisant l'engagement et l'expansion des PEC tardifs.

En 2005, l'équipe de David Ingram a isolé au sein d'un endothélium mature une sous-population qui exerçait des propriétés clonogéniques et prolifératives de progéniteurs endothéliaux tardifs, ce qui a soulevé l'hypothèse d'une niche vasculaire dans l'endothélium (Ingram *et al.*, 2005b). Ainsi, le mur vasculaire pourrait être un réservoir de PEC et une activation de l'endothélium pourrait donc être une source de PEC, qui seraient mobilisés vers la circulation.

2 Caractérisation phénotypique des PEC

L'identification phénotypique des PEC est difficile du fait de l'absence de marqueur spécifique les

différenciant des cellules endothéliales matures de type HUVEC (cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical) ou des cellules endothéliales circulantes. Au niveau des marqueurs membranaires mis en évidence par immunohistochimie, immunofluorescence ou par cytométrie de flux, on retrouve la lectine UEA, le CD31 (PECAM1), le CD146, la VE-cadhérine, ou encore le VEGFR2. Les PEC peuvent être également identifiés grâce à leur incorporation des LDL acétylés (une propriété partagée par les monocytes/macrophages et les cellules endothéliales) ou leur expression intracellulaire de facteur von Willebrand stocké dans les corps de Weibel-Palade. Les seules différences observées entre les cellules progénitrices et les cellules endothéliales

matures résident dans la coexistence de marqueurs d'immaturation de type CD133 ou CD117 et des marqueurs endothéliaux précédemment cités. Toutefois, deux équipes ont récemment publié que les cellules souches CD133+ ne seraient pas à l'origine de la lignée endothéliale (Case *et al.*, 2007; Timmermans *et al.*, 2007).

Comme nous l'avons détaillé dans le paragraphe précédent, deux types de cellules au phénotype endothélial sont obtenus en culture : les PEC précoces et tardifs (Figure 1). Un des marqueurs communs aux deux populations de PEC est le récepteur VEGFR2. Toutefois, la caractérisation phénotypique des PEC ne doit pas être réalisée de manière isolée, mais accompagnée de tests fonctionnels permettant d'affirmer leurs caractéristiques fonctionnelles de cellules progénitrices endothéliales en termes notamment de capacité de prolifération.

Étant donné l'utilité potentielle des PEC non seulement comme marqueur cellulaire de cancer ou de pathologie cardiovasculaire, mais également comme produit de thérapie cellulaire, une meilleure caractérisation des PEC précoces et tardifs est nécessaire. Dans ce contexte, notre équipe a recherché l'expression différentielle de gènes de cellules souches dans chacun de ces types cellulaires. Ainsi, nous avons montré une expression sélective des « *Bone morphogenetic proteins* » 2 et 4 (BMP2/4) dans les PEC tardifs par comparaison aux PEC précoces (Smadja *et al.*, 2008b). Les BMP appartiennent à la famille du TGF β . Ce sont des cytokines impliquées dans la croissance des os et du cartilage et dont le rôle est connu dans l'embryogénèse et la formation précoce du squelette. Plus récemment, la voie des BMP a été impliquée dans l'engagement de la cellule souche embryonnaire vers l'hémangioblaste (Kennedy *et al.*, 2007). Dans ce travail, nous montrons en outre un rôle potentiel des BMP dans la néo-angiogenèse. En effet, BMP2 et 4 induisent *in vitro* (i) l'engagement des cellules CD34+ vers la lignée endothéliale, et (ii) une augmentation du potentiel pro-angiogénique des PEC tardifs, notamment en activant les propriétés de prolifération, de migration et de formation de pseudo-tubes de ces cellules. Enfin, l'ajout de l'inhibiteur spécifique des BMP, Noggin, au *Fibroblast Growth Factor* dans un modèle de Matrigel sous-cutané chez la souris C57/Bl6, induit une inhibition importante de la vascularisation des implants. Dans le modèle d'ischémie de la patte postérieure de la souris *nude*, l'activation des PEC par les BMP augmente leur potentiel pro-angiogénique. Enfin, nous avons caractérisé le phénotype des cellules responsables de la néo-vascularisation observée dans des spécimens d'amputation de patients présentant une ischémie critique de jambe et ayant reçu une injection locale de cellules mononucléées de moelle osseuse en autologue (Van Huyen *et al.*, 2008). Les cel-

lules endothéliales constituant les néovaisseaux sont fortement positives pour BMP2/4, suggérant que les cellules impliquées dans la néo-vascularisation ont un phénotype de PEC tardifs et permettant d'exclure l'hypothèse de l'incorporation de PEC « *early* » au néovaisseau.

3 Exploration fonctionnelle des PEC *in vivo*

L'existence de PEC dans le sang périphérique de l'homme adulte a rapidement suscité des perspectives en thérapie cellulaire. En effet, la preuve du concept, obtenue dans un premier temps chez le petit animal, a permis de valider l'efficacité de ces cellules. Il est à noter que les PEC précoces et tardifs ont un effet similaire et synergique dans ces modèles (Hur *et al.*, 2004; Yoon *et al.*, 2005). Depuis la mise en évidence de l'origine médullaire des PEC, de nombreux essais cliniques ont évalué l'intérêt de l'injection de cellules mononucléées autologues d'origine médullaire dans l'ischémie du myocarde, l'insuffisance cardiaque et l'ischémie critique. Dans l'ischémie du myocarde, plus de 20 essais sont publiés à ce jour, dont près de la moitié randomisés, qui ont montré un effet globalement positif (Jujo *et al.*, 2008; Martin-Rendon *et al.*, 2008). Certains de ces essais ont même utilisé des cellules triées CD34+ ou CD133+. Dans l'ischémie critique, le nombre d'études est plus limité depuis l'étude princeps de Tateishi-Yuyama (Tateishi-Yuyama *et al.*, 2002). Dans notre expérience (étude OPTIPEC, Joseph Emmerich), l'observation de pièces d'amputation de patients ayant reçu une injection locale de cellules médullaires a permis de mettre en évidence un processus actif de néo-vascularisation (Van Huyen *et al.*, 2008; Smadja *et al.*, 2008b).

