



UNIVERSITE PARIS DESCARTES

FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

## THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Discipline : Biochimie et Biologie Moléculaire

Ecole Doctorale : Médicament Toxicologie Chimie Environnement

présentée et soutenue publiquement

par Clément d'AUDIGIER

le 2 Octobre 2013

### **Modulation du potentiel angiogène des progéniteurs endothéliaux humains par des biomarqueurs plasmatiques vasculaires**

JURY :

Madame le Docteur Nathalie BARDIN

Rapporteur

Madame le Professeur Sophie SUSEN

Rapporteur

Monsieur le Docteur Jean-Sébastien SILVESTRE

Examineur

Monsieur le Professeur Luc DOUAY

Examineur

Madame le Professeur Pascale GAUSSEM

Directeur de Thèse

Monsieur le Professeur David SMADJA

Directeur de Thèse

## REMERCIEMENTS

Monsieur le Professeur David Smadja

Merci pour ton encadrement et ton soutien, ton dynamisme, tes judicieux conseils, ta sympathie, ton amitié, merci de la confiance que tu me témoignes. Malgré les chemins sinueux, on finit par y arriver... J'espère qu'on pourra continuer à travailler (ou autre !) ensemble.

Madame le Professeur Pascale Gaussem

Merci pour ta gentillesse et tes conseils, merci de m'avoir accompagné depuis mon M2R !

Madame le Docteur Nathalie Bardin

Madame le Professeur Sophie Susen

Merci d'avoir accepté d'être rapporteur de mon manuscrit de thèse.

Monsieur le Docteur Jean-Sébastien Silvestre

Je te remercie de me faire l'honneur de siéger dans ce jury.

Monsieur le Professeur Luc Douay

Je vous remercie de me faire l'honneur de siéger dans ce jury, et de m'avoir accueilli dans votre service à l'hôpital Saint-Antoine.

Madame le Professeur Anne-Marie Fischer

Monsieur le Professeur Joseph Emmerich

Merci de m'avoir accueilli à l'HEGP et à l'unité, merci pour votre gentillesse et vos conseils.

Un grand merci aux collègues de l'HEGP en général et aux compagnons de pièce de culture en particuliers: Sébastien, Solène, Laetitia (heureusement plus bavarde que les cellules !), Benoît, Emmanuelle...

Un grand merci à tous les membres de l'UMR-S 765, et en particulier Isabelle et Anna pour les débuts en M2R, Blandine pour les aventures avec les souris, Françoise, Bérengère...

Un grand merci aux collègues du PARCC pour les collaborations diverses : Coralie, Clément, Kiave, José, Jean-Sé...

Je remercie sincèrement toutes les personnes qui ont participé à nos différents travaux.

Merci également à tous mes collègues de Saint-Antoine, en particulier Céline, François, Christine, Valérie P, Laurence, Marie-Agnès, René-Yves, Héloïse, Valérie E, Annie, qui ont bien assez entendu parler de cette thèse...

Je remercie de tout mon cœur ma famille (ascendante) bien sûr : mes parents, ma sœur Véronique, mes neveux Alexandre et Raphaël, Eric, ma tata et ma mémé, merci d'être toujours présents quand j'en ai besoin, merci de votre soutien sans faille et pour toutes vos attentions.

Je remercie mes amis, pour leur bonne humeur et leur humour, leur présence et leurs encouragements.

Et enfin Anaïs, merci pour ta présence, ton aide, tes encouragements, merci de me supporter dans tous les sens du terme, merci pour ma famille descendante et pour le bonheur que tu m'apportes. Et merci donc à ma petite Julie qui a transformé ma vie...

## RESUME

*Rationnel* : Les capacités pro-angiogènes des progéniteurs endothéliaux circulants sont maintenant bien établies, et leur implication dans les phénomènes de néovascularisation chez l'adulte a stimulé la recherche de thérapeutiques angiogènes basées sur la greffe de ces cellules. Les données actuelles convergent vers la notion de deux types cellulaires au phénotype endothélial, définis entre autres par leur cinétique d'apparition en culture : les progéniteurs précoces (CFU-EC ou CAC) et tardifs (ECFC). Notre équipe a montré que l'injection thérapeutique de cellules mononucléées de moelle osseuse (BM-MNC) permettait la néovascularisation du site ischémié chez des patients atteints d'ischémie critique des membres inférieurs, et que les nouveaux vaisseaux formés avaient le phénotype d'ECFC. Nous avons dans un premier temps mesuré les concentrations de différentes protéines modulant l'angiogenèse, chez des patients atteints de pathologies ischémiques et cardiovasculaires, ou impliquant des anomalies vasculaires associées à la fibrose. Ainsi, le *transforming growth factor -  $\beta$ 1* (TGF- $\beta$ 1) dans la fibrose pulmonaire idiopathique, la thrombospondine-1 (TSP-1) dans l'artériopathie des membres inférieurs, et le *placental growth factor* (PlGF) chez les patients atteints de pathologies cardiovasculaires (patients présentant un syndrome coronarien aigu, patients devant subir une chirurgie de la valve ou un pontage coronarien), se sont distingués comme potentiel biomarqueur plasmatique dans ces pathologies, et ont été étudiés dans la biologie des ECFC humaines.

*Résultats* : Le taux plasmatique de TGF- $\beta$ 1 est augmenté chez les patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) par rapport à la population contrôle ; il a un effet pro-angiogène *in vivo* (vascularisation des implants de Matrigel®) et *in vitro* (prolifération et migration des ECFC) via les récepteurs ALK-1, ALK-5 et TGF- $\beta$ RII. Le taux plasmatique de TSP-1 est augmenté chez les patients artéritiques par rapport à la population contrôle. Par ailleurs les néovaisseaux formés de patients artéritiques ayant été traités par injection locale de BM-MNC expriment la TSP-1. Dans les modèles murins de Matrigel®-plugs et d'ischémie du membre inférieur (IMI), la TSP-1 induit une diminution de la vascularisation des implants ainsi qu'une diminution de la revascularisation du membre ischémié. *In vitro*, la TSP-1 augmente l'adhésion via un mécanisme N-Terminal dépendant, et diminue le potentiel angiogène (prolifération et migration) des ECFC via sa liaison au récepteur CD47, ce qui active la voie de signalisation SDF-1/CXCR4. Le taux plasmatique de PlGF est augmenté chez les patients coronariens par rapport à la population contrôle et aux patients angoreux ; il est également augmenté chez les patients ayant subi une chirurgie cardiaque. Les PlGF-1 et -2 potentialisent la tubulogenèse des ECFC *in vitro* via la phosphorylation du récepteur VEGFR1. Cet effet est aboli lorsque le VEGFR1 est inhibé par ARN interférence ou par le composé chimique « 4321 ». De plus ce composé « 4321 » inhibe la vascularisation des implants de Matrigel®, ainsi que la revascularisation du membre ischémié dans le modèle d'IMI.

*Conclusions* : Le TGF- $\beta$ 1 joue un rôle dans le remodelage vasculaire de la FPI via les ECFC ; la TSP-1 est un potentiel biomarqueur de l'angiogenèse induite par les ECFC dans l'artériopathie des membres inférieurs ; l'inhibition de la voie PlGF/VEGFR1 module la tubulogenèse induite par les ECFC, cellules impliquées dans la formation de nouveaux vaisseaux. Nous avons ainsi mis en évidence 3 protéines modulant l'angiogenèse dans 3 contextes pathologiques différents, caractérisés par un remodelage vasculaire et où les ECFC sont impliquées dans leurs mécanismes physiopathologiques. Ces 3 protéines se présentent

donc comme de potentiels biomarqueurs plasmatiques, modulant les propriétés angiogènes des ECFC et pouvant donc influencer leur efficacité en tant que produit de thérapie cellulaire. Ces biomarqueurs plasmatiques jouent un rôle probable dans l'équilibre homéostatique au décours des pathologies concernées.

**Mots-clés :** progéniteurs endothéliaux circulants, biomarqueurs plasmatiques vasculaires, potentiel angiogène, fibrose pulmonaire idiopathique, artériopathie des membres inférieurs, syndromes coronariens aigus, thérapie cellulaire.

# Angiogenic potential modulation of human endothelial progenitor cells by vascular plasmatic biomarkers

## ABSTRACT

*Rationale:* The pro-angiogenic capacities of endothelial progenitor cells are now well established, and their involvement in neovascularization events in adults has stimulated the research in the field of angiogenic therapy based on transplant of these cells. Current data converge towards the notion of two cell types with endothelial phenotype, defined at least by their kinetics of appearance in culture: early endothelial progenitor cells (CFU-EC or CAC) and late (ECFC). Our team has shown that the therapeutic injection of bone marrow mononuclear cells (BM-MNC) led to neovascularization of the ischemic site in patients with critical limb ischemia, and that the new vessels formed bore the phenotype of ECFC. We initially measured the concentrations of different proteins modulating angiogenesis in patients with ischemic and cardiovascular diseases, or involving vascular abnormalities associated with fibrosis. Thus, the transforming growth factor -  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) in idiopathic pulmonary fibrosis, the thrombospondin-1 (TSP-1) in peripheral artery disease, and the placental growth factor (PIGF) in patients with cardiovascular diseases [acute coronary syndrome (ACS), patients undergoing valve surgery or coronary artery bypass surgery], emerged as potential plasmatic biomarkers in these pathological settings, and have been studied in the biology of human ECFC.

*Results:* TGF- $\beta$ 1 plasma level is increased in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) compared to the control population; it exerts a pro-angiogenic effect *in vivo* (vascularization of Matrigel<sup>®</sup>-plugs) and *in vitro* (proliferation and migration of ECFC) via ALK-1, ALK-5 and TGF- $\beta$ RII receptors. TSP-1 plasma level is increased in patients with peripheral artery disease (PAD) compared to the control population. In addition, the new vessels formed in PAD patients treated by local injection of BM-MNC express TSP-1. In murine models of Matrigel<sup>®</sup>-plugs and hindlimb ischemia, TSP-1 induces a decrease in plugs vascularization and impaired revascularization of ischemic limb. *In vitro*, TSP-1 increases ECFC adhesion via an N-terminal dependent mechanism and reduces their angiogenic potential (proliferation and migration) via its binding to CD47 receptor, which activates the SDF-1/CXCR4 signaling pathway. PIGF plasma level is increased in ACS patients compared with the control population and stable angina patients and is also increased in patients undergoing cardiac surgery. PIGF-1 and -2 potentiate ECFC tubulogenesis *in vitro* via phosphorylation of the VEGFR1 receptor. This effect was abolished when the ECFC VEGFR1 is inhibited by RNA interference or by the chemical compound "4321". In addition this compound "4321" inhibits the vascularization of Matrigel<sup>®</sup>-plugs, and revascularization of the ischemic limb in the hindlimb ischemia model.

*Conclusions:* TGF- $\beta$ 1 is involved in the IPF vascular remodeling through ECFC; TSP-1 is a potential biomarker of angiogenesis induced by ECFC in PAD; the inhibition of the PIGF/VEGFR1 pathway modulates ECFC tubulogenesis, cells involved in the formation of new vessels. We thus identified three proteins that modulate angiogenesis in three different pathological settings characterized by a vascular remodeling and where ECFC are involved in their pathophysiology. These three proteins therefore state as potential plasmatic

biomarkers, modulating ECFC angiogenic properties and are able to influence their efficacy as a cell therapy product. These plasmatic biomarkers likely play a role in the homeostasis of those pathologies progress.

**Keywords:** endothelial progenitor cells, vascular plasmatic biomarkers, angiogenic potential, idiopathic pulmonary fibrosis, peripheral artery disease, acute coronary syndromes, cell therapy.

## TABLE DES MATIERES

<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>10</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>11</b>
<b>REVUE DE LA LITTERATURE .....</b>	<b>13</b>
<b>RATIONNEL .....</b>	<b>15</b>
<b>1. PROGENITEURS ENDOTHELIAUX HUMAINS .....</b>	<b>21</b>
<b>1.1. ORIGINE .....</b>	<b>21</b>
<b>1.2. DETECTION ET QUANTIFICATION.....</b>	<b>25</b>
1.2.1. Cytométrie en flux.....	25
1.2.2. Culture cellulaire .....	26
1.2.2.1. PEC précoces .....	26
1.2.2.2. PEC tardifs ou ECFC .....	27
<b>1.3. PROPRIETES IN VITRO ET IN VIVO .....</b>	<b>29</b>
1.3.1. Capacités angiogènes .....	29
1.3.2. Facteurs modulant leur nombre ou leurs propriétés angiogènes .....	30
1.3.2.1. Facteurs de risque cardiovasculaire modulant le nombre de PEC.....	30
1.3.2.1.1. Diabète .....	31
1.3.2.1.2. Dyslipoprotéinémie.....	32
1.3.2.1.3. Tabagisme .....	32
1.3.2.1.4. Absence d'exercice physique .....	33
1.3.2.1.5. Autres facteurs de risque .....	34
1.3.2.2. Facteurs modulant leurs propriétés angiogènes .....	36
1.3.2.2.1. Facteurs pro-angiogènes.....	36
<i>VEGF et vasculogenèse post-natale .....</i>	<i>36</i>
<i>VEGFR et vasculogenèse post-natale .....</i>	<i>37</i>
<i>Angiopoïétines et vasculogenèse post-natale .....</i>	<i>39</i>
<i>SDF-1 et vasculogenèse post-natale.....</i>	<i>40</i>
<i>FGF et vasculogenèse post-natale.....</i>	<i>41</i>
<i>Ephrines et vasculogenèse post-natale .....</i>	<i>41</i>
<i>TGF-<math>\beta</math>1 et vasculogenèse post-natale .....</i>	<i>42</i>
<i>PlGF et vasculogenèse post-natale.....</i>	<i>43</i>
1.3.2.2.2. Facteurs anti-angiogènes .....	46
<i>sVEGFR1.....</i>	<i>46</i>
<i>sNRP-1 .....</i>	<i>46</i>
<i>PEDF et vasculogenèse post-natale.....</i>	<i>46</i>
<i>TSP-1 et vasculogenèse post-natale .....</i>	<i>47</i>
1.3.3. Rôles des progéniteurs endothéliaux humains en pathologies humaines .....	49
1.3.3.1. Pathologies pulmonaires.....	49
1.3.3.1.1. Développement du réseau vasculaire pulmonaire pendant l'embryogenèse.....	50
1.3.3.1.2. Pathologies interstitielles pulmonaires.....	51
1.3.3.1.3. Remodelage vasculaire dans la fibrose pulmonaire idiopathique .....	52
<i>Physiopathologie de la FPI : interactions épithélio-mésenchymateuses consécutives à une atteinte pulmonaire .....</i>	<i>53</i>
<i>Physiopathologie de la FPI : transition épithélio-mésenchymateuse (Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT) .....</i>	<i>53</i>
<i>Régulation de l'EMT : détection d'intégrine dans la signalisation du TGF-<math>\beta</math>1 et l'EMT .....</i>	<i>54</i>