À l'issue de l'observation des effets bénéfiques retrouvés dans ces essais pré-cliniques et cliniques, une abondante littérature est parue au cours de ces dernières années afin de tenter d'expliquer les rôles respectifs des PEC précoces et tardifs et de mieux connaître leurs propriétés fonctionnelles respectives.

4 Caractérisation fonctionnelle des PEC *in vitro*

Il est probable que les PEC précoces et tardifs ont des fonctions complémentaires, ceci expliquant leur effet synergique *in vivo*. Les PEC précoces sont capables de sécréter de nombreux facteurs de croissance angiogéniques (VEGF, HGF, SDF-1) et de cytokines (IL-8) et ainsi sont capables de stimuler les cellules endothéliales matures (Hur *et al.*, 2004; He *et al.*, 2005;

Urbich *et al.*, 2005a). En revanche, elles n'ont pas la capacité de former des pseudo-tubes (Hur *et al.*, 2004), même en co-culture avec des fibroblastes (Sieveking *et al.*, 2008).

Une des propriétés fonctionnelles qui permet de différencier les PEC précoces et tardifs est leur aptitude à proliférer *in vitro*. Ainsi les PEC précoces sont dépourvus de capacité d'expansion tandis que les PEC tardifs peuvent se multiplier dans un milieu adéquat pendant plus de 5 semaines, ce qui en fait une population intéressante dans le cadre de la mise au point d'un produit de thérapie cellulaire (Hur *et al.*, 2004). De plus, les PEC tardifs ont des propriétés de prolifération et d'expansion différentes selon les sources à partir desquelles ils sont isolés. Ainsi l'équipe de Ingram a suggéré l'existence d'une hiérarchie dans les PEC tardifs, notamment entre les colonies provenant de sang adulte et de sang de cordon (Ingram *et al.*, 2004). Les PEC tardifs ont également montré une capacité plus importante que les cellules endothéliales matures à proliférer *in vitro* (Hur *et al.*, 2004), ainsi qu'une meilleure réactivité aux facteurs de croissance (Bompais *et al.*, 2004). Enfin, les PEC, qu'ils soient précoces ou tardifs, montrent une résistance à l'apoptose et au stress oxydatif plus importante que les cellules endothéliales matures (Dernbach *et al.*, 2004; He *et al.*, 2004). En effet, les PEC sont capables de résister à d'importantes concentrations d'espèces réactives de l'oxygène sans entrer en apoptose grâce notamment à un équipement enzymatique (manganèse superoxyde dismutase et glutathion peroxydase-1) permettant un gain de survie (He *et al.*, 2004; Galasso *et al.*, 2006).

Les propriétés invasives des PEC sont également importantes, expliquant que celles-ci soient capables d'atteindre leur cible ischémique. Ainsi, l'équipe de Stefanie Dimmeler a montré en 2005 que les PEC précoces exprimaient des taux importants de cathepsine L, protéase essentielle à l'invasion des tissus ischémiques par les PEC (Urbich *et al.*, 2005b). De plus, l'équipe de Françoise Dignat-George a caractérisé le potentiel protéolytique de progéniteurs tardifs isolés à partir de sang de cordon. Ces PEC ont un potentiel protéolytique supérieur à celui de cellules endothéliales matures. Ce potentiel repose sur une activité u-PA cellulaire et sécrétée importante, ainsi que sur la surexpression membranaire de l'u-PAR contribuant à leurs capacités de prolifération, de migration et d'organisation en réseau tubulaire *in vitro*. De plus, l'expression de u-PA/u-PAR est encore accrue sous l'effet de facteurs de croissance angiogéniques. Ces données suggèrent qu'un potentiel protéolytique élevé dépendant du système de l'urokinase contribue aux capacités angiogéniques spécifiques des PEC.

Les intégrines, composées de sous-unités α et β , jouent un rôle important dans le « *homing* » et la migration des leucocytes, mais également des PEC. En

effet plusieurs études ont mis en évidence un rôle de la sous-unité $\beta 2$ (Chavakis *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2006). Des études *in vitro* d'adhérence ont indiqué que $\beta 2$ interviendrait dans l'adhérence des progéniteurs endothéliaux et myéloïdes à l'endothélium mature, contrairement aux sous-unités $\beta 1$ qui ne seraient pas impliquées dans ce processus (Chavakis *et al.*, 2005). La contribution des intégrines $\beta 1$ est plus complexe. En effet, $\alpha 4\beta 1$ permettrait d'augmenter l'adhésion des PEC grâce à son ligand VCAM-1 (Peled *et al.*, 1999). De plus, dans un modèle de tumeur, l'inhibition de $\alpha 4\beta 1$ permettrait de bloquer de manière significative l'adhérence et le *homing* des PEC dans des sites d'angiogenèse actifs, évalués par microscopie intra-vitale (Jin *et al.*, 2006). L'intégrine $\alpha 6$ pourrait également être impliquée dans les processus de différenciation des PEC (Smadja *et al.*, 2007a).

5 Préconditionnement des PEC

Une des stratégies de développement d'un produit de thérapie cellulaire pourrait être d'augmenter les propriétés angiogéniques des PEC par un conditionnement *in vitro*.

Ainsi, le traitement des PEC par le VEGF (Smadja *et al.*, 2007a) mais également par les fucoïdanes (Zemani *et al.*, 2005) induisent une augmentation de synthèse d' $\alpha 6$. Le prétraitement des PEC avec du SDF-1 permettrait la surexpression des sous-unités $\alpha 4$ et αM impliquées dans le *homing* des cellules immatures vers le site d'ischémie et renforce l'adhérence des PEC à l'endothélium mature (Zemani *et al.*, 2008). Bien évidemment, ces procédés, s'ils devaient être utilisés en thérapie cellulaire, devront être développés dans des conditions de grade clinique.

L'extrapolation de données pré-cliniques chez la souris avait permis d'estimer la quantité de sang nécessaire à prélever chez l'Homme pour obtenir un produit de thérapie cellulaire endothélial à environ 19 litres. Il faut donc forcément trouver un moyen d'augmenter le nombre de PEC par une mobilisation *in vivo* ou une méthode d'expansion *in vitro* adéquate. Les inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase, les statines, ont été les premières molécules publiées qui ont la capacité de mobiliser les PEC chez des patients coronariens ainsi que dans des modèles expérimentaux (Vasa *et al.*, 2001; Dimmeler *et al.*, 2001). Ceci s'accompagne d'une augmentation des capacités migratrices des PEC *in vitro* et *in vivo*. Les mécanismes par lesquels les statines agissent sur les PEC ne sont pas clairs mais pourraient impliquer l'activation de la PI3-kinase, d'Akt et l'activation de la NO synthase endothéliale (eNOS) (Dimmeler *et al.*, 2001; Landmesser *et al.*, 2004). Le NO joue un rôle crucial dans les PEC et son expression est indispensable pour

la mobilisation des cellules médullaires et des PEC (Aicher *et al.*, 2003, Iwakura *et al.*, 2006, Laufs *et al.*, 2005). De plus, des composés activateurs du NO induisent la différenciation de cellules souches en cellules hématopoïétiques et endothéliales et pourraient être utilisés dans le pré-traitement des cellules de patients présentant un infarctus du myocarde (Sasaki *et al.*, 2006).

D'autres stratégies proposent l'utilisation de la E-selectine soluble (Oh *et al.*, 2007), l'activation de l'Ephrine B4 par le Fc-éphrine B2 (Foubert *et al.*, 2007), ou l'activation de la $\beta 2$ intégrine (Chavakis *et al.*, 2005) par des anticorps, et enfin l'HMGB1 (Chavakis *et al.*, 2007), afin d'augmenter les propriétés angiogéniques des PEC. Une des pistes développées par notre groupe est l'activation du récepteur à la thrombine PAR-1 par le peptide SFLLRN.

6 Rôle de l'activation du PAR-1, principal récepteur de la thrombine, sur les PEC

Les données de la littérature ont montré l'implication du PAR-1 dans l'angiogenèse embryonnaire et le rôle de l'activation du PAR-1 par la thrombine ou par le peptide SFLLRN sur les fonctions biologiques des cellules endothéliales matures. Ces différents travaux nous ont incités à étudier le rôle du PAR-1 dans la biologie des PEC. L'activation spécifique de ce récepteur sur les PEC isolés de sang de cordon par le peptide SFLLRN favorise toutes les étapes de l'angiogenèse que sont la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire (Figure 3) (Smadja *et al.*, 2005).

La prolifération des PEC induite par le SFLLRN est proportionnelle à la concentration de peptide. Cependant, cet effet est observé uniquement au cours des 40 premiers jours de culture. Cette observation confirme des travaux déjà décrits et notamment ceux de Murasawa *et al.* (2002) qui montrent qu'après 21 jours de culture, la longueur des télomères est significativement diminuée, et donc que les cellules perdent progressivement leur potentiel prolifératif, se rapprochant ainsi des propriétés des cellules endothéliales matures. D'ailleurs, nous avons étudié le rôle de PAR-1 sur des PEC issus de sang adulte et l'activation du PAR-1 n'induit pas d'effet prolifératif sur ces cellules. Nos résultats confirment l'hypothèse d'une hiérarchie entre les différents PEC d'origine foetale ou adulte et suggèrent que l'effet pro-angiogénique direct du PAR-1 ne s'exprimerait que chez des progéniteurs très immatures (Smadja *et al.*, 2006a).

Nous avons recherché les interactions possibles du PAR-1 avec l'angiopoïétine 2. En effet, en plus des rôles déjà connus dans la formation de l'arbre vasculaire, Hildbrand *et al.* (2004) ont montré que l'an-

giopoïétine 2 avait un rôle dans l'expansion des PEC *ex vivo*. De plus, il a été décrit que la thrombine induisait la synthèse d'angiopoïétine 2 *in vitro* (Huang *et al.*, 2002), mais également *in vivo* (Caunt *et al.*, 2003, 2006). Ainsi, l'activation du PAR-1 des PEC a été associée à l'induction de l'expression du gène de l'angiopoïétine 2 et de la synthèse de la protéine (Smadja *et al.*, 2006b). Par l'utilisation d'un anticorps bloquant l'angiopoïétine 2, l'effet prolifératif induit par l'activation du PAR-1 est inhibé.