<i>Régulation de l'EMT : autres voies de signalisation impliquées l'EMT</i> .....	57
<i>Régulation de l'EMT : inflammation et EMT</i> .....	58
<i>Régulation de l'EMT : hypoxie et EMT</i> .....	58
<i>Physiopathologie de la FPI : TGF-<math>\beta</math>1 &amp; Angiostatine</i> .....	59
1.3.3.1.4. Hypertension pulmonaire .....	59
1.3.3.2. Pathologies cardiovasculaires .....	62
1.3.3.2.1. Artériopathie périphérique .....	62
1.3.3.2.2. Insuffisance cardiaque et syndromes coronariens aigus .....	63
<b>1.4. CONCLUSION : LA DEFINITION DES PEC RESTE ENCORE INCOMPLETE</b> .....	<b>67</b>
<b>2. BIOMARQUEURS PLASMATIQUES EN PATHOLOGIES VASCULAIRES</b> .....	<b>69</b>
<b>2.1. DEFINITIONS</b> .....	<b>69</b>
<b>2.2. CARACTERISTIQUES DU BIOMARQUEUR IDEAL</b> .....	<b>70</b>
<b>2.3. BIOMARQUEURS DANS LA FIBROSE PULMONAIRE IDIOPATHIQUE</b> .....	<b>72</b>
2.3.1. Biomarqueurs diagnostiques.....	72
2.3.2. Biomarqueurs pronostiques.....	74
2.3.3. Biomarqueurs de suivi.....	77
2.3.4. Autres biomarqueurs potentiels dans la FPI .....	79
2.3.5. Focus sur le <i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math>1</i> .....	82
<i>Les protéines Smads sont structurellement les effecteurs de la signalisation TGF-<math>\beta</math></i> .....	83
<i>Régulation des taux de Smads</i> .....	83
<i>Régulation de l'activation de Smad</i> .....	84
<i>Interactions hétéromériques des Smads activées</i> .....	84
<i>Translocation nucléaire des Smads</i> .....	85
<i>Régulation de l'activité des Smads par les voies des kinases</i> .....	86
<i>Activation transcriptionnelle versus répression transcriptionnelle induite par le TGF-<math>\beta</math></i> .....	87
<i>Régulation via les protéines associées aux récepteurs de type I &amp; II</i> .....	88
<i>Signalisation indépendante de Smad via les voies des MAPK</i> .....	89
<i>Autres voies de signalisation induite par le TGF-<math>\beta</math></i> .....	90
<i>Place du TGF-<math>\beta</math>1 en tant que biomarqueur dans la FPI</i> .....	91
<b>2.4. BIOMARQUEURS DANS L'ARTERIOPATHIE DES MEMBRES INFERIEURS</b> .....	<b>92</b>
2.4.1. Principaux candidats dans la littérature actuelle .....	92
2.4.2. Panel de biomarqueurs dans l'AMI .....	93
2.4.3. Focus sur la Thrombospondine-1 .....	93
<i>Rôle central de la signalisation par le NO dans l'angiogenèse, le tonus vasculaire et l'hémostase</i> .....	94
<i>Les facteurs angiogènes stimulent la synthèse de NO</i> .....	95
<i>La TSP-1 bloque l'angiogenèse médiée par le NO</i> .....	95
<i>Les récepteurs de la TSP-1 impliqués dans l'inhibition de la signalisation NO</i> .....	96
<i>La TSP-1 régule le flux sanguin.</i> .....	97
<b>2.5. BIOMARQUEURS DANS LES PATHOLOGIES CARDIOVASCULAIRES</b> .....	<b>98</b>
2.5.1. Biomarqueurs dans l'insuffisance cardiaque .....	98
2.5.2. Biomarqueurs dans les syndromes coronariens aigus .....	101
2.5.3. Focus sur le <i>Placental Growth Factor (PIGF)</i> .....	102
<b>2.6. CONCLUSION : INTERETS CLINICO-BIOLOGIQUES DES BIOMARQUEURS PLASMATIQUES EN PATHOLOGIES HUMAINES</b> .....	<b>107</b>
<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL</b> .....	<b>109</b>
<b>HYPOTHESE DE TRAVAIL</b> .....	<b>111</b>
<b>BUTS DE L'ETUDE</b> .....	<b>111</b>
<b>CRITERES DE CHOIX DES MODELES PATHOLOGIQUES D'ETUDE</b> .....	<b>112</b>
<b>CRITERES DE CHOIX POUR LE « SCREENING » DES BIOMARQUEURS PLASMATIQUES</b> .....	<b>112</b>

<i>METHODOLOGIE GENERALE POUR LES EXPERIMENTATIONS</i> .....	113
<b><u>TRAVAUX DE RECHERCHE</u></b> .....	<b>115</b>
LISTE DES PUBLICATIONS:.....	117
PUBLICATION 1 : LA CYTOKINE PROFIBROTIQUE « TRANSFORMING GROWTH FACTOR-B1 » AUGMENTE LES PROPRIETES ANGIOGENES DES PROGENITEURS ENDOTHELIAUX .....	119
RESUME .....	119
DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....	120
ARTICLE PUBLIE : .....	123
PUBLICATION 2 : LA THROMBOSPONDINE-1 EST UN BIOMARQUEUR PLASMATIQUE DANS L'ARTERIOPATHIE DES MEMBRES INFERIEURS QUI MODULE LES PROPRIETES ANGIOGENES DES PROGENITEURS ENDOTHELIAUX .....	135
RESUME .....	135
DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....	137
ARTICLE PUBLIE : .....	141
PUBLICATION 3 : LA STIMULATION/INHIBITION CIBLEE DU VEGFR1 DES PROGENITEURS ENDOTHELIAUX MODULE LEUR POTENTIEL DE DIFFERENCIATION .....	169
RESUME .....	169
DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....	170
ARTICLE SOUMIS : .....	173
<b><u>SYNTHESE DES RESULTATS, DISCUSSION ET PERSPECTIVES GENERALES</u></b> .....	<b>211</b>
<b><u>ANNEXES</u></b> .....	<b>217</b>
<b><u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u></b> .....	<b>293</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Formation d'un réseau vasculaire .....	16
Figure 2 : Deux types de progéniteurs endothéliaux circulants : morphologie, appellations, phénotype .....	23
Figure 3 : Principales méthodes d'obtention des PEC en culture et caractéristiques phénotypiques .....	28
Figure 4 : Facteurs ayant la capacité de moduler les propriétés des PEC .....	66
Figure 5 : Représentation schématique illustrant les notions de valeur « cut-off », de faux-négatifs et de faux-positifs .....	71
Figure 6 : Signalisation TGF- $\beta$ via ses effecteurs principaux, les protéines Smads, de la membrane plasmique au noyau .....	86
Figure 7 : TSP-1 et ses récepteurs CD47 et CD36 .....	97
Figure 8 : Signalisation des récepteurs VEGFR et de leurs co-récepteurs NRP, après activation par leurs différents ligands .....	105
Figure 9 : Représentation schématique récapitulant les effets des potentiels biomarqueurs plasmatiques sur les propriétés angiogènes des ECFC, dans le cadre de la fibrose pulmonaire idiopathique, artériopathie des membres inférieurs et les syndromes coronariens aigus ...	216

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principales études cliniques rapportant une altération du nombre de PEC et / ou de leurs propriétés en fonction des facteurs de risque cardiovasculaire .....	35
Tableau 2 : Principales molécules pro-angiogènes .....	45
Tableau 3 : Principales molécules anti-angiogènes .....	48
Tableau 4 : Classification OMS des hypertensions pulmonaires (Dana Point, 2008) .....	61
Tableau 5 : Liste des études cliniques pertinentes (juillet 2013) à propos du rôle / de la mobilisation des ECFC dans la FPI, l'AMI, les SCA, la maladie coronarienne et en cas de circulation extracorporelle .....	68
Tableau 6 : Correspondance entre le résultat d'un test diagnostique (i.e. mesure de la concentration d'un biomarqueur) et le nombre de cas diagnostiqués ou non, ou le nombre d'individus sains correctement discriminés ou non .....	71
Tableau 7 : Principales protéines / cellules candidates actuellement décrites dans la littérature en tant que biomarqueur potentiel dans la FPI .....	78
Tableau 8 : Potentiels biomarqueurs associés à l'artériopathie des membres inférieurs .....	92
Tableau 9 : Phénotypes pour une mutation « perte de fonction » ou « gain de fonction » du gène PIGF selon le tissu cible .....	106



# REVUE DE LA LITTERATURE



## RATIONNEL

La mise en place physiologique du réseau vasculaire peut se réaliser grâce à un ensemble de mécanismes finement régulés. Il existe différentes tailles de vaisseaux auxquelles correspondent des structures particulières. Les petits vaisseaux sont composés uniquement des cellules endothéliales (CE), alors que les vaisseaux plus larges sont renforcés d'une couche de cellules murales (péricytes pour les vaisseaux de taille moyenne, et cellules musculaires lisses [CML] pour les vaisseaux les plus larges). La formation des vaisseaux peut se réaliser selon différents modes séquentiels. La vasculogénèse fait référence au processus par lequel se forment les vaisseaux sanguins de l'embryon au travers d'une différenciation in situ de progéniteurs indifférenciés ou de progéniteurs endothéliaux en CE matures, qui s'assemblent pour donner un réseau vasculaire primitif. L'angiogénèse est la croissance d'un vaisseau à partir d'un arbre vasculaire préexistant, et l'artériogénèse fait référence à la stabilisation du vaisseau par les cellules murales. L'intussusception quant à elle, représente l'insertion de colonnes de tissus interstitiels dans la lumière d'un vaisseau préexistant, puis la division de cette lumière vasculaire<sup>1-3</sup> (Figure 1).

L'équilibre de ce système peut être déstabilisé par différents facteurs, conduisant d'un côté à une vascularisation excessive, notamment dans le contexte des pathologies cancéreuses, et de l'autre côté, à une vascularisation insuffisante de différents tissus ou organes.

Depuis la mise en évidence des cellules progénitrices endothéliales en 1997<sup>4</sup>, leur rôle dans la formation de nouveaux vaisseaux chez l'adulte (vasculogénèse post-natale) est maintenant établi. Plus récemment, ces progéniteurs endothéliaux circulants (PEC) ont été démontrés comme étant associés aux anomalies vasculaires dans des pathologies impliquant un remodelage vasculaire aberrant ou dysfonctionnel<sup>5</sup>.

Cette thèse a pour objet l'étude de pathologies ischémiques ou impliquant un remodelage vasculaire aberrant ou inadéquat. Les travaux présentés dans cette thèse ciblent des pathologies impliquant potentiellement les PEC dans ces dysfonctions vasculaires ; la méthodologie dans un premier temps a consisté à mettre en évidence un potentiel biomarqueur plasmatique vasculaire de la pathologie concernée, puis à étudier les effets biologiques de ces biomarqueurs sur les PEC. L'approche par l'étude de l'influence d'un biomarqueur plasmatique nous permet d'envisager en perspectives si la pathologie concernée constitue un contexte favorable ou non pour l'efficacité d'un éventuel produit de thérapie cellulaire, ou si le(s) biomarqueur(s) caractérisant la pathologie d'étude permet(tent) la mobilisation de PEC ou autres cellules vasculogéniques.

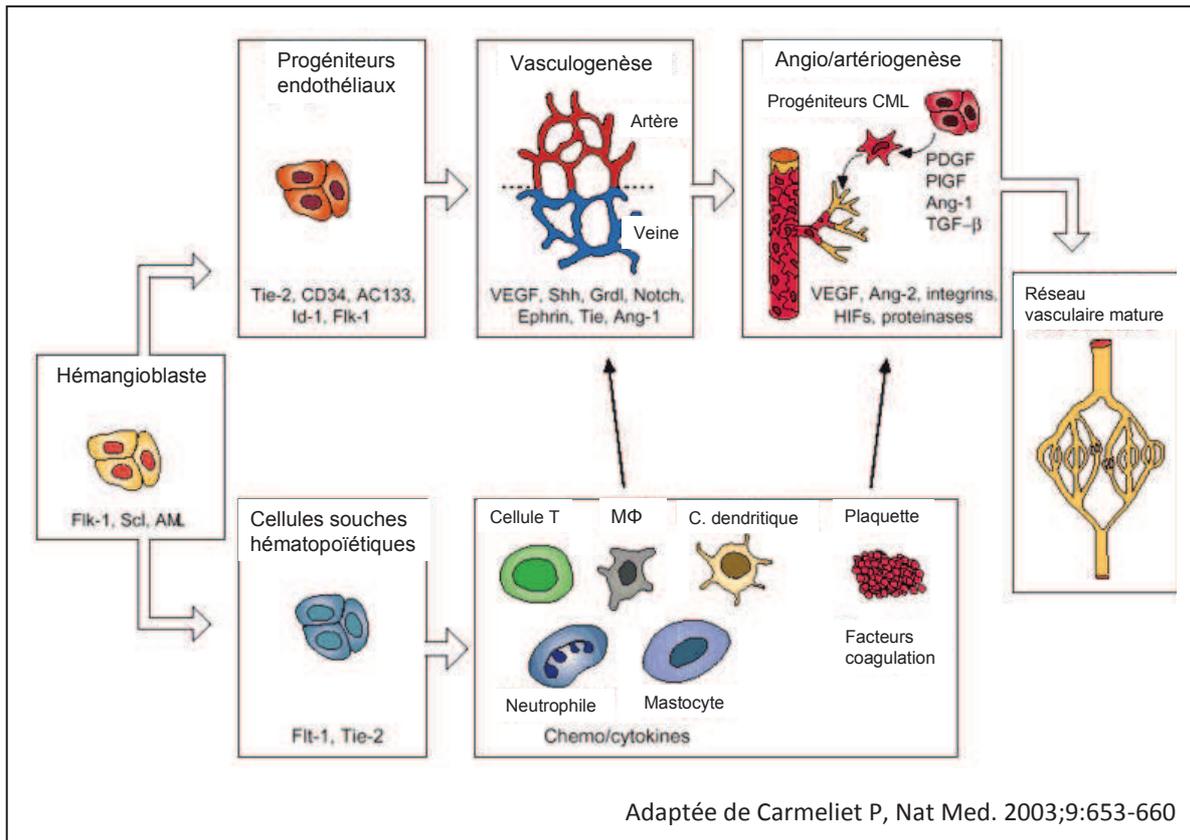


Figure 1 : Formation d'un réseau vasculaire. Les progéniteurs endothéliaux se différencient en cellules endothéliales artérielles et veineuses, qui s'assemblent en un plexus capillaire primitif. Les vaisseaux bourgeonnent ensuite et deviennent stabilisés par les CML, issues de leurs progéniteurs. Les cellules souches hématopoïétiques contribuent à l'angiogenèse directement et indirectement, en se différenciant en leucocytes ou en plaquettes. La liste des molécules indiquées est non exhaustive (MΦ = macrophage, C. dendritique = cellule dendritique).