Pour expliquer les effets de l'activation du PAR-1 sur la migration et la différenciation cellulaire, nous avons étudié la modulation de l'expression d'une soixantaine de gènes impliqués dans l'angiogenèse et avons mis en évidence un rôle du système auto-crine SDF-1/CXCR4. Le SFLLRN, de façon dose-dépendante, favorise la migration spontanée des PEC en chambre de Boyden, donc en l'absence de facteur chimiotactique. Cet effet peut être attribué à la réorganisation du cytosquelette d'actine qui joue un rôle important dans la motilité des cellules (Lum *et al.*, 1994). La migration est essentielle pour le *homing* des PEC vers les tissus ischémiques. Les deux principaux facteurs de croissance libérés lors de l'hypoxie d'un tissu induite par une ischémie expérimentale ou clinique sont le VEGF et le SDF-1 (Asahara *et al.*, 1999; Peichev *et al.*, 2000; Yamaguchi *et al.*, 2003). Les cellules activées par le peptide SFLLRN migrent vers le VEGF et le SDF-1, mais toutefois de manière significativement plus importante vers le SDF-1. Un des mécanismes candidats pour expliquer cette réponse vis-à-vis du SDF-1 est l'augmentation de CXCR-4 observée à la surface des cellules. Les PEC cultivés en carence forment peu de bourgeons vasculaires sur Matrigel. Après un conditionnement des PEC avec le SFLLRN, une augmentation des structures tubulaires est observée. L'utilisation d'anticorps anti-CXCR-4 et anti-SDF-1 bloque complètement la formation de pseudotubes, confirmant le rôle de la surexpression de SDF-1 et de CXCR-4 à la suite de l'activation de PAR-1 dans la différenciation cellulaire. La formation de pseudotubes résulte d'un équilibre entre la prolifération, la migration et la différenciation. L'addition de SDF-1 exogène a été testée et n'a montré aucun effet sur la prolifération des PEC. Cette observation est conforme à d'autres études montrant que l'activité pro-angiogénique de SDF-1 est indépendante de la prolifération des cellules endothéliales matures (Mirshahi *et al.*, 2000). Le rôle pro-angiogénique du PAR-1 sur HUVEC a été attribué en partie à une augmentation de synthèse du VEGF (Dupuy *et al.*, 2003) et de son récepteur principal, le VEGFR2 (Tsopanoglou *et al.*, 1999). Dans notre modèle de PEC isolés à partir de sang de cordon, l'activation du PAR-1 sur les PEC n'influence pas la voie VEGF/VEGFR2 de manière significative, que ce soit

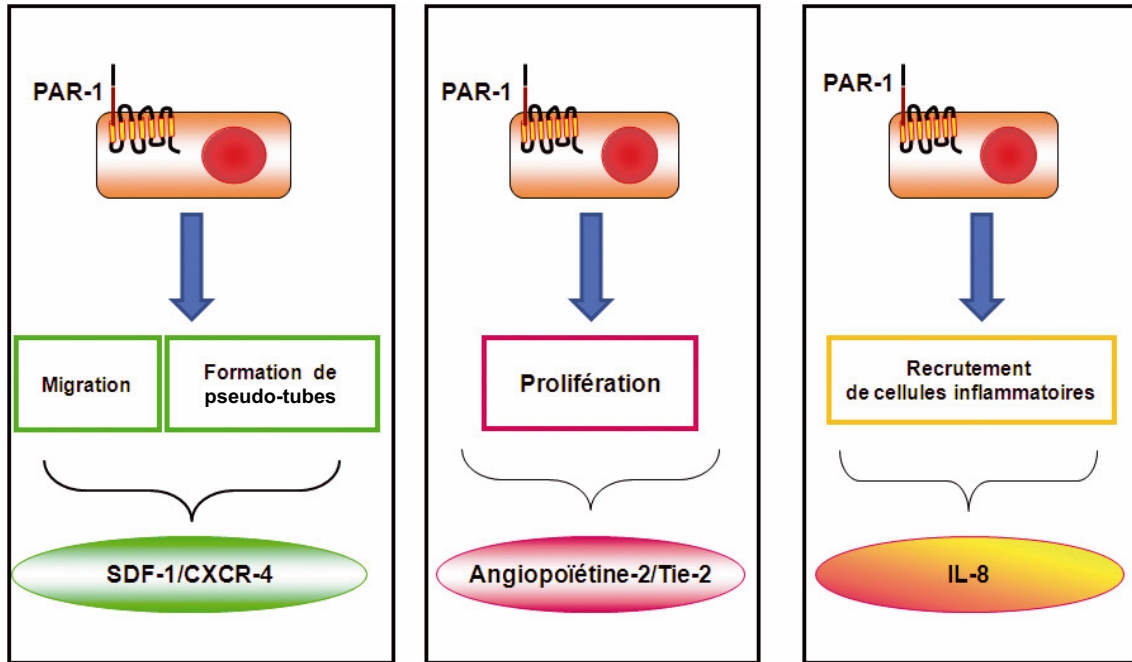


Fig. 3. Rôle pléiotrope de l'activation du principal récepteur de la thrombine (PAR-1) sur les PEC.

au niveau protéique ou au niveau transcriptionnel. De manière concordante, la migration induite par le VEGF est moins efficace que celle induite par le SDF-1. De plus, le blocage de VEGFR2 dans le système de Matrigel ne bloque pas l'augmentation de la formation de tube à la suite de l'activation de PAR-1. Ainsi, l'effet pro-angiogénique du PAR-1 induit par SDF-1/CXCR-4 indépendamment du VEGF pourrait être une spécificité des PEC par rapport aux cellules endothéliales matures.

Enfin, la thrombine est également un facteur pro inflammatoire, tout comme l'interleukine 8 (IL-8), chémokine pro-inflammatoire, qui possède des propriétés angiogéniques par interaction avec ses récepteurs CXCR1 et CXCR2. Ainsi, nous nous sommes intéressés aux interactions potentielles PAR-1/IL-8 sur les PEC précoces et tardifs isolés à partir de sang adulte et de sang de cordon humain. L'IL-8 est fortement exprimée dans les PEC précoces, et son taux dans le milieu conditionné est inchangé après activation du PAR-1. En revanche, la sécrétion d'IL-8 par les PEC tardifs, très faible en conditions basales, est fortement augmentée après activation du PAR-1. L'expression des gènes des récepteurs de l'IL-8, *CXCR1* et *CXCR2*, a été observée uniquement chez les PEC précoces et l'IL-8 des milieux conditionnés de PEC tardifs activés par le peptide activateur de PAR-1 induit la migration en chambre de Boyden des PEC précoces. L'inhibition du PAR-1 par ARN interférent bloque la voie AP-1 et NF- κ B

et abolit la synthèse d'IL-8 aussi bien au niveau basal qu'après stimulation du PAR-1. Ces résultats, qui montrent que l'activation du récepteur à la thrombine PAR-1 induit la synthèse d'IL-8 par les PEC tardifs, suggèrent que ce processus pourrait participer à la coopération entre les deux types de progéniteurs pendant la néovascularisation, médiée par un effet paracrine (Smadja *et al.*, 2008c).

Le rôle de la thrombine est essentiel dans les processus d'athéromatose. Une fraction active de la thrombine étant liée au caillot de fibrine, nous avons également examiné l'impact d'un réseau de fibrine sur les propriétés des PEC. Nous avons montré que le réseau de fibrine autologue constitue une matrice permettant aux PEC d'acquies des propriétés anticoagulantes et antifibrinolytiques en plus de leur propriétés angiogéniques (Smadja *et al.*, 2008a). Ceci pourrait représenter une piste intéressante comme biomatrice pour l'expansion des PEC, d'autant que ce procédé existe déjà en conditions de grade clinique (Bleiziffer *et al.*, article disponible en ligne).

Conclusions

L'ensemble de ces données indique que les cellules progénitrices endothéliales pourraient constituer un outil thérapeutique intéressant pour revasculariser les tissus ischémiques. Ce qui rend ces cellules particulièrement intéressantes est qu'elles présentent un tropisme très fort pour les sites de

néoangiogénèse. Dans ce contexte, l'amplification *in vitro* des PEC circulants pourrait constituer un enjeu clinique considérable dans les pathologies cardiovasculaires et/ou cancéreuses.