Il existe différentes pathologies impliquant un remodelage vasculaire. Les pathologies fibrogéniques (e.g. myélofibrose primitive, fibrose pulmonaire) en sont un parfait exemple. La fibrose consiste en la formation excessive d'un tissu fibreux au cours du processus de réparation tissulaire ou lors d'un mécanisme réactionnel. Elle est due à l'accumulation de composants de la matrice extracellulaire (MEC). Une réaction inflammatoire aiguë est caractérisée par une résolution rapide des modifications vasculaires, de l'œdème et de l'inflammation. La fibrose quant à elle, résulte d'une inflammation chronique définie par une réponse immunitaire persistante pendant plusieurs mois et au cours de laquelle l'inflammation, le remodelage tissulaire et le processus de réparation ont lieu simultanément. Cette fibrose résultant donc d'une inflammation chronique peut être induite par des infections persistantes, des réactions auto-immunes, des lésions tissulaires, des réactions allergiques, des agressions chimiques ou des radiations.

Le remodelage vasculaire qui accompagne ces maladies fibrogéniques se produit le plus souvent avant le développement de la fibrose. Il est caractérisé par une néovascularisation impliquant des facteurs mitogéniques pour les CE comme le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), le bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*), l'angiopoïétine-1 et le TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ) notamment. Le VEGF peut également induire de la fibrose via ses propriétés angiogènes et en action concertée avec le TGF- $\beta$ 1, conduisant à une production augmentée de MEC par les fibroblastes <sup>6</sup>.

La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) sera le modèle étudié dans cette thèse, illustrant le rôle des PEC dans les anomalies vasculaires associées à la fibrose. La FPI est une forme spécifique de pneumopathie interstitielle avec fibrose progressive et chronique, de cause indéterminée. Elle est le plus souvent retrouvée chez les patients de plus de 60 ans, légèrement plus fréquente chez les hommes que chez les femmes. L'incidence de la FPI est comprise entre 6,8 et 16,3 cas pour 100 000 habitants par an <sup>7</sup>. La FPI est définie histologiquement par une fibrose en tâche et une structure en nid d'abeille du poumon. L'imagerie (radio, scanner, tomographie haute résolution) permet le plus souvent d'observer les modifications morphologiques typiques de la FPI. Si les résultats d'imagerie ne sont pas concluants, une analyse histologique de biopsies des poumons sera nécessaire. Le pronostic est mauvais, avec une survie médiane de 3 à 5 ans après le diagnostic et sans transplantation, et un taux de survie à 5 ans de 20 à 40%. Jusqu'à récemment, les traitements médicamenteux disponibles (glucocorticoïdes, immunosuppresseurs) n'avaient qu'un effet nul ou temporaire sur l'évolution de la maladie, la transplantation pulmonaire étant le seul moyen d'arrêter son évolution. Depuis 2011, la pirfenidone (antifibrogénique et anti-inflammatoire) a obtenu l'AMM pour le traitement de la FPI. La pirfenidone serait capable de diminuer la prolifération des fibroblastes, d'inhiber la synthèse de collagène induite par le TGF- $\beta$ 1, de réduire la synthèse de cytokines fibrogéniques telles que le TGF- $\beta$ 1, ou encore de molécules pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  <sup>8-10</sup>. L'évaluation de la pirfenidone dans différents modèles animaux de fibroses a établi une diminution de la fibrose associée à la réduction des taux du TGF- $\beta$ 1 <sup>11</sup>. Chez l'Homme, la pirfenidone améliore la survie sans progression et la fonction pulmonaire des patients atteints de FPI <sup>12, 13</sup>. De façon intéressante, le BIBF 1120 ou nintedanib parmi d'autres molécules actuellement testées, est en étude de phase II dans la FPI. C'est un inhibiteur de tyrosine kinase ciblant les récepteurs de VEGF, du FGF et du PDGF, inhibant la formation de nouveaux vaisseaux, qui a montré des résultats encourageants dans le traitement de la FPI. Il suggère donc que le remodelage vasculaire observé au cours de la FPI joue un rôle clé dans la pathogénie de la maladie <sup>14</sup>.

Selon des données statistiques récentes de l'Organisation Mondiale de la Santé (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/fr/index.html>), les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde: chaque année, plus de personnes décèdent en raison de maladies cardiovasculaires que de toute autre cause. On estime à 17,3 millions le nombre de décès imputables aux maladies cardio-vasculaires, soit environ 30% de la mortalité mondiale totale. Parmi ces décès, on estime que 7,3 millions sont dus à une cardiopathie coronarienne et 6,2 millions à un accident vasculaire cérébral (AVC) (statistiques OMS 2008). Plus de 80% des décès interviennent dans des pays à revenu moyen ou faible et touchent presque également hommes et femmes. L'OMS prévoit que d'ici 2030, près de 23,6 millions de personnes mourront d'une maladie cardio-vasculaire (cardiopathie ou AVC principalement). D'après les projections, ces maladies devraient rester les premières causes de décès.

Les maladies cardio-vasculaires constituent un ensemble de troubles affectant le cœur et les vaisseaux sanguins, qui comprend :

- les cardiopathies coronariennes
- les maladies cérébro-vasculaires
- les artériopathies périphériques
- les cardiopathies rhumatismales, affectant le muscle et les valves cardiaques et résultant d'un rhumatisme articulaire aigu (causé par un streptocoque)
- les malformations cardiaques congénitales
- les thromboses veineuses profondes et les embolies pulmonaires

Les infarctus et les accidents vasculaires cérébraux sont généralement des événements aigus et sont principalement dus à l'obstruction d'une artère empêchant le sang de parvenir au cœur ou au cerveau. Leur cause la plus courante est la constitution d'une plaque d'athérome sur les parois internes des vaisseaux sanguins alimentant ces organes. Les accidents vasculaires cérébraux peuvent aussi résulter de la lésion d'un vaisseau sanguin cérébral ou de caillots.

Les principaux facteurs de risques des cardiopathies et des AVC, sont une mauvaise alimentation, un manque d'activité physique, le tabagisme et l'usage nocif de l'alcool. Ces facteurs de risque comportementaux sont responsables d'environ 80% des maladies coronariennes et cérébraux vasculaires.

Les effets d'une mauvaise alimentation ou de l'inactivité physique peuvent se manifester par de l'hypertension, une hyperglycémie ou hyperlipidémie, un excès de poids ou une obésité, ces effets étant appelés « facteurs de risque intermédiaires » ou facteurs de risques métaboliques.

Il existe aussi un certain nombre de déterminants sous-jacents des maladies chroniques, ce sont en quelque sorte les « causes des causes ». Ils reflètent l'action des principaux moteurs de l'évolution sociale, économique et culturelle: globalisation, urbanisation et vieillissement des populations. Parmi eux figurent aussi la pauvreté et le stress et des facteurs héréditaires.

Parmi les maladies cardiovasculaires, les cardiopathies ischémiques constituent la première cause de mortalité au niveau mondial (7.25 millions de décès = 12.8% des personnes décédées en 2008), devant les AVC et maladies cérébro-vasculaires (6.15 millions de décès = 10.8% des personnes décédées en 2008), l'infection par le VIH / SIDA (1.78 millions de décès

= 3.1% des personnes décédées en 2008) ou les cancers de la trachée, des bronches ou des poumons (1.39 millions de décès = 2.4% des personnes décédées en 2008).

Une autre pathologie ischémique comme l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI) est retrouvée chez plus de 15% des individus après 55 ans <sup>15</sup>, et touche 20% des individus après 75 ans <sup>16, 17</sup>. Concernant la population française, les résultats d'une enquête IPSOS Santé sur la prévalence et la prise en charge de l'AOMI chez les plus de 45 ans ont été publié en 2007 (<http://www.portailvasculaire.fr/espace-sfmv>, <http://www.theheart.org>). Cette étude quantitative déclarative portait sur 7639 personnes représentatives de la population française. Les douleurs de type AOMI sont présentes chez 4,6 % des sujets, soit un nombre estimé de « claudicants » de 1 124 000. La prévalence s'élève à 6,1 % entre 65 et 69 ans. En France, 800 000 patients sont en « affection longue durée » en raison d'une artériopathie supérieure ou égale au stade II (classification de Leriche et Fontaine) et traités. Ces personnes ont dans 80 % des cas plus de 50 ans et l'on dénombre 4 hommes pour 1 femme. Mais le nombre de personnes avec une artérite asymptomatique serait probablement de 2 à 2,5 millions, soit au total, 10 à 12 % des individus de plus de 65 ans.

L'AOMI, les syndromes coronariens aigus, l'angor stable, ainsi que les patients subissant une chirurgie cardiaque seront les affections utilisées comme modèles d'étude de pathologies cardiovasculaires impliquant un remodelage vasculaire et donc potentiellement une vasculogénèse post-natale.

La fibrose pulmonaire idiopathique, l'artériopathie des membres inférieurs et les syndromes coronariens aigus ont donc comme élément commun un remodelage vasculaire. Ce remodelage peut participer à la pathogenèse de la maladie (angiogénèse augmentée mais aboutissant à un remodelage dysfonctionnel) ou être déclenché dans le cadre d'un phénomène de compensation par rapport à une situation d'ischémie. L'artériopathie des membres inférieurs illustre une situation d'ischémie chronique, les syndromes coronariens aigus quant à eux illustrent une situation d'ischémie aiguë. Ces trois pathologies vasculaires ont été étudiées selon une méthodologie commune qui est exposée dans la partie « objectifs du travail » de cette thèse, et ont permis d'apporter des nouvelles données concernant la biologie des progéniteurs endothéliaux.



## Progéniteurs endothéliaux humains

### 1.1. Origine

Jusqu'en 1997, la néovascularisation post-natale était considérée comme résultant uniquement de la prolifération, de la migration, et du remodelage de CE complètement différenciées présentes dans la circulation vasculaire<sup>18, 19</sup>, cette conception faisant en fait référence à l'angiogenèse. La mise en évidence par Asahara en 1997<sup>4</sup> des progéniteurs endothéliaux circulants (PEC), d'origine médullaire, dans le sang périphérique de l'adulte, a stimulé la recherche de thérapeutiques angiogènes basées sur la greffe de ces cellules. Il décrit un système de culture permettant d'obtenir des cellules adhérentes à partir de cellules CD34<sup>+</sup> ou VEGFR2/KDR<sup>+</sup> isolées de sang périphérique humain normal. La majorité de ces cellules adhérentes obtenues dans des conditions favorisant la prolifération et la différenciation endothéliale, possède des caractéristiques de CE. Elles expriment, en effet, les marqueurs CD34, VEGFR2/KDR, Tie-2, CD31, VWF, la E-sélectine, la lectine UEA-1 (Ulex europaeus agglutinin-1), l'« *endothelial Nitric Oxide Synthetase* » constitutive (eNOS = NOS3), et incorporent les LDL acétylés marqués au 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbo-cyanine (Dil-ac-LDL ou Dil-LDL).

L'équipe de Hammond<sup>20</sup> confirme la présence de PEC CD34<sup>+</sup> dans du sang périphérique mobilisé après administration de G-CSF. D'autres auteurs ont montré que le marqueur CD133, utilisé pour identifier et isoler des cellules hématopoïétiques immatures, est également exprimé sur les cellules vasculogéniques circulantes. Ainsi, la population de cellules CD133<sup>+</sup> est enrichie en cellules vasculogéniques<sup>21, 22</sup>. Cet antigène disparaît rapidement de la surface des cellules en culture, ce qui confirme que CD133 est un marqueur des progéniteurs endothéliaux immatures<sup>23</sup>.

Les progéniteurs endothéliaux ont été isolés à partir de cellules mononucléées de sang périphérique en utilisant des marqueurs communs aux deux types cellulaires (hématopoïétique et endothélial) : VEGFR2/KDR, CD34, CD133 et CD146<sup>4, 21, 24, 25</sup>. Ils sont capables de se différencier en CE aussi bien *in vitro* que *in vivo*. Les PEC ont été ensuite mis en évidence dans le sang placentaire humain<sup>23, 26, 27</sup>.

Les PEC ont été utilisés dans de nombreux contextes expérimentaux afin de stimuler l'angiogenèse et la réparation vasculaire (endothélialisation / ré-endothélialisation). Ils sont capables d'induire une néovascularisation, encore appelée « vasculogenèse post-natale », ce concept émergeant donc suite aux travaux d'Asahara en 1997, et introduisant la notion que le rôle des progéniteurs endothéliaux n'est pas limité à la vie embryonnaire. Les PEC proviennent principalement de la moelle osseuse<sup>28</sup> et ont la capacité de se différencier en cellules matures, ce qui démontre l'existence d'un mécanisme complémentaire de l'angiogenèse pour assurer la réparation endothéliale ou la vascularisation d'un tissu ischémique ou lésé<sup>4, 20, 29</sup>. La mobilisation de ces cellules à partir de la moelle osseuse constitue une réponse naturelle à l'ischémie tissulaire, avec une migration des PEC sur le site de l'ischémie puis leur intégration dans les nouveaux vaisseaux. Plusieurs études ont montré l'incorporation des cellules dérivées de la moelle osseuse dans les vaisseaux dans différentes situations : au niveau des sites tumoraux<sup>30</sup>, lors de blessures<sup>29, 31</sup>, dans les sites de dénudation endothéliale<sup>32</sup>, après des infarctus du myocarde expérimentaux chez la souris<sup>33</sup>. Dans le cadre de l'infarctus du myocarde notamment, ces données à propos de la mobilisation des PEC ont été confirmées chez l'Homme<sup>34</sup>. Assmus *et al* ont ensuite montré

la faisabilité et la sécurité de l'injection de PEC autologues avec un potentiel effet bénéfique sur le remodelage post-infarctus<sup>35</sup>. Chez les individus sains, le taux de PEC pourrait être un biomarqueur du risque cardiovasculaire<sup>36</sup>.

Depuis 1997, le débat est né puis s'est amplifié quant à l'identité réelle des PEC, leur provenance, et leur fonction<sup>37-39</sup>. Sept à dix ans plus tard, l'équipe de Mervin Yoder a redéfini les PEC en tenant compte de leur développement et leur cinétique d'adhésion ainsi que de leur contribution directe à la croissance des vaisseaux par incorporation dans les structures vasculaires nouvellement formées<sup>37, 38</sup>. Selon cette définition, deux types de PEC sont distingués: la première population à se développer en culture et initialement non adhérente, qui est liée clonalement aux cellules hématopoïétiques et qui ne s'incorpore pas dans les vaisseaux (population initialement décrite par Asahara en 1997), et la population qui se développe plus tardivement et qui est immédiatement adhérente, qui ne présente pas de marqueurs hématopoïétiques et s'incorpore dans les vaisseaux<sup>38</sup>. Ces dernières cellules sont aussi appelées « *Blood Outgrowth Endothelial Cells* » (BOEC) ou encore « *Endothelial Colony Forming Cells* » (ECFC) et sont isolées à partir du sang périphérique et / ou de cordon ombilical<sup>28, 40</sup>. Elles ont été testées pour restaurer le flux sanguin dans des modèles de maladies vasculaires périphériques<sup>41, 42</sup>, pour la prévascularisation de la peau « décellularisée » ou pour des constructions de tissu osseux<sup>43, 44</sup>, et également comme véhicule pour la thérapie génique<sup>45, 46</sup>. Bien que la capacité à s'infiltrer dans les vaisseaux est une caractéristique reconnue des ECFC, leur effet trophique sur la néovascularisation n'est pas bien documentée (et même remise en question)<sup>39</sup>, ni d'ailleurs leurs interactions paracrines avec les cellules non endothéliales. En dehors des PEC, d'autres sources de cellules (souches) ont été considérées comme pouvant vasculariser les lésions tissulaires, et beaucoup d'études ont été réalisées dans le domaine des cellules souches mésenchymateuses (« *Mesenchymal Stem Cells* » MSC)<sup>47, 48</sup>.

Les données actuelles décrivent donc deux types cellulaires au phénotype endothélial, définis par leur cinétique d'apparition en culture. Les PEC précoces (également appelés CFU-Hill<sup>36</sup>) sont des cellules d'origine hématopoïétique et plus précisément monocyttaire qui apparaissent en 4 à 7 jours de culture. Elles expriment les marqueurs CD45 et CD14, ont un faible pouvoir prolifératif mais la capacité de sécréter des molécules pro-angiogènes (VEGF, SDF-1, IL-8...). Ces cellules peuvent être quantifiées comme décrit par Hill<sup>36</sup>. A l'inverse, les PEC tardifs, ou ECFC<sup>37, 38</sup>, apparaissent après 7 à 20 jours de culture. Ces ECFC expriment notamment les marqueurs CD34 et CD146, ont un haut potentiel prolifératif mais sécrètent peu de facteurs de croissance<sup>49</sup> (Figure 2). Ils peuvent être cultivés pendant 90 jours et portent les caractéristiques de précurseurs engagés dans la lignée endothéliale.

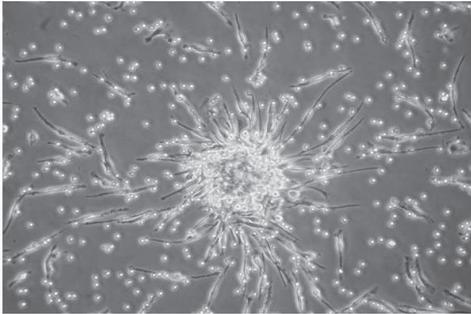
PEC précoces	PEC tardifs
	
<p>Référencés comme :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Endothelial Progenitor Cells (EPC)</li> <li>• Circulating Angiogenic Cells (CAC)</li> <li>• Culture-Modified Mononuclear Cells (CMMC)</li> <li>• CE-EPC</li> <li>• CFU-EC</li> <li>• CFU-Hill</li> </ul>	<p>Référencés comme :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Endothelial Progenitor Cells (EPC)</li> <li>• Outgrowth Endothelial Cells (OEC)</li> <li>• Blood Outgrowth Endothelial Cells (BOECs)</li> <li>• LPP-HPP endothelial cells</li> <li>• CE-EPC</li> <li>• ECFC</li> </ul>
<p>-Apparition : 4 à 7 jours de culture          -Marqueurs monocytiques et endothéliaux          -Faible potentiel prolifératif          -Sécrétion importante de facteurs de croissance</p>	<p>-Apparition : &gt; 7 jours de culture          -Aspect pavimenteux, marqueurs endothéliaux          -Haut potentiel prolifératif          -Faible potentiel sécrétoire</p>
<p>CD45, CD14, CD31, CD144 (VE-Cadherin), KDR (VEGFR2), VWF</p>	<p>CD34, CD31, CD144 (VE-Cadherin), KDR (VEGFR2), CD105 (Endoglin), CD146 (MCAM), VWF, BMP2/4</p>

Figure 2 : Deux types de progéniteurs endothéliaux circulants : morphologie, appellations, phénotype.

Les deux types de PEC contribuent à la vasculogénèse post-natale dans divers modèles précliniques d'ischémie <sup>49, 50</sup>. Mais plus récemment, seules les cellules ayant le phénotype des ECFC ont été mises en évidence dans les néovaisseaux des modèles précliniques <sup>38</sup>, ainsi que dans les vaisseaux néoformés après injection d'un produit de thérapie cellulaire autologue, composé de cellules mononucléées de la moelle osseuse chez l'adulte humain <sup>41</sup>. Au sein de cette population cellulaire hétérogène de PEC, nous nous intéresseront dans cette thèse plus particulièrement aux rôles des ECFC dans ce phénomène de vasculogénèse post-natale, impliqué dans différents contextes pathologiques.

Le processus de vasculogénèse post-natale se fait en 3 étapes : la mobilisation des PEC depuis leur réservoir médullaire principal, ou d'autres réservoirs potentiel comme le muscle squelettique <sup>51</sup>, le tissu adipeux <sup>52</sup>, l'endothélium <sup>53</sup> ; le recrutement des PEC sur des sites ischémiques ou lésés ; leur différenciation en CE.

La mobilisation est régulée par l'hypoxie, une lésion de la paroi vasculaire, des plaques athérogéniques, une thrombose coronarienne ou un pontage, qui recrute des progéniteurs endothéliaux et augmentent leur nombre en circulation <sup>54-57</sup>. Le traumatisme vasculaire entraîne la libération de VEGF et de cytokines qui induisent le recrutement des progéniteurs endothéliaux <sup>54</sup>. L'hypoxie d'un territoire ischémié active la stabilisation de HIF- $\alpha$  (*hypoxia-inducible transcription factor*) par inactivation des PHD (*prolyl-hydroxylase domain proteins*) dont l'activité est dépendante de la pression partielle en oxygène. Au lieu d'être dégradé par le protéasome (conditions normoxyque ou hyperoxyque), HIF- $\alpha$  se transloque dans le noyau où il interagit avec son hétérodimère HIF- $\beta$  et peut induire l'expression de facteurs

angiogènes comme le VEGF, le SDF-1 (*stromal cell-derived factor 1*), l'angiopoïétine 2 et le SCF (*Stem cell factor* ou *Kit ligand*) proportionnellement à la diminution de la pression en oxygène<sup>58</sup>. Le VEGF active la prolifération et la survie cellulaire par liaison à ses récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 et la voie de signalisation phosphatidylinositol 3' kinase/AKT<sup>32</sup>. Le SDF-1 se lie au CXCR4 exprimé par les PEC augmentant leur mobilisation et les guidant vers le site lésé<sup>59</sup>. D'autres cytokines comme le G-CSF (*granulocyte - colony stimulating factor*) favorisent également la mobilisation des progéniteurs endothéliaux et la régénération vasculaire<sup>60</sup>. Le monoxyde d'azote NO est un médiateur essentiel de la réactivité endothéliale et de l'angiogenèse, que ce soit suite à une ischémie ou induite par un facteur exogène. Une diminution du NO augmenterait la sensibilité des CE aux stimuli apoptotiques et diminuerait la mobilisation des PEC dépendante du VEGF<sup>61</sup>. L'activation de la MMP-9 (*matrix metalloproteinase 9*) lui permet de cliver le ligand membranaire Kit présent à la surface des cellules stromales. Le Kit soluble libéré permettant ainsi aux cellules souches et PEC exprimant le cKit de proliférer et migrer vers les zones vascularisées de la moelle osseuse<sup>62</sup>. Le SDF-1 est aussi un substrat de la MMP-9. Par sa fixation au CXCR4 exprimé sur les cellules souches hématopoïétiques (CSH) et les progéniteurs endothéliaux, le SDF-1 des cellules stromales retient ces cellules dans la moelle. Le clivage du SDF-1 permet donc la mobilisation de ces progéniteurs vers le sang<sup>63</sup>. La libération de noradrénaline au niveau médullaire induit la mobilisation des PEC par un mécanisme dépendant de la eNOS. Le recrutement fait intervenir plusieurs voies. L'augmentation du VEGF par l'hypoxie active la voie de la eNOS et augmente l'expression du SDF-1 et de MIF (*macrophage migration inhibitory factor*) au niveau du site ischémié, favorisant ainsi le recrutement des progéniteurs endothéliaux et des cellules progénitrices du muscle lisse. Le couple intégrine  $\beta 2$ /ICAM-1 est également impliqué, avec une augmentation de l'expression d'ICAM-1 après ischémie. Le recrutement est également influencé par la eNOS par augmentation de l'expression de la proMMP-9<sup>64</sup>. Récemment, il a été montré que le système IGF2 (*Insulin-like growth factor*)/IGF2R induisait le « homing » des PEC<sup>64</sup>. L'IGF2 généré dans les sites ischémiés ou tumoraux contribuerait alors à la vasculogenèse post-natale. Les plaquettes contribuent également au recrutement avec notamment la libération de composés angiogènes à partir de leurs granules  $\alpha$ , tels que le SDF-1<sup>65</sup>. Les granules  $\alpha$  des plaquettes contiennent aussi des substances anti-angiogènes telles que la thrombospondine-1<sup>66</sup>. Au niveau du site ischémié, les cellules progénitrices peuvent se différencier en CE, voir en CML, ou sécréter des facteurs paracrines. Certains progéniteurs endothéliaux, restant dans le tissu interstitiel, contribuent de manière indirecte à la réparation des vaisseaux par sécrétion de cytokines pro-angiogènes et de facteurs de croissance, qui stimulent la prolifération et la migration des CE pré-existantes et activent l'angiogenèse.

Les PEC présentent un intérêt majeur comme marqueur biologique du risque cardiovasculaire et des fonctions vasculaires (voir infra, § 1.3.2.1., «Facteurs de risque cardiovasculaire modulant le nombre de PEC »). Cependant, il existe de nombreuses disparités dans les méthodes de quantification utilisées, entraînant une grande variabilité du nombre mesuré de progéniteurs circulants. Les difficultés rencontrées résultent, d'une part, d'un manque de marqueurs spécifiques permettant de distinguer les PEC des cellules endothéliales matures circulantes (CEC) et des CSH, et d'autre part, de la très faible quantité de progéniteurs présents en circulation (entre 0,0001 % et 0,01 % des cellules mononucléées). Actuellement, la quantification des PEC est réalisée principalement par deux méthodologies : la culture cellulaire et la cytométrie en flux.

## 1.2. Détection et quantification

### 1.2.1. Cytométrie en flux

Au vu des différentes définitions des PEC disponibles dans la littérature actuelle, il est nécessaire de parvenir à distinguer les progéniteurs endothéliaux des progéniteurs hématopoïétiques d'une part, et d'autre part parmi les PEC, distinguer les 2 populations précédemment décrites. De nombreuses méthodologies ont été élaborées afin de quantifier les PEC par cytométrie en flux (CMF) : elle peut être réalisée sur sang total, sur les cellules mononucléées (CMN), après divers tris cellulaires (CD34, CD133, CD14), avec ou sans lyse des globules rouges, avec des paramétrages différents du cytomètre et différentes stratégies d'analyse, et une expression différente des résultats (par quantité de CMN ou par mL de sang). Elle nécessite donc l'utilisation combinée de marqueurs hématopoïétiques et endothéliaux participant à la définition des PEC tels que notamment les CD133, CD34, CD14, CD45 et KDR, afin d'être le plus discriminant possible.

Aucun consensus n'a encore été établi quant au choix des marqueurs cellulaires et des associations à utiliser. Cependant, la plupart des études utilisent le double marquage CD34/KDR pour quantifier les PEC<sup>67</sup>. Le CD34 est cependant également exprimé par les CSH, il convient donc d'utiliser conjointement un marqueur endothélial spécifique, tel que la lectine UEA-1, le CD144 (VE-cadhérine), ou encore le VEGFR2 (ou KDR ou Flk1). Ce dernier marqueur est également exprimé par les CSH mais au stade précoce seulement, alors qu'il est présent à la surface des CE matures.

Afin de différencier les progéniteurs des CE matures, différentes équipes ont étudié l'introduction d'un autre marqueur d'immaturité CD133 (absent des CE matures)<sup>21</sup>, en plus du CD34 (marqueur de cellules souches). Cependant le CD133 est aussi présent sur les CSH, et aucun test clonogénique n'a été réalisé de manière directe avec les cellules CD133<sup>+</sup> dans cette étude. Cette combinaison a donc été proposée sur la base de l'expression du CD133 dans la population d'intérêt, les cellules CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>. Des données controversées sont ensuite apparues concernant le CD133 et la lignée endothéliale. Deux équipes ont publié en 2007 que les cellules souches CD133<sup>+</sup> ne seraient pas à l'origine de la lignée endothéliale<sup>47, 68</sup>, remettant ainsi en cause l'utilisation de cette combinaison de marqueurs pour identifier les PEC. Case *et al* ont en effet démontré que les cellules CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> étaient enrichies en cellules formant des colonies hématopoïétiques de faible et fort potentiel de prolifération (*hematopoietic LPP et HPP-CFC*) mais ne conduisaient pas à la formation de colonies endothéliales, telles que les ECFC ni les CFU-EC. De plus, ces cellules ne formaient pas de structures vasculaires dans le Matrigel®. Ils ont de plus démontré que seules les cellules CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> pouvaient former des colonies d'ECFC en culture. Ainsi, les cellules CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> et les cellules CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> seraient des sous-populations de cellules progénitrices hématopoïétiques et non des progéniteurs endothéliaux. De même, Timmermans *et al* ont montré que les cellules CD133<sup>+</sup> formaient des colonies de PEC précoces mais pas de colonies d'ECFC et n'exprimaient ni le KDR, ni la VE-cadhérine mais le CD45. Dans cette étude les cellules formant des colonies d'ECFC sont CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>CD133<sup>-</sup>. Inversement, l'étude de Gehling *et al*<sup>22</sup> a montré que les cellules CD133<sup>+</sup>, isolées de sang périphérique après mobilisation, se différenciaient en CE et s'incorporaient dans les vaisseaux lors de la croissance tumorale et la potentialisaient. De plus, lors de leur émergence en culture, les PEC tardifs exprimaient des taux non négligeables d'ARNm de

CD133<sup>23</sup>. Les cellules CD133<sup>+</sup> sont donc plutôt des cellules hématopoïétiques qui selon les conditions de culture se différencient ou non en PEC. La caractérisation par culture cellulaire représente donc un test fonctionnel qui devrait être systématiquement réalisé en complément de la caractérisation par CMF. Le phénotype « CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>CD133<sup>-</sup> » pourrait donc être retenu pour caractériser en partie les ECFC.