Références

- Aicher A., Heeschen C., Mildner-Rihm C., Urbich C., Ihling C., Technau-Ihling K., Zeiher A.M., Dimmeler S., Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med*, 2003, 9, 1370–1376.
- Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., van der Zee R., Li T., Witzenbichler B., Schatteman G., Isner J.M., Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, 275, 964–967.
- Asahara T., Takahashi T., Masuda H., Kalka C., Chen D., Iwaguro H., Inai Y., Silver M., Isner J.M., VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Embo J*, 1999, 18, 3964–3972.
- Blann A.D., Woywodt A., Bertolini F., Bull T.M., Buyon J.P., Clancy R.M., Haubitz M., Heibel R.P., Lip G.Y., Mancuso P., Sampol J., Solovey A., Dignat-George F., Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thromb Haemost*, 2005, 93, 228–235.
- Bompais H., Chagraoui J., Cannon X., Crisan M., Liu X.H., Anjo A., Tolla-Le Port C., Leboeuf M., Charbord P., Bikfalvi A., Uzan G., Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood*, 2004, 103, 2577–2584.
- Bonello L., Basire A., Sabatier F., Paganelli F., Dignat-George F., Endothelial injury induced by coronary angioplasty triggers mobilization of endothelial progenitor cells in patients with stable coronary artery disease. *J Thromb Haemost*, 2006a, 4, 979–981.
- Bonello L., Sabatier F., Basire A., Paganelli F., Dignat-George F., The unbalance between circulating endothelial cells and progenitors in cardiovascular diseases : a mirror of disrupted endothelial integrity. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 2006b, 99, 607–613.
- Case J., Mead L.E., Bessler W.K., Prater D., White H.A., Saadatzadeh M.R., Bhavsar J.R., Yoder M.C., Haneline L.S., Ingram D.A., Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Exp Hematol*, 2007, 35, 1109–1118.
- Caunt M., Hu L., Tang T., Brooks P.C., Ibrahim S., Karpatkin S., Growth-regulated oncogene is pivotal in thrombin-induced angiogenesis. *Cancer Res*, 2006, 66, 4125–4132.
- Caunt M., Huang Y.Q., Brooks P.C., Karpatkin S., Thrombin induces neoangiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. *J Thromb Haemost*, 2003, 1, 2097–2102.
- Chavakis E., Aicher A., Heeschen C., Sasaki K., Kaiser R., El Makhfi N., Urbich C., Peters T., Scharffetter-Kochanek K., Zeiher A.M., Chavakis T., Dimmeler S., Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *J Exp Med*, 2005, 201, 63–72.
- Chavakis E., Hain A., Vinci M., Carmona G., Bianchi M.E., Vajkoczy P., Zeiher A.M., Chavakis T., Dimmeler S., High-mobility group box 1 activates integrin-dependent homing of endothelial progenitor cells. *Circ Res*, 2007, 100, 204–212.
- Delorme B., Basire A., Gentile C., Sabatier F., Monsonis F., Desouches C., Blot-Chabaud M., Uzan G., Sampol J., Dignat-George F., Presence of endothelial progenitor cells, distinct from mature endothelial cells, within human CD146+ blood cells. *Thromb Haemost*, 2005, 94, 1270–1279.
- Dernbach E., Urbich C., Brandes R.P., Hofmann W.K., Zeiher A.M., Dimmeler S., Antioxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells : evidence for enhanced resistance against oxidative stress. *Blood*, 2004, 104, 3591–3597.
- Dimmeler S., Aicher A., Vasa M., Mildner-Rihm C., Adler K., Tiemann M., Rutten H., Fichtlscherer S., Martin H., Zeiher A.M., HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest*, 2001, 108, 391–397.
- Dupuy E., Habib A., Leuret M., Yang R., Lévy-Toledano S., Tobelem G., Thrombin induces angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in human endothelial cells : possible relevance to HIF-1alpha. *J Thromb Haemost*, 2003, 1, 1096–1102.
- Elsheikh E., Uzunel M., He Z., Holgersson J., Nowak G., Sumitran-Holgersson S., Only a specific subset of human peripheral-blood monocytes has endothelial-like functional capacity. *Blood*, 2005, 106, 2347–2355.
- Foubert P., Silvestre J.S., Souttou B., Barateau V., Martin C., Ebrahimi T.G., Leré-Déan C., Contreres J.O., Sulpice E., Levy B.I., Plouet J., Tobelem G., Le Ricousse-Roussanne S., PSGL-1-mediated activation of EphB4 increases the pro-angiogenic potential of endothelial progenitor cells. *J Clin Invest*, 2007, 117, 1527–1537.
- Galasso G., Schiekofer S., Sato K., Shibata R., Handy D.E., Ouchi N., Leopold J.A., Loscalzo J., Walsh K., Impaired angiogenesis in glutathione peroxidase-1-deficient mice is associated with endothelial progenitor cell dysfunction. *Circ Res*, 2006, 98, 254–261.
- Gulati R., Jevremovic D., Peterson T.E., Chatterjee S., Shah V., Vile R.G., Simari R.D., Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Circ Res*, 2003, 93, 1023–1025.
- He T., Peterson T.E., Holmuhamedov E.L., Terzic A., Caplice N.M., Oberley L.W., Katusic Z.S., Human endothelial progenitor cells tolerate oxidative stress due to intrinsically high expression of manganese superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24, 2021–2027.
- He T., Peterson T.E., Katusic Z.S., Paracrine mitogenic effect of human endothelial progenitor cells : role of