La détection de certains marqueurs endothéliaux au sein des PEC précoces pourrait en fait être liée à une contamination par les plaquettes en culture<sup>69</sup>. Les monocytes pourraient en effet capter les microparticules plaquettaires à leur surface, celles-ci étant CD31<sup>+</sup>, VWF<sup>+</sup> et lectine<sup>+</sup> et possédant des propriétés angiogènes. Les PEC précoces ou CFU-EC se présentent donc comme cellules hématopoïétiques angiogènes, alors que les ECFC seraient les réels progéniteurs endothéliaux, malgré l'absence de définition phénotypique claire.

Plus récemment, la CMF polychromatique est apparue<sup>70</sup>, et a permis d'améliorer la résolution pour les antigènes faiblement exprimés et d'éliminer les cellules responsables des faux positifs : les cellules monocytaires (CD14<sup>+</sup>), les cellules érythrocytaires (CD235a), les plaquettes (CD41a<sup>+</sup>) et les cellules mortes (LIVE/DEAD violet<sup>+</sup>). Ainsi, Estes *et al* ont défini une population contenant des ECFC présentant le phénotype suivant : CD31<sup>+</sup>CD34<sup>fort</sup> CD45<sup>-</sup>AC133<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>CD41a<sup>-</sup>CD235a<sup>-</sup>LIVE/DEAD violet<sup>-</sup><sup>71</sup>. Ensuite, l'obtention de colonies d'ECFC à partir de ces cellules a été démontrée par la même équipe<sup>72</sup>, observant également que cette population contenait des CEC. Dans ce travail, Mund *et al* ont comparé l'utilisation de la CMF conventionnelle proposée par Duda *et al* en 2007<sup>73</sup> et une méthode de CMF multicolore basée sur les recommandations de la CMF polychromatique<sup>74</sup>. Ils ont ainsi montré une différence importante de détection d'évènements rares entre les deux techniques avec 0,262 ± 0,986% de cellules CD31<sup>bright</sup>CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>AC133<sup>-</sup> par la technique conventionnelle versus 0,150 ± 0,0563% par la CMF polychromatique. L'utilisation d'un marqueur nucléaire (DAPI) a montré que la proportion d'évènements rares détectée par CMF conventionnelle était contaminée par des vésicules extracellulaires endothéliales et plaquettaires. Au final cette équipe démontre que les cellules CD34<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>CD105<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> identifiées par CMF polychromatique, contiennent à la fois des ECFC hautement prolifératives (formation de colonies endothéliales en culture, et de vaisseaux fonctionnels dans des implants murins de gel de collagène), et des CEC au potentiel clonogénique limité ou nul. Cependant Mund *et al* recommandent d'isoler les cellules d'intérêt CD146<sup>+</sup> par immunoséparation magnétique (méthode moins délétère pour les ECFC que l'isolation par CMF, et permettant d'être en adéquation avec le protocole d'isolation de CE de Woywodt *et al*<sup>75</sup>), puis d'associer l'identification par CMF polychromatique aux méthodes d'identification en culture.

## 1.2.2. Culture cellulaire

### 1.2.2.1. PEC précoces

La quantification des PEC (dans leur globalité) par culture cellulaire consiste à dénombrer après isolement des cellules mononucléées totales, soit les colonies de cellules adhérentes (sur fibronectine, gélatine ou collagène) doublement positives en immunofluorescence pour la fixation de la lectine et l'incorporation des LDL oxydées, soit le nombre de colonies cellulaires de PEC précoces d'après leur morphologie.

Au début des années 2000, plusieurs équipes<sup>55, 76, 77</sup> ont décrit la même méthode de culture permettant d'obtenir des CAC (*circulating angiogenic cells*), qui fut utilisée initialement pour étudier les PEC<sup>4</sup>. Les CMN étaient ensemencées dans un milieu de culture enrichi en facteurs de croissance pour la lignée endothéliale, l'EGM2 (*Endothelial growth medium 2*). Après 3 jours de culture, les cellules non adhérentes étaient éliminées. Puis les colonies de PEC précoces étaient quantifiées au bout de 4 à 7 jours de culture selon les protocoles. Contrairement aux ECFC, les PEC précoces ne donnent pas de colonies secondaires. Par contre elles peuvent donner des colonies secondaires hématopoïétiques type CFU-GM via le test clonogénique en 3 dimensions dans la méthylcellulose (*CFU-GM methylcellulose assay*)<sup>38, 78</sup>. Ces cellules expriment les mêmes marqueurs et ont les mêmes fonctions *in vitro* que les CFU-EC ou CFU-Hill.

Ces 2 dernières dénominations représentent une seconde méthode d'obtention des PEC précoces, grâce à une technique développée par Hill *et al*<sup>36</sup>, pouvant être réalisée par l'utilisation d'un kit commercial, l'Endocult® (StemCell Technologies). Les CMN isolés du sang périphérique ou du sang de cordon sont ensemencées dans le milieu Endocult®, à une concentration de  $5.10^6$  CMN par puits de plaque 6 puits recouverts ("*coating*") de fibronectine. Après 48 heures, les cellules non adhérentes sont réensemencées à une concentration de  $1.10^6$  CMN par puits de plaque 24 puits « coatés » avec de la fibronectine. Après 3 jours, soit à J5, les colonies de CFU-EC sont comptées. Elles sont formées d'un centre de cellules rondes (lymphocytes T<sup>79</sup>) entourées de cellules fusiformes. La sélection des cellules non adhérentes devait permettre d'éliminer les monocytes/macrophages mais ces colonies expriment également des marqueurs monocytaires. Les CFU-Hill ne présentent pas toutes les caractéristiques morphologiques des PEC précoces, car seules les cellules fusiformes sont observées dans les cultures de PEC précoces/CAC. Par ailleurs, on obtient un nombre beaucoup plus important de CAC que de CFU-Hill en culture.

#### 1.2.2.2. PEC tardifs ou ECFC

Pour obtenir en culture des PEC tardifs, les CMN sont ensemencées sur du collagène-I de rat dans un milieu de culture enrichi spécifique de la lignée endothéliale, l'EGM2 (Figure 3). Ici, les cellules non adhérentes sont éliminées dès les premiers jours de culture. Les colonies apparaissent entre 7 et 20 jours de culture à partir du sang périphérique, 5 à 7 jours si les CMN viennent de sang de cordon. Aucune équipe à ce jour n'a pu obtenir des ECFC à partir de CMN isolées de la moelle osseuse. En effet, seules les cellules mésenchymateuses, qui ont un net avantage de prolifération, sont obtenues et elles ne se différencient pas en CE<sup>80</sup>.

Plusieurs facteurs influencent la prolifération et la différenciation des cellules en culture : les facteurs de croissance utilisés, la matrice d'adhésion des cellules, le contact avec une matrice extracellulaire ou un type cellulaire spécifique notamment. La nature de la matrice extracellulaire est très importante. Celle-ci est en effet impliquée *in vivo* dans la régulation de la migration, la prolifération et la survie des CE<sup>81</sup>. De plus, elle permet le processus de morphogénèse vasculaire par la transmission de signaux via les intégrines qui contrôlent le cytosquelette d'actine. La culture des ECFC nécessite d'être uniformisée, différentes conditions ont en effet été utilisées pour leur culture et sont résumées dans la figure 3.

La quantification des ECFC est plus difficile à mettre en œuvre pour les larges cohortes d'études cliniques car elle nécessite des longs protocoles de culture et un grand volume de sang en raison de leur présence en faible quantité. Le développement récent d'une méthode de quantification des ECFC par cytométrie en flux permettra probablement une plus grande

étude de cette sous-population <sup>71</sup>. Actuellement, l'absence de corrélation entre ces différents tests <sup>82-84</sup>, en lien avec l'hétérogénéité des sous-populations de PEC dénombrées, reste une source de discordance possible entre les différentes études publiées.

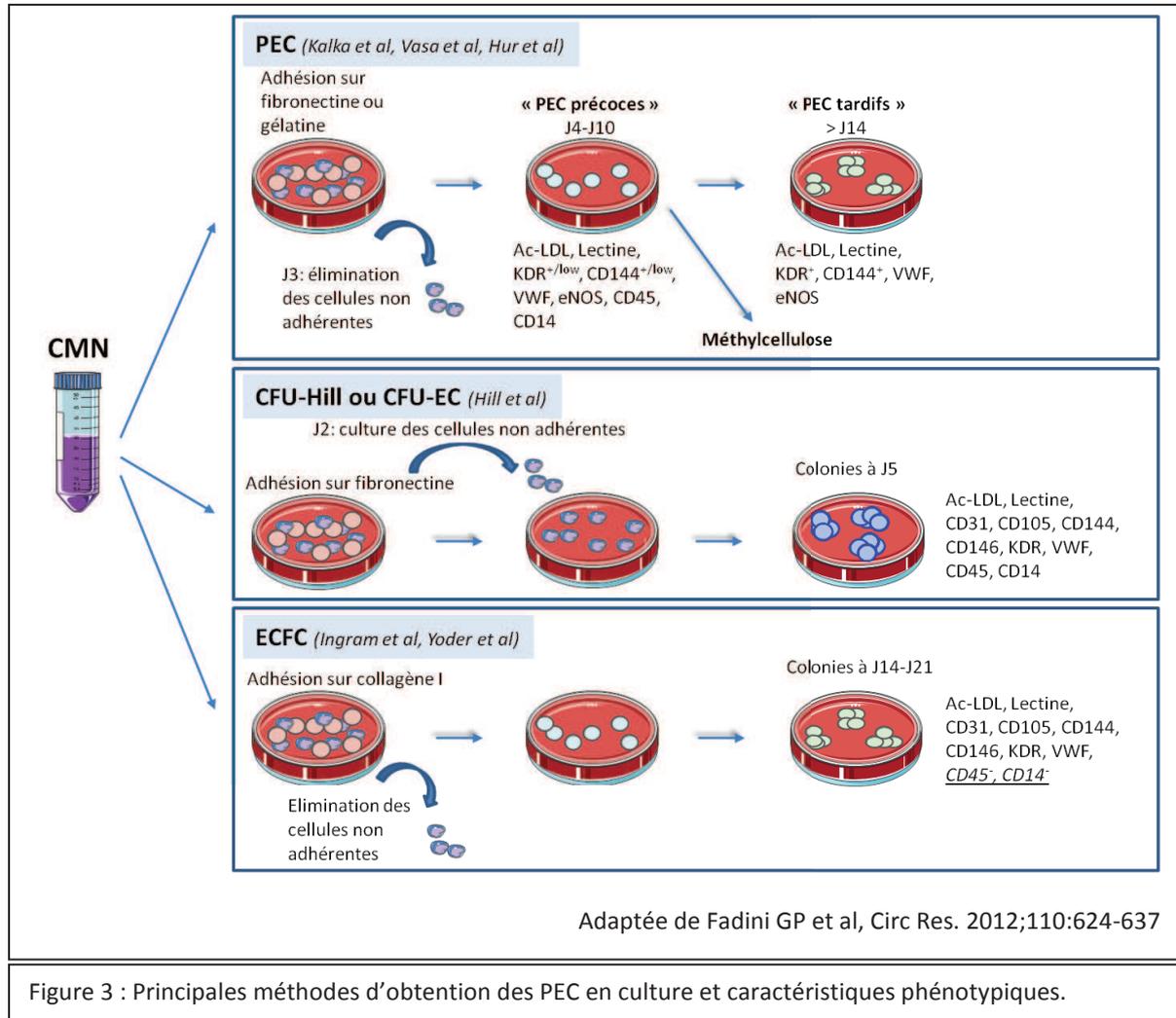


Figure 3 : Principales méthodes d'obtention des PEC en culture et caractéristiques phénotypiques.

### 1.3. Propriétés *in vitro* et *in vivo*

Les ECFC présentent des caractéristiques de progéniteurs. On en trouve à une concentration de 2 à 5 cellules/mL dans le sang de cordon, et environ 0,05 à 0,2 cellules/mL dans le sang adulte<sup>37</sup> à différencier des CEC, présentes dans le sang adulte à raison de 3 cellules/mL<sup>75</sup>. Étant donné l'utilité potentielle des PEC comme marqueurs cellulaires de cancer ou de pathologie cardiovasculaire, mais également comme produits de thérapie cellulaire, une meilleure caractérisation de ces cellules est nécessaire. Dans ce contexte, une expression sélective des BMP2/4 (*bone morphogenetic proteins 2 and 4*) dans les ECFC par comparaison aux PEC précoces a été montrée ainsi que le rôle angiogène de ces molécules<sup>41</sup>. Notre équipe a également décrit une différence d'expression de l'IL-8 (CXCL-8), importante à l'état basal dans les CFU-EC isolés de sang adulte, contrairement aux ECFC<sup>85</sup>. Les récepteurs CXCR1 et CXCR2 de l'IL-8 sont également très exprimés dans les CFU-EC, alors que les ECFC ne les expriment pas<sup>85</sup>. D'autre part, avant de qualifier de PEC des populations cellulaires identifiées par cytométrie, il serait nécessaire de les caractériser au niveau de leur morphologie cellulaire et par un test clonogénique, avant de tester leur rôle dans des modèles *in vitro* ou *in vivo*<sup>86</sup>. L'équipe de David Ingram et Mervin Yoder a développé en 2004 un test clonogénique pour quantifier le potentiel prolifératif des CE dérivées des PEC de sang de cordon et de sang adulte<sup>37</sup>. Déterminer si une cellule est capable de se diviser et de former des colonies en l'absence d'autres cellules constitue le test le plus rigoureux pour définir une cellule progénitrice. Il est réalisé par un essai clonogénique avec une seule cellule où les conditions doivent être bien définies. Les limites de cette méthode sont, entre autres, un problème de reproductibilité et l'absence de la coopération avec d'autres types cellulaires qui peut être nécessaire pour leur activité.

#### 1.3.1. Capacités angiogènes

Comme initialement décrit par Asahara *et al.* en 1997<sup>4</sup>, certaines cellules sanguines circulantes dérivées de la moelle osseuse migrent vers le site de la lésion vasculaire et restaurent la circulation sanguine en formant de nouveaux vaisseaux. Ces cellules étant identifiées comme des progéniteurs endothéliaux, ce processus de vascularisation donnera naissance au concept de vasculogénèse postnatale.

Dans l'ensemble, la plupart des méthodes de culture à court terme ou à long terme ont donné des cellules ayant la capacité d'améliorer la néovascularisation dans des modèles précliniques<sup>38, 49, 50, 87</sup>. Cependant, les cellules obtenues par ces protocoles diffèrent quant à leur capacité à se différencier en CE et à former physiquement de nouveaux vaisseaux. La plupart des études suggèrent que les cellules obtenues par les méthodes de culture à court terme (« PEC précoces », CFU-EC) renforcent essentiellement la formation des vaisseaux en fournissant un puissant mélange de facteurs de croissance qui soutient l'angiogénèse<sup>77, 88-90</sup>. Au contraire, les cellules obtenues après une méthode de culture à long terme (ECFC) peuvent générer des CE et ainsi contribuer physiquement à la formation de nouveaux capillaires<sup>38, 49</sup>. Il est à noter que l'évaluation fonctionnelle des ECFC en est plutôt à ses balbutiements comparée à l'étude des CFU-EC, qui a fait l'objet de critiques approfondies et de réévaluations. L'utilisation de l'imagerie confocale 3D avancée a sensiblement redimensionné le cadre dans lequel les cellules dérivées de la moelle osseuse semblent contribuer à l'endothélium périphérique dans différents contextes<sup>91-94</sup>. La capacité des ECFC

à se différencier en endothélium mature et à remplacer l'endothélium périphérique *in vivo* doit être étudiée avec la même rigueur. Une autre caractéristique importante des ECFC est qu'elles forment des structures vasculaires *in vitro* en l'absence de co-culture, alors que les CFU-EC nécessitent l'interaction avec les CE, et notamment, favorisent la formation d'un réseau vasculaire de CE matures *in vitro* <sup>39</sup>. De plus, l'environnement *in vivo* pourrait influencer le devenir et la fonction cellulaire. Ainsi, dans des conditions ischémiques, l'injection de CE matures ne permet pas d'améliorer la néovascularisation <sup>56, 95, 96</sup>, bien qu'elles forment des structures vasculaires dans les implants de Matrigel® <sup>97</sup>. Un niveau de complexité supplémentaire est représenté par la constatation que les cellules circulantes - ou dérivées - de la moelle osseuse peuvent être incorporées dans la zone périvasculaire, et de ce fait favorisent indirectement la croissance des vaisseaux, et potentiellement leur stabilité, sans former de néo-endothélium. Cette fonctionnalité a d'abord été démontrée pour les cellules hématopoïétiques <sup>98</sup>, comme les « TEM » (*Tie2-expressing monocytes*) <sup>99</sup>, et a été confirmé pour les PEC humains, qui peuvent exister dans un état quiescent périvasculaire en l'absence d'ischémie, lorsque Fadini *et al* ont observé qu'ils sont recrutés vers la couche intimale après un stimulus ischémique <sup>100</sup>. Des expériences de « gènes suicides » ont documenté que les CFU-EC injectées chez des souris après infarctus du myocarde, s'incorporent physiquement dans les vaisseaux *in vivo* pendant plusieurs semaines, sans pour autant former de nouvelles CE, et s'avèrent nécessaires pour soutenir l'angiogenèse post-ischémique <sup>101</sup>.

### 1.3.2. Facteurs modulant leur nombre ou leurs propriétés angiogènes

#### 1.3.2.1. Facteurs de risque cardiovasculaire modulant le nombre de PEC

Des études cliniques ont montré que le nombre de PEC circulants est inversement corrélé aux facteurs de risque classiques d'athérosclérose <sup>36, 102</sup>. De plus, les PEC isolés par cytométrie en flux et identifiés en culture (CD34<sup>+</sup> KDR<sup>+</sup>, puis quantification des colonies avec l'Endocult®) chez les patients coronariens présentent une diminution de leur capacité migratoire, inversement corrélée avec le nombre de facteurs de risque cardiovasculaire (CV) <sup>102</sup>.

Cependant, dans la plupart des études cliniques brièvement résumées dans ce paragraphe, le nombre de patients inclus est généralement faible (seulement 6 études sur les 20 présentées dans le tableau 1 incluent un nombre de patients supérieur à 100) et souvent comparé à des groupes de patients non correctement appariés. Ainsi, l'étude princeps de l'équipe de Stefanie Dimmeler qui a démontré pour la première fois que le nombre et/ou la fonctionnalité des PEC étaient inversement corrélés aux facteurs de risque cardiovasculaire comprenait seulement 45 patients vs 15 témoins <sup>102</sup>. Du fait du manque de standardisation des méthodes de quantification, et à cause de ces problèmes méthodologiques, les résultats des corrélations cliniques présentés ici sont à interpréter avec prudence. Ces problèmes méthodologiques expliquent au moins en partie les différents résultats retrouvés dans les études sur les PEC en pathologie humaine (ex : hypertension artérielle pulmonaire, *cf infra*). Ces paramètres pris en considération, plusieurs études ont cependant démontré que le nombre de PEC circulants est réduit en présence de facteurs de risque cardiovasculaire classiques, indépendamment d'une maladie cardiovasculaire (MCV) établie. Même les facteurs de risque non modifiables semblent affecter les PEC : les sujets âgés et de sexe

masculin ont des taux moins élevés de PEC CD34<sup>+</sup> KDR<sup>+</sup> que les individus plus jeunes<sup>103</sup> et de sexe féminin<sup>104</sup>, respectivement. Bien que ce phénomène reflète l'appauvrissement progressif en cellules souches survenant avec l'âge, la différence entre les sexes par rapport aux PEC constitue probablement l'un des déterminants de la protection cardiovasculaire chez les femmes fertiles. Il n'est pas encore clairement établi si les antécédents familiaux de MCV sont associés à des taux bas de PEC, indépendamment d'autres facteurs de risque<sup>102, 105</sup>, par contre le fond génétique a un rôle reconnu<sup>106</sup>. En effet, chez des patients sous insulinothérapie, le génotype « SDF1-3' A/G » augmente le recrutement des cellules CD34<sup>+</sup> CD133<sup>+</sup><sup>106</sup>.

Parmi les facteurs classiques de risque CV, le tabagisme<sup>107-111</sup>, l'hypertension<sup>112-118</sup>, l'hypercholestérolémie<sup>119, 120</sup>, l'obésité<sup>121-123</sup>, et le diabète<sup>124-128</sup> ont toujours été associées à une réduction des taux de PEC circulants, même en utilisant des méthodologies différentes pour quantifier les PEC, allant de l'analyse par FACS à la culture cellulaire. Des corrélations linéaires ont également été retrouvées entre la sévérité du facteur de risque et le taux de PEC, ce qui soutient un lien de causalité entre les facteurs de risque et la réduction du nombre de PEC (Tableau 1).

En ce qui concerne les facteurs de risque émergents, des associations ou des corrélations ont été démontrées entre la réduction du nombre de PEC et l'hyperhomocystéinémie<sup>129</sup>, la microalbuminurie<sup>130</sup>, l'inflammation<sup>131</sup> et la résistance à l'insuline<sup>132</sup>. En plusieurs occasions, les mécanismes par lesquels un facteur de risque donné affecte la biologie de PEC ont été identifiés<sup>133</sup>. A noter que les facteurs de risque CV surviennent le plus souvent en association chez les mêmes patients. Bien que plusieurs études cliniques aient montré l'effet indépendant du facteur de risque en analyse multivariée, il n'est pas encore élucidé dans quelle mesure la présence de facteurs de risque individuels ou leur combinaison peut diminuer le nombre de PEC. En effet plusieurs études montrent que le nombre de PEC diminue progressivement, en parallèle à l'augmentation du nombre de facteurs de risque<sup>102, 125</sup>. Dans le cadre du syndrome métabolique, le regroupement des facteurs de risque diminue de façon synergique le nombre de cellules CD34<sup>+</sup> circulantes<sup>133</sup>. Par ailleurs, certaines études ont démontré que les traitements spécifiques ciblant les facteurs de risque sont capables de normaliser les taux des PEC.

Les traitements antihypertenseurs avec différentes classes de médicaments ont démontré leur capacité à limiter la réduction du nombre de PEC chez les patients hypertendus<sup>134, 135</sup>. Dans l'ensemble, ces données montrent régulièrement que les taux de PEC sont réduits en présence de facteurs de risque CV, en particulier quand ils sont associés, et que cette altération est partiellement réversible.

#### 1.3.2.1.1. Diabète

Certaines études ont souligné les effets néfastes du diabète de types 1 et 2 sur le nombre et la fonctionnalité des PEC<sup>31, 127</sup>. Tepper *et al* ont montré que, dans le diabète de type 2, les capacités prolifératives et adhésives des PEC sont réduites. De plus, les PEC de sujets diabétiques forment moins de tubes en Matrigel® que des PEC de sujets témoins. De façon intéressante, l'hémoglobine glyquée est inversement corrélée au nombre et aux capacités des PEC *in vitro* dans les diabètes de type 1 et 2. Dans ce contexte, les effets néfastes de l'hyperglycémie ont été attribués à une diminution de la production de NO et donc d'activité de la MMP-9<sup>136</sup>. Par ailleurs, dans un modèle expérimental d'ischémie de la patte chez la souris diabétique<sup>137</sup>, il existe une diminution de la mobilisation des PEC médullaires dans la

circulation. Cependant, dans une étude plus récente, il est rapporté que chez les patients diabétiques (aussi bien non compliqués que compliqués d'AOMI) la dysfonction endothéliale résulterait plutôt d'une maturation altérée des PEC (marqueur de la régénération endothéliale)<sup>138</sup>. En effet, ces groupes de patients diabétiques présentent une augmentation du nombre de PEC CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup> parallèlement à une diminution du nombre de PEC CD31<sup>+</sup>/CD144<sup>+</sup>/VEGFR2<sup>+</sup>, ainsi qu'une augmentation du nombre de CEC (cellules CD31<sup>+</sup>/CD146<sup>+</sup>, marqueur de l'atteinte endothéliale). Les hypoglycémiant associés à une insulinothérapie chez les patients diabétiques ont pu augmenter le nombre de PEC circulants CD133<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> et CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup><sup>139</sup>, tandis que d'autres molécules (statines, molécules activant le système rénine-angiotensine-aldostérone, œstrogènes, érythropoïétine) peuvent stimuler les propriétés des PEC<sup>140</sup>.

#### 1.3.2.1.2. Dyslipoprotéïnémie

Un des facteurs de risque cardiovasculaire les plus importants est l'augmentation de la concentration d'une fraction lipidique, le LDL-C (*low density lipoprotein cholesterol*). Cependant, peu d'études ont étudié l'influence des LDL sur les PEC<sup>119, 141-143</sup>. Les LDL oxydés seraient, en outre, capables d'accélérer l'apparition de la sénescence de ces cellules, ce qui pourrait expliquer la baisse du nombre de PEC chez les patients présentant une hyperLDLémie<sup>142</sup>. Les effets du LDL-C sur la sénescence des PEC pourraient être contrebalancés par utilisation des statines<sup>144, 145</sup>, qui semblent représenter le meilleur traitement pour augmenter le nombre de PEC<sup>145</sup>.

Noor *et al* ont exploré l'influence des « *high density lipoprotein cholesterol* » (HDL-C) sur le nombre et la fonctionnalité des PEC<sup>146</sup>. Cette étude montre que des patients présentant des taux bas de HDL-C présentaient parallèlement des taux bas de PEC, cet effet étant attribué à l'effet inhibiteur des HDL-C sur la NOS3. De plus, le HDL-C permettrait de prévenir l'apoptose des PEC en inhibant la caspase-3. Plus récemment, une équipe italienne a montré que chez des patients hypercholestérolémiques, le sous-groupe ayant un taux normal de HDL-C présentait un nombre de PEC significativement plus élevé, ainsi que des capacités migratoires (évaluées sur des CFU-EC) mieux préservées, par rapport au sous-groupe avec un taux diminué de HDL-C<sup>120</sup>. L'amélioration des propriétés angiogènes *in vitro* des CFU-EC par les HDL, ainsi que leur capacité à inhiber l'apoptose avaient également été confirmées par l'équipe de Werner<sup>147</sup>. La LDL-aphérèse chez les patients atteints d'hypercholestérolémie familiale augmente les PEC CD34<sup>+</sup> KDR<sup>+</sup> (bien que le nombre de cellules CD34<sup>+</sup> CD133<sup>+</sup> KDR<sup>+</sup> reste inchangé)<sup>148</sup>.

#### 1.3.2.1.3. Tabagisme

Le tabagisme est un facteur de risque cardiovasculaire important, et qui a été associé à une diminution du nombre de PEC<sup>102</sup>. Cependant, une étude récente a montré que le rôle de la nicotine est très complexe et dose-dépendant : elle augmenterait notamment le nombre de PEC, leurs capacités proliférative, migratoire, et adhésive, mais également leur capacité de vasculogénèse *in vitro* à de faibles concentrations de nicotine ( $10^{-12}$  à  $10^{-8}$  M). Par contre la cytotoxicité apparaît à de plus fortes concentrations ( $> 10^{-6}$  M)<sup>149</sup>. Chez l'homme, des niveaux bas de PEC ont été retrouvés chez des fumeurs chroniques (n = 15). Le taux de PEC CD45<sup>dim</sup> CD34<sup>+</sup> CD133<sup>+</sup> KDR<sup>+</sup> remonte après cessation du tabac en moins de 4 semaines<sup>107</sup>.

Cependant, aucune différence n'a été retrouvée chez les patients qui ont reçu un patch de nicotine après l'arrêt du tabac, par comparaison aux patients n'en ayant pas reçu. Ainsi les effets directs de la nicotine sur le nombre de PEC peuvent être discutés, du moins *in vivo*.

Plus récemment, l'équipe de Asahara a montré que la nicotine ne modifiait pas les propriétés proliférative et migratoire des PEC, mais qu'elle avait un effet anti-apoptotique, et qu'après administration *per os*, elle améliorait la reperfusion après injection de PEC dans le modèle murin de la patte ischémisée<sup>150</sup>.

En 2010, une étude menée chez 32 femmes saines en âge de procréer, montre que le nombre de PEC corrèle positivement avec la fonction vasculaire, et qu'il diminue avec le tabagisme (au moins 15 cigarettes par jour pendant au moins 1 an) par rapport aux 15 femmes qui n'ont jamais fumé<sup>109</sup>.