- interleukin-8. *Am J Heart Circ Physiol*, 2005, 289, H968–H972.
- Hildbrand P., Cirulli V., Prinsen R.C., Smith K.A., Torbett B.E., Salomon D.R., Crisa L., The role of angiopoietins in the development of endothelial cells from cord blood CD34+ progenitors. *Blood*, 2004, 104, 2010–2019.
- Huang Y.Q., Li J.J., Hu L., Lee M., Karpatkin S., Thrombin induces increased expression and secretion of angiopoietin-2 from human umbilical vein endothelial cells. *Blood*, 2002, 99, 1646–1650.
- Hur J., Yoon C.H., Kim H.S., Choi J.H., Kang H.J., Hwang K.K., Oh B.H., Lee M.M., Park Y.B., Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24, 288–293.
- Ingram D.A., Caplice N.M., Yoder M.C., Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood*, 2005a, 106, 1525–1531.
- Ingram D.A., Mead L.E., Moore D.B., Woodard W., Fenoglio A., Yoder M.C., Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood*, 2005b, 105, 2783–2786.
- Ingram D.A., Mead L.E., Tanaka H., Meade V., Fenoglio A., Mortell K., Pollok K., Ferkowicz M.J., Gilley D., Yoder M.C., Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*, 2004, 104, 2752–2760.
- Iwakura A., Shastry S., Luedemann C., Hamada H., Kawamoto A., Kishore R., Zhu Y., Qin G., Silver M., Thorne T., Eaton L., Masuda H., Asahara T., Losordo D.W., Estradiol enhances recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-mediated activation of matrix metalloproteinase-9. *Circulation*, 2006, 113, 1605–1614.
- Jin H., Aiyer A., Su J., Borgstrom P., Stupack D., Friedlander M., Varner J., A homing mechanism for bone marrow-derived progenitor cell recruitment to the neovasculature. *Clin Invest*, 2006, 116, 652–662.
- Jujo K., Li M., Losordo D.W., Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 2008, 45, 530–544.
- Kennedy M., D'Souza S.L., Lynch-Kattman M., Schwantz S., Keller G., Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures. *Blood*, 2007, 109, 2679–2687.
- Landmesser U., Engberding N., Bahlmann F.H., Schaefer A., Wiencke A., Heineke A., Spiekermann S., Hilfiker-Kleiner D., Templin C., Kotlarz D., Mueller M., Fuchs M., Hornig B., Haller H., Drexler H., Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 2004, 110, 1933–1939.
- Laufs U., Wassmann S., Czech T., Munzel T., Eisenhauer M., Bohm M., Nickenig G., Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25, 809–814.
- Lum H., Malik A.B., Regulation of vascular endothelial barrier function. *Am J Physiol*, 1994, 267, L223–L241.
- Martin-Rendon E., Brunskill S.J., Hyde C.J., Stanworth S.J., Mathur A., Watt S.M., Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction : a systematic review. *Eur Heart J*, 2008, 29, 1807–1818.
- Mirshahi F., Pourtau J., Li H., Muraine M., Trochon V., Legrand E., Vannier J., Soria J., Vasse M., Soria C., SDF-1 activity on microvascular endothelial cells : consequences on angiogenesis in *in vitro* and *in vivo* models. *Thromb Res*, 2000, 99, 587–594.
- Murasawa S., Llevadot J., Silver M., Isner J.M., Losordo D.W., Asahara T., Constitutive human telomerase reverse transcriptase expression enhances regenerative properties of endothelial progenitor cells. *Circulation*, 2002, 106, 1133–1139.
- Murohara T., Ikeda H., Duan J., Shintani S., Sasaki K., Eguchi H., Onitsuka I., Matsui K., Imaizumi T., Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 2000, 105, 1527–1536.
- Oh I.Y., Yoon C.H., Hur J., Kim J.H., Kim T.Y., Lee C.S., Park K.W., Chae I.H., Oh B.H., Park Y.B., Kim H.S., Involvement of E-selectin in recruitment of endothelial progenitor cells and angiogenesis in ischemic muscle. *Blood*, 2007, 110, 3891–3899.
- Peichev M., Naiyer A.J., Pereira D., Zhu Z., Lane W.J., Williams M., Oz M.C., Hicklin D.J., Witte L., Moore M.A., Rafii S., Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, 2000, 95, 952–958.
- Peled A., Grabovsky V., Habler L., Sandbank J., Arenzana-Seisdedos F., Petit I., Ben-Hur H., Lapidot T., Alon R., The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow. *J Clin Invest*, 1999, 104, 1199–1211.
- Pelosi E., Valtieri M., Coppola S., Botta R., Gabbianelli M., Lulli V., Marziali G., Masella B., Muller R., Sgadari C., Testa U., Bonanno G., Peschle C., Identification of the hemangioblast in postnatal life. *Blood*, 2002, 100, 3203–3208.
- Planat-Benard V., Silvestre J.S., Cousin B., André M., Nibelink M., Tamarat R., Clergue M., Manneville C., Saillan-Barreau C., Duriez M., Tedgui A., Levy B., Penicaud L., Casteilla L., Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells : physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*, 2004, 109, 656–663.
- Quirici N., Soligo D., Caneva L., Servida F., Bossolasco P., Delilieri G.L., Differentiation and expansion of

- endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *Brit J Haematol*, 2001, 115, 186–194.
- Reyes M., Dudek A., Jahagirdar B., Koodie L., Marker P.H., Verfaillie C.M., Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest*, 2002, 109, 337–346.
- Romagnani P., Annunziato F., Liotta F., Lazzeri E., Mazzeinghi B., Frosali F., Cosmi L., Maggi L., Lasagni L., Scheffold A., Kruger M., Dimmeler S., Marra F., Gensini G., Maggi E., Romagnani S., CD14+CD34low cells with stem cell phenotypic and functional features are the major source of circulating endothelial progenitors. *Cir Res*, 2005, 97, 314–322.
- Sasaki K., Heeschen C., Aicher A., Ziebart T., Honold J., Urbich C., Rossig L., Koehl U., Koyanagi M., Mohamed A., Brandes R.P., Martin H., Zeiher A.M., Dimmeler S., Ex vivo pretreatment of bone marrow mononuclear cells with endothelial NO synthase enhancer AVE9488 enhances their functional activity for cell therapy. *Pro Natl Acad Sc USA*, 2006, 103, 14537–14541.
- Sharpe E.E., 3rd, Teleron A.A., Li B., Price J., Sands M.S., Alford K., Young P.P., The origin and *in vivo* significance of murine and human culture-expanded endothelial progenitor cells. *Am J Path*, 2006, 168, 1710–1721.
- Sieveking D.P., Buckle A., Celermajer D.S., Ng M.K., Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations : insights from a novel human angiogenesis assay. *J Am Col Cardiol*, 2008, 51, 660–668.
- Smadja D.M., Bièche I., Uzan G., Bompais H., Muller L., Boisson-Vidal C., Vidaud M., Aiach M., Gaussem P., PAR-1 activation on human late endothelial progenitor cells enhances angiogenesis *in vitro* with upregulation of the SDF-1/CXCR4 system. 2005, 25, 2321–2327.
- Smadja D.M., Bièche I., Emmerich J., Aiach M., Gaussem P., PAR-1 activation has different effects on the angiogenic activity of endothelial progenitor cells derived from human adult and cord blood. *J Thromb Haemost*, 2006a, 4, 2729–2731.
- Smadja D.M., Laurendeau I., Avignon C., Vidaud M., Aiach M., Gaussem P., The angiopoietin pathway is modulated by PAR-1 activation on human endothelial progenitor cells. *J Thromb Haemost*, 2006b, 4, 2051–2058.
- Smadja D.M., Bièche I., Helley D., Laurendeau I., Simonin G., Muller L., Aiach M., Gaussem P., Increased VEGFR2 expression during human late endothelial progenitor cells expansion enhances *in vitro* angiogenesis with up-regulation of integrin alpha(6). *J Cell Mol Med*, 2007a, 11, 1149–1161.
- Smadja D.M., Cornet A., Emmerich J., Aiach M., Gaussem P., Endothelial progenitor cells : Characterization, *in vitro* expansion, and prospects for autologous cell therapy. *Cell Biol Toxicol*, 2007b, 23, 223–239.
- Smadja D.M., Basire A., Amelot A., Conte A., Bièche I., Le Bonniec B.F., Aiach M., Gaussem P., Thrombin bound to a fibrin clot confers angiogenic and haemostatic properties on endothelial progenitor cells. *J Cell Mol Med*, 2008a, 12, 975–986.
- Smadja D.M., Bièche I., Silvestre J.S., Germain S., Cornet A., Laurendeau I., Duong-Van-Huyen J.P., Emmerich J., Vidaud M., Aiach M., Gaussem P., Bone morphogenetic proteins 2 and 4 are selectively expressed by late outgrowth endothelial progenitor cells and promote neoangiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008b, 28, 2137–2143.
- Smadja D.M., Bièche I., Susen S., Mauge L., Laurendeau I., d'Audigier C., Grelac F., Emmerich J., Aiach M., Gaussem P., Interleukin 8 is differently expressed and modulated by PAR-1 activation in early and late endothelial progenitor cells. *J Cell Mol Med*, 2008c, in press.
- Tateishi-Yuyama E., Matsubara H., Murohara T., Ikeda U., Shintani S., Masaki H., Amano K., Kishimoto Y., Yoshimoto K., Akashi H., Shimada K., Iwasaka T., Imaizumi T., Therapeutic angiogenesis 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.
- Timmermans F., Van Hauwermeiren F., De Smedt M., Raedt R., Plasschaert F., De Buyzere M.L., Gillebert T.C., Plum J., Vandekerckhove B., Endothelial outgrowth cells are not derived from CD133+ cells or CD45+ hematopoietic precursors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27, 1572–1579.
- Tsopanoglou N.E., Maragoudakis M.E., On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis. Potentiation of vascular endothelial growth factor activity on endothelial cells by up-regulation of its receptors. *J Biol Chem*, 1999, 274, 23969–23976.
- Urbich C., Dimmeler S., Endothelial progenitor cells : characterization and role in vascular biology. *Circ Res*, 2004, 95, 343–353.
- Urbich C., Aicher A., Heeschen C., Dernbach E., Hofmann W.K., Zeiher A.M., Dimmeler S., Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol*, 2005a, 39, 733–742.
- Urbich C., Heeschen C., Aicher A., Sasaki K., Bruhl T., Farhadi M.R., Vajkoczy P., Hofmann W.K., Peters C., Pennacchio L.A., Abolmaali N.D., Chavakis E., Reinheckel T., Zeiher A.M., Dimmeler S., Cathepsin L is required for endothelial progenitor cell-induced neovascularization. *Nat Med*, 2005b, 11, 206–213.
- Van Huyen J.P., Smadja D.M., Bruneval P., Gaussem P., Dal-Cortivo L., Julia P., Fiessinger J.N., Cavazzana-Calvo M., Aiach M., Emmerich J., Bone marrow-derived mononuclear cell therapy induces distal angiogenesis after local injection in critical leg ischemia. *Mod Pathol*, 2008, 21, 837–846.
- Vasa M., Fichtlscherer S., Adler K., Aicher A., Martin H., Zeiher A.M., Dimmeler S., Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation*, 2001, 103, 2885–2890.
- Wu Y., Ip J.E., Huang J., Zhang L., Matsushita K., Liew C.C., Pratt R.E., Dzau V.J., Essential role of

- ICAM-1/CD18 in mediating EPC recruitment, angiogenesis, and repair to the infarcted myocardium. *Circ Res*, 2006, 99, 315–322.
- Yamaguchi J., Kusano K.F., Masuo O., Kawamoto A., Silver M., Murasawa S., Bosch-Marce M., Masuda H., Losordo D.W., Isner J.M., Asahara T., Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation*, 2003, 107, 1322–1328.
- Yoon C.H., Hur J., Park K.W., Kim J.H., Lee C.S., Oh I.Y., Kim T.Y., Cho H.J., Kang H.J., Chae I.H., Yang H.K., Oh B.H., Park Y.B., Kim H.S., 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, 1618–1617.
- Zemani F., Benisvy D., Galy-Fauroux I., Lokajczyk A., Collic-Jouault S., Uzan G., Fischer A.M., Boisson-Vidal C., Low-molecular-weight fucoidan enhances the pro-angiogenic phenotype of endothelial progenitor cells. *Biochem Pharmacol*, 2005, 70, 1167–1175.
- Zemani F., Silvestre J.S., Fauvel-Lafeve F., Bruel A., Vilar J., Bièche I., Laurendeau I., Galy-Fauroux I., Fischer A.M., Boisson-Vidal C., Ex vivo priming of endothelial progenitor cells with SDF-1 before transplantation could increase their pro-angiogenic potential. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28, 644–650.