#### 1.3.2.1.4. Absence d'exercice physique

L'inactivité physique a été associée à une plus grande fréquence de maladies cardiovasculaires, mais également à une augmentation du stress oxydatif, de l'athérosclérose et des dysfonctions endothéliales<sup>151</sup>. Il a été mis en évidence que les souris avec une activité physique régulière avaient un nombre de PEC plus élevé que les souris soumises à un style de vie sédentaire. Chez l'homme, une augmentation significative des PEC est observée chez les patients qui ont repris une activité physique normalisée pendant un programme de réadaptation<sup>152</sup>, chez des patients coronariens soumis à un entraînement physique<sup>153</sup>, et chez des volontaires sains soumis à un exercice physique de 30 minutes<sup>154</sup>. De manière intéressante, après un exercice physique de 15 minutes maximum, le nombre de PEC (définis en CMF comme CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>/VEGFR2<sup>+</sup> et en culture comme CFU-EC) augmente chez une population de volontaires sains (moyenne d'âge 33 ans) ainsi que chez des patients artéritiques (moyenne d'âge 69 ans), alors que chez des patients âgés non artéritiques (moyenne d'âge 66 ans) il n'y a pas de modifications notables, ou alors une légère tendance à l'augmentation<sup>155</sup>. Par contre lorsque la définition cytométrique des PEC prend en compte la négativité CD31, on observe alors une diminution après l'exercice physique chez les sujets âgés artéritiques ou non<sup>155</sup>. Les PEC définis comme CD34<sup>+</sup>/VEGFR2<sup>+</sup>/CD146<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup> quant à eux diminuent après l'exercice physique chez les sujets jeunes et chez les artéritiques mais augmentent chez les sujets âgés sains<sup>155</sup>. Ces résultats soulignent les difficultés de standardisation quant à la définition phénotypique des PEC.

Dans une autre étude, chez un groupe de patients artéritiques, l'exercice physique augmente significativement le nombre de PEC (CAC et CFU-EC) parallèlement à une diminution de la diméthylarginine asymétrique (inhibiteur de la NO synthase, utilisé comme marqueur reflétant la fonction endothéliale), par rapport au groupe de patients bénéficiant du traitement médical de référence<sup>156</sup>. Cependant, contrairement à l'étude menée par Sandri *et al*<sup>153</sup>, une autre équipe a observé plus récemment que l'exercice physique ne modifiait pas le nombre de PEC (CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>), ni même les taux de CRP ultra sensible (reflétant l'inflammation), de superoxyde dismutase et de 8-isoprostane (ces 2 derniers marqueurs reflétant le stress oxydatif) chez un autre groupe de patients coronariens<sup>157</sup>. Alors qu'elle observait parallèlement une amélioration de la fonction endothéliale (évaluée par la dilatation de l'artère brachiale médiée par le flux) et de la capacité à l'exercice physique, indépendamment donc de l'inflammation, du stress oxydatif et du nombre de PEC.

Enfin, la perte de poids augmentent le nombre de cellules CD34<sup>+</sup> et CD34<sup>+</sup>/c-KIT<sup>+</sup> chez les patients obèses, de façon proportionnelle par rapport au degré de perte de poids <sup>121</sup>.

#### 1.3.2.1.5. *Autres facteurs de risque*

D'autres facteurs de risque cardiovasculaire ont été associés à un nombre réduit de PEC, dont l'hyperhomocystéinémie <sup>158</sup> et une protéine C-réactive (CRP) élevée <sup>159, 160</sup>. La CRP est un marqueur important de l'inflammation qui est associé au dysfonctionnement endothélial et à l'athérosclérose. Quand les PEC sont cultivés en présence ou non de CRP, avec une concentration de CRP > 15 µg/mL le nombre de colonies de PEC *in vitro* diminue <sup>160</sup>.

Le sexe intervient également comme facteur modulant le nombre de PEC, par le biais de l'imprégnation hormonale. En effet, les œstrogènes protègent du risque cardiovasculaire et augmentent le nombre de PEC via des mécanismes anti-apoptotiques, et diminuent la formation de la néo intima <sup>161</sup>.

Le vieillissement global de la population constitue un paramètre qui favorise l'apparition de co-morbidité, dont la plupart des pathologies cardiovasculaires et leurs facteurs de risque associés, évoqués dans les paragraphes précédents. De façon intéressante, Shaffer *et al* retrouvent la diminution du nombre de progéniteurs circulants (définis comme CD34<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup>, et CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>) avec l'âge chez des sujets sains (33 ans versus 66 ans). Mais aucune différence n'est rapportée pour les PEC pour lesquels plusieurs définitions cytométriques ont été utilisées incluant toutes le marqueur KDR, ni pour les CFU-EC (Endocult®), ni des CE matures (CMF) <sup>162</sup>.

Facteur de risque	Patients inclus	Effet / phénotype des PEC	Corrélations / Observations
<b>Diabète</b>			
Fadini et al <sup>125</sup>	68	CD34 et CD34/KDR diminuées dans le diabète de type 2	Corrélation directe avec l'« ABI » ( <i>ankle-brachial index</i> )
Fadini et al <sup>126</sup>	219	CD34/KDR diminuées dans le diabète nouvellement diagnostiqué, et CD34 diminuées dans l'état prédiabétique	Corrélation négative avec la glycémie post-prandiale immédiate et à 2 heures
Loomans et al <sup>127</sup>	40	PEC précoces diminués dans le diabète de type 1	Corrélation négative avec l'hémoglobine glyquée HbA1c
Egan et al <sup>124</sup>	137	Diminution de plusieurs phénotypes de PEC (FACS) dans le diabète de type 2	Corrélation négative avec la présence de multiples complications du diabète
<b>Hyperlipidémie</b>			
Rossi et al <sup>120</sup>	80	CD34/CD133 et fonctions des PEC précoces diminuées chez les patients avec taux élevés de LDL-cholestérol	Corrélation inverse et directe entre PEC et LDL-cholestérol
Chen et al <sup>119</sup>	40	PEC précoces diminués chez les patients hypercholestérolémiques	Article rétracté depuis septembre 2010
<b>Tabagisme</b>			
Kondo et al <sup>107</sup>	29	CD45 dim/CD34/CD133/KDR diminuées	Corrélation inverse avec le nombre de cigarettes ; augmentation après arrêt du tabac et nouvelle diminution après reprise
Ludwig et al <sup>109</sup>	32	CFU-EC & CD34/CD133 diminuées chez les femmes tabagiques	Indépendant du cycle hormonal
Yue et al <sup>110</sup>	174	CD34/KDR & CD133/KDR diminuées	Inversement corrélée avec la pression artérielle pulmonaire la résistance vasculaire
Michaud et al <sup>111</sup>	26	Diminution des PEC précoces chez les individus sains tabagiques vs individus contrôles	Corrélation directe avec la capacité antioxydante du plasma et les concentrations en nitrites
<b>Absence d'exercice physique / obésité</b>			
Muller-Ehmsen et al <sup>121</sup>	149	Diminution des CD34/KDR, CD34/CD133, CD34/c-kit chez les individus obèses vs les individus en surpoids	Corrélation négative entre les PEC et l'IMC
Tobler et al <sup>123</sup>	90	Diminution des CD34/KDR, CD34/CD133/KDR chez les individus obèses	Corrélation négative avec l'IMC
Heida et al <sup>122</sup>	98	Fonctions des PEC précoces diminuées chez les patients obèses	Réversible par inhibition de la p38 MAPK
<b>Hypertension</b>			
Pirro et al <sup>112</sup>	60	Taux de CD34/KDR diminué chez les patients avec hypertension essentielle	Corrélation avec l'expression du facteur de différenciation HOXA9
Oliveras et al <sup>113</sup>	69	Diminution des CD45 dim/CD34/CD133 et des PEC précoces chez les patients avec hypertension réfractaire	Indépendante des facteurs de risque d'hypertension cofondateurs
Umemara et al <sup>114</sup>	160	Diminution des CD45 dim/CD34/CD133 et chez les patients avec hypertension	L'hypertension et l'âge sont des prédicteurs indépendants de la diminution du nombre de PEC
Giannotti et al <sup>115</sup>	52	Diminution des CD34/KDR chez les patients préhypertendus et hypertendus	Fonctions des PEC altérées
Delva et al <sup>116</sup>	60	Taux normaux de CFU-EC chez les patients avec hypertension essentielle	Absence de corrélation avec la pression artérielle
Yang et al <sup>117</sup>	41	Taux normaux de CD34/KDR chez les patients avec hypertension essentielle mais fonctions diminuées des PEC précoces <i>in vitro</i>	Capacités proliférative et migratoire des PEC en corrélation étroite avec l'élasticité artérielle
Lee et al <sup>118</sup>	128	Diminution des CD34/KDR chez les patients hypertendus avec hypertrophie ventriculaire gauche	Capacité adhésive des PEC diminuée chez les patients hypertendus avec hypertrophie ventriculaire gauche

Tableau 1 : Principales études cliniques rapportant une altération du nombre de PEC et / ou de leurs propriétés en fonction des facteurs de risque cardiovasculaire. Adapté de Fadini GP et al, *Circ Res* 2012;110:624-637

### 1.3.2.2. Facteurs modulant leurs propriétés angiogènes

Alors que dans l'angiogenèse tumorale il s'agit principalement d'un désordre endothélial, dans les maladies non néoplasiques la croissance et le remodelage vasculaires impliquent les CE et les CML. L'inflammation et l'hypoxie contribuent à l'angiogenèse dans ces pathologies vasculaires non néoplasiques. Seront développés dans ce paragraphe, de façon non exhaustive, les principaux facteurs pro- et anti-angiogènes ayant au moins une action sur les PEC.

#### 1.3.2.2.1. Facteurs pro-angiogènes

##### *VEGF et vasculogenèse post-natale*

Le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) a d'abord été décrit comme le « VPF » (*vascular permeability factor*), en raison de ses propriétés de contrôle de la perméabilité vasculaire<sup>163</sup>. Il intervient dans les processus angiogènes normaux et pathologiques. Le VEGF dérive d'une famille de supergènes très proches qui inclut le VEGF-A, le PlGF (*placental growth factor*), le VEGF-B, le VEGF-C, le VEGF-D, VEGF-E et le VEGF-F. Le PlGF et le VEGF-B se lient et activent essentiellement le VEGFR1. Le VEGF-E a été identifié dans le génome d'un *Parapoxvirus* et montre une haute affinité pour le VEGFR2. Le VEGF-F et la *Vammin* sont des « VEGF » retrouvés dans des venins de serpents, présentant également une forte affinité pour le VEGFR2. Le VEGF-C et le VEGF-D sont impliqués dans le développement et la régulation de la lymphangiogenèse, via le VEGFR3. Le VEGF-A (communément désigné sous le terme « VEGF ») est le régulateur majeur de l'angiogenèse.

Le gène du VEGF-A contient 8 exons qui donnent par épissage alternatif différentes isoformes. Les 4 isoformes les plus importantes sont le VEGF<sub>121</sub>, le VEGF<sub>165</sub>, le VEGF<sub>189</sub> et le VEGF<sub>206</sub>.

Le VEGF<sub>121</sub>, en l'absence de l'exon 7, ne fixe pas l'héparine et diffuse librement, tandis que les VEGF<sub>189</sub> et <sub>206</sub> sont complètement séquestrés dans la matrice extracellulaire (MEC) et se lient à l'héparine. Le VEGF<sub>165</sub> est l'intermédiaire entre ces différentes formes, il fixe l'héparine et une fraction importante du VEGF<sub>165</sub> sécrété est enchâssée dans la MEC. De plus, il a la capacité de fixer la neuropiline-1. Le VEGF<sub>165</sub> est l'isoforme qui semble la plus impliquée dans l'angiogenèse ; il restaure un phénotype tumoral sur des cellules VEGF<sup>-/-</sup> et sa surexpression provoque chez la souris des saignements intracérébraux par formation excessive et trop rapide de capillaires<sup>164</sup>.

Le VEGF stimule *in vitro* la prolifération et la migration des CE et leur organisation en tubes capillaires. Il stimule la perméabilité des capillaires, induisant l'extravasation de protéines telles que le fibrinogène permettant ainsi la formation d'un gel de fibrine propice à la migration et l'organisation des CE<sup>165, 166</sup>. Il induit également l'extravasation de la fibronectine ou de la vitronectine qui modifient la composition de la MEC et facilitent l'angiogenèse<sup>167</sup>. Le VEGF stimule également l'expression et le relargage de différentes enzymes protéolytiques favorisant la lyse de la membrane basale et de la MEC, préalable indispensable à l'invasion d'un tissu par les néovaisseaux.

L'activité du VEGF s'étend au-delà de l'étape de bourgeonnement des capillaires. Une stimulation constante par le VEGF semble nécessaire à la stabilisation des vaisseaux nouvellement formés. De plus, le VEGF serait un facteur de survie des CE<sup>168</sup>. Chez l'adulte, le

VEGF est produit dans de nombreux tissus normaux. Il pourrait jouer un rôle dans la différenciation, notamment dans la fenestration de l'endothélium <sup>169</sup>.

L'expression du VEGF est induite par de nombreux facteurs de croissance et de cytokines mais le stimulus le plus puissant reste l'hypoxie <sup>170</sup>. L'hypoxie stimule la production du facteur de transcription HIF (*hypoxia-inducible transcription factor*) <sup>171, 172</sup>. Cette protéine coordonne la stimulation de facteurs de croissance comme les VEGF, l'angiopoïétine-2, le PDGF, le TGF- $\beta$  et d'autres molécules. Expérimentalement, les tumeurs n'ayant pas de HIF n'expriment pas le VEGF et ne développent pas de vascularisation <sup>173</sup>. En effet, il a été montré que le VEGF joue un rôle déterminant dans la réponse angiogène survenant après une ischémie du membre inférieur dans un modèle murin, le blocage de ce facteur entraînant une réduction significative du nombre de néovaisseaux et une altération de la récupération du flux sanguin <sup>174</sup>. De plus, il joue un rôle dans la cicatrisation, la rétinopathie proliférative <sup>175</sup> et la progression tumorale <sup>176</sup>.

De façon analogue à son effet sur les propriétés angiogènes des CE matures, le VEGF module celles des PEC. En effet, Dragoni *et al* ont montré que le VEGF stimule la prolifération et la tubulogénèse des ECFC en provoquant des oscillations de la concentration intracellulaire en Ca<sup>2+</sup> et en activant le NF $\kappa$ B <sup>177</sup>. L'équipe de Guan a également montré que le VEGF (à 50 ng/mL) augmentait la prolifération des PEC, en potentialisant l'activité enzymatique de la calcineurine, en activant NFAT2 (*nuclear factor of activated T-cells*), de même que l'expression de la eNOS et donc la production de NO <sup>178</sup>. Par ailleurs, notre équipe a déjà montré que le VEGF stimule la migration des ECFC de façon dose-dépendante (pour les doses 10, 50 et 100 ng/mL) <sup>179</sup>. De plus l'effet chimiotactique vis-à-vis du VEGF est significativement plus important pour les ECFC cultivés pendant 5 semaines comparé aux ECFC cultivés pendant 3 semaines, dû à une augmentation de l'expression du VEGFR2 <sup>179</sup>.

Les 3 récepteurs au VEGF sont présents à la surface des CE et des cellules souches hématopoïétiques <sup>180</sup>. Ils sont constitués de 7 domaines extracellulaires, d'une région transmembranaire et d'un domaine intracytoplasmique tyrosine kinase. Par ailleurs, notre équipe a également vérifié que les ECFC expriment les ARN messagers des 3 VEGFR <sup>179</sup>.

### *VEGFR et vasculogénèse post-natale*

#### VEGFR1.

Son rôle exact est controversé : le VEGFR1 a des propriétés différentes chez l'adulte et chez l'embryon, sur les CE et les cellules issues de la moelle osseuse. Au niveau embryonnaire, les souris VEGFR1<sup>-/-</sup> meurent, *in utero*, aux alentours du neuvième jour de gestation <sup>181</sup>. Les CE sont développées mais non organisées en réseau vasculaire. Une prolifération excessive des cellules vasculogéniques est responsable de la mortalité suggérant un rôle de régulateur négatif du VEGFR1 lors de l'embryogenèse <sup>182</sup>. Son action est liée à une diminution du VEGF disponible dans l'espace intercellulaire par compétition entre les 2 récepteurs VEGFR1 et 2. L'hypothèse a été confirmée par une étude sur des souris transgéniques ayant un VEGFR-1 dépourvu d'activité tyrosine kinase qui se sont développées normalement sans aucune anomalie du réseau vasculaire <sup>183</sup>. Hiratsuka *et al* ont donc également proposé en 2001 (comme Fong *et al* en 1999) que le VEGFR1 avait un rôle de régulateur négatif de la vasculogénèse en séquestrant le VEGF, étant donné sa faible activité tyrosine kinase. En effet, la perte totale de VEGFR1 conduit à une désorganisation du

développement vasculaire normal, mais la délétion ciblée de son domaine tyrosine kinase n'empêche pas la vasculogenèse / angiogenèse normales chez l'embryon <sup>184</sup>. L'effet inhibiteur est d'autant plus important qu'il existe des formes solubles de VEGFR1 sécrétées (sVEGFR1). Cependant, dans la vie adulte, le VEGFR1 pourrait agir comme un régulateur positif de l'angiogenèse, et le PlGF a été décrit comme potentialisant la réponse au VEGF dans l'angiogenèse pathologique mais pas dans l'angiogenèse physiologique <sup>185</sup>. Le VEGFR1, après activation par le VEGF, favorise la migration des monocytes et leur expression de facteur tissulaire <sup>186</sup>.

Les études récentes montrent que le rôle pro- ou anti-angiogène du VEGFR1 reste un sujet de débat, et qu'il dépend de l'agoniste activateur, du type cellulaire concerné et de la période de développement de l'organisme.

L'implication du VEGFR1 dans la biologie des ECFC sera notamment abordée dans l'un des travaux présentés dans cette thèse.

### VEGFR2.

Il joue un rôle clé dans le développement de l'angiogenèse et de l'hématopoïèse <sup>187</sup>. C'est le médiateur majeur de l'effet mitogène, angiogène et de perméabilité vasculaire du VEGF. Il a été isolé la première fois en 1991 et nommé KDR (*kinase insert domain containing receptor*) ou Flk-1 (chez la souris). La transduction du signal via le VEGFR2 entraîne de très nombreuses propriétés biologiques et intervient notamment dans la survie et la prolifération des CE <sup>188</sup>, dans la migration cellulaire <sup>189</sup> ou encore dans la libération de NO <sup>187</sup>. Le VEGFR2 est également impliqué dans l'amélioration des propriétés migratoire et de différenciation des ECFC durant leur expansion <sup>179</sup>.

### VEGFR3.

Ce récepteur ne se lie pas au VEGF-A mais aux VEGF-C et VEGF-D, il est impliqué surtout dans la lymphangiogenèse, mais aurait un rôle au stade embryonnaire dans la formation des vaisseaux sanguins. En effet, le VEGFR3 s'exprime d'abord dans les vaisseaux sanguins et semble indispensable au remodelage des premiers capillaires en vrais vaisseaux aux tailles hiérarchisées <sup>190</sup>. A la naissance et à l'âge adulte, son expression est retrouvée majoritairement au niveau des gros vaisseaux lymphatiques.

Salven *et al* ont décrit en 2003 une population de PEC, plus précisément de précurseurs endothéliaux lymphatiques et/ou vasculaires, CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>/VEGFR3<sup>+</sup>, capable de se différencier en CE matures, jouant probablement un rôle dans la lymphangiogenèse et/ou l'angiogenèse post-natale <sup>191</sup>.

### Neuropiline.

La neuropiline est une protéine transmembranaire qui a été tout d'abord mise en évidence comme un récepteur à une sémaphorine de classe III permettant d'inhiber la guidance neuronale. Puis la neuropiline s'est avérée être un récepteur qui fixe le VEGF-A<sub>165</sub>, le VEGF-E, le PlGF et le VEGF-B. La neuropiline est un corécepteur du VEGF<sub>165</sub>, elle potentialise et augmente l'activité produite par la liaison du VEGF<sub>165</sub> au VEGFR2 en facilitant le signal du récepteur tyrosine kinase. De même, elle peut servir de corécepteur du VEGF<sub>165</sub> avec le VEGFR1. Il existe deux types de neuropiline (NRP), la NRP-1 et la NRP-2, qui sont des marqueurs fonctionnels respectivement de l'endothélium artériel et veineux/lymphatique (pour revue <sup>192</sup>). Le rôle de la neuropiline dans l'angiogenèse est indiscutable, les souris NRP-1<sup>-/-</sup> mourant *in utero* avec des malformations cardiovasculaires importantes. De plus, les

souris surexprimant la NRP-1 développent une formation excessive de capillaires et de vaisseaux sanguins suivie d'hémorragies létales<sup>193</sup>. La NRP-1 est retrouvée au niveau de l'utérus adulte ainsi qu'au niveau de la néovascularisation des membres blessés. L'équipe du Dr. Anne Eichmann a également mis en évidence un rôle primordial de la NRP-2 dans la formation des petits vaisseaux lymphatiques<sup>194</sup>.

L'activation de la PKA (*Protein Kinase A*) des progéniteurs vasculaires, cellules Flk-1<sup>+</sup> dérivées de cellules souches embryonnaires capables de se différencier en CE ou en cellules murales<sup>195</sup>, induit la formation d'un complexe VEGF<sub>165</sub>/Flk-1/NRP-1 favorisant ainsi leur différenciation en CE. Cette induction d'expression de Flk-1 et NRP-1 augmentant la sensibilité au VEGF de ces progéniteurs vasculaires<sup>196</sup>.

### *Angiopoïétines et vasculogénèse post-natale*

L'angiopoïétine-1 (Ang-1), le ligand du récepteur Tie-2, induit le recrutement des CE dans la paroi vasculaire par les péricytes et des CML<sup>197, 198</sup>. L'angiopoïétine-2 (Ang-2) est aussi un ligand de Tie-2. Elle bloque l'activation de Tie-2 induite par l'angiopoïétine-1 et agirait donc comme un antagoniste naturel<sup>199</sup>. Elle potentialise le VEGF pour induire l'angiogénèse en empêchant que l'angiopoïétine-1 maintienne l'intégrité de l'endothélium et sa quiescence. L'angiopoïétine-2 serait incapable, à elle seule, d'induire l'angiogénèse<sup>200</sup>. Les angiopoïétines sont sécrétées par des cellules périvasculaires et agissent via leurs récepteurs sur les CE. L'angiopoïétine-1 pourrait agir de façon paracrine lors de l'ontogénèse des vaisseaux et l'angiopoïétine-2 pourrait intervenir dans le processus de stabilisation du vaisseau lors de phénomènes d'angiogénèse physiologique chez l'adulte<sup>201, 202</sup>.

En 2005 Gill & Brindle ont démontré que l'Ang-2 stimule la migration des PEC alors qu'elle n'affecte pas la migration des CE matures, et qu'elle augmente l'adhésion entre les PEC et les CE matures<sup>203</sup>. Une équipe coréenne a ensuite montré que l'Ang-2 stimule significativement la tubulogénèse, la migration chimiotactique et la survie des ECFC, à un niveau comparable à l'Ang-1, alors que cet effet pro-angiogène de l'Ang-2 n'est pas retrouvé avec les HUVEC. Cet effet biologique de l'Ang-2 dans les ECFC est médié par la voie de signalisation Tie2, et inhibé dans les HUVEC par la formation de l'hétérocomplexe Tie1/Tie2<sup>204</sup>. In vivo, l'Ang-2 augmente la néovascularisation d'implants de gel de MEC contenant les ECFC<sup>204</sup>.

Notre équipe a montré que les ECFC expriment les ARN messagers de Tie-2 et Ang-2 à des taux élevés, et ceux de Ang-1 à des taux moindres. L'Ang-1, contrairement à l'Ang-2, est impliquée dans l'apparition des colonies d'ECFC en culture, sans influence de l'activation du PAR-1. La prolifération des ECFC induite par l'activation du PAR-1 quant à elle, implique l'Ang-2. De plus, la migration chimiotactique des ECFC vis-à-vis de l'Ang-1 est augmentée lors de l'activation du PAR-1, mais de manière non spécifique<sup>205</sup>. Plus récemment, Kebir *et al* ont montré que l'isoforme courte du CD146 (shCD146) améliore les propriétés pro-angiogènes des ECFC. En effet, ils ont observé que le shCD146 est surexprimé dans les ECFC comparativement aux CE matures, et que son expression est stimulé par le VEGF et le SDF-1. Ce shCD146 est impliqué dans l'adhésion, la migration et la prolifération des ECFC et induit en parallèle la sécrétion d'interleukine-8 et d'Ang-2 par les ECFC ayant un effet pro-angiogène paracrine sur les HUVEC (augmentation de leur prolifération et leur migration). De plus, les ECFC surexprimant de façon transitoire le shCD146, améliorent la revascularisation de membre ischémié dans le modèle murin d'ischémie du membre inférieur<sup>206</sup>. Dans l'ensemble, l'Ang-2 est impliquée dans la prolifération des ECFC induite

par l'activation du PAR-1 (effet autocrine), mais également dans la prolifération et la migration des CE matures lorsque l'Ang-2 est sécrétée par les ECFC (effet paracrine).

### *SDF-1 et vasculogenèse post-natale*

Le SDF-1 (*Stromal-derived Factor 1*) ou CXCL12 est un membre de la famille des chimiokines de type CXC. SDF-1 a été initialement décrit comme un produit sécrété par les cellules de la moelle osseuse (*bone marrow stromal cell line*). Contrairement aux chimiokines de type CC qui induisent le recrutement d'un large spectre de leucocytes, les chimiokines de la famille CXC activent préférentiellement les neutrophiles et les lymphocytes T. SDF-1 participe à la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques (CSH) et des cellules CD34<sup>+</sup><sup>207</sup>. Des souris invalidées pour le gène *Cxcl12* présentent d'importantes anomalies des processus de lymphopoïèse et de myélopoïèse. L'inactivation du gène *Cxcl12* montre que cette chimiokine joue également un rôle dans le développement cardiaque<sup>208, 209</sup>. Il existe deux variants d'épissage qui codent pour SDF-1 $\alpha$  (68 résidus) et SDF-1 $\beta$  (72 résidus), la différence entre ces deux variants se situant au niveau des 4 résidus de l'extrémité carboxy-terminale. Ces deux protéines sont les deux seuls ligands endogènes connus pour CXCR4. CXCR4 est exprimé par un spectre de cellules hématopoïétiques relativement large incluant les neutrophiles, les monocytes, les lymphocytes B et T, les précurseurs des lymphocytes B, les macrophages, les cellules de Langerhans. Il est également exprimé à des niveaux très élevés dans les cellules souches hématopoïétiques<sup>210</sup>, les CE du système vasculaire et dans les neurones du système périphérique ou central. CXCR4 est également exprimé sur les cellules dendritiques immatures, les progéniteurs des cellules B de la moelle osseuse et le cerveau embryonnaire (pour revue<sup>211</sup>).

Les principaux rôles physiologiques du complexe SDF-1/CXCR4 sont l'activation, la migration et le recrutement des lymphocytes T, l'hématopoïèse, le développement ou encore l'embryogenèse. En plus de son rôle dans le chimiotactisme des lymphocytes T, le complexe SDF-1/CXCR4 est impliqué dans le développement des cellules B. Ceci est mis en évidence chez les souris invalidées pour ces deux gènes : 50 % des embryons homozygotes *Cxcl12*<sup>-/-</sup> meurent dans les 15 premiers jours de l'embryogenèse et les autres meurent dans les heures suivant la naissance à cause du déficit immunitaire profond et des anomalies de développement cardiaque (les animaux présentent notamment de sévères déficits au niveau du septum ventriculaire). Les animaux invalidés pour le gène *Cxcr4* ont des anomalies du système vasculaire et gastro-intestinal et des malformations du tissu cérébelleux. CXCR4, tout comme SDF-1, semble donc vital, en tout cas chez la souris (pour revue<sup>212</sup>). Ces résultats suggèrent que ce complexe est unique *in vivo*. Néanmoins, les fonctions de CXCR4 chez l'adulte ne sont pas clairement définies. SDF-1 est sécrété par l'endothélium vasculaire, présent à la surface des cellules de l'endothélium et dans le cytoplasme<sup>213</sup>. Son expression est régulée par le VEGF et le FGF-2. *In vitro*, SDF-1 présente une activité chimioattractante puissante sur plusieurs cellules et en particulier les cellules CD34<sup>+</sup>, dont les CSH<sup>214</sup> et les CE matures<sup>215</sup>. Il potentialise la formation de structures tubulaires sur Matrigel® à partir des CE matures<sup>213</sup>. Enfin, le CXCR-4 peut servir de co-récepteur au virus du VIH, en interagissant directement avec la gp120 après que celle-ci ait interagi avec la molécule CD4. Son signal permettrait l'entrée dans la cellule du virus VIH<sup>216</sup>.

En 2005 notre équipe a montré que l'activation du PAR-1 des ECFC améliore leurs propriétés angiogènes via la signalisation SDF-1/CXCR4. En effet, l'activation du PAR-1 augmente significativement les niveaux d'ARN messagers de SDF-1 et CXCR4. De plus, la migration

chimiotactique vis-à-vis du SDF-1 est augmentée lors de l'activation du PAR-1 via une augmentation d'expression du CXCR4 à la surface cellulaire des ECFC. La tubulogenèse des ECFC induite par l'activation du PAR-1 est également dépendante de la voie SDF-1/CXCR4<sup>217</sup>.

#### *FGF et vasculogenèse post-natale*

Chez les vertébrés, la famille des FGF comporte au moins 24 membres et 4 récepteurs de haute affinité (FGFR). Les deux molécules les plus représentatives et les mieux connues sont le FGF-1 (aFGF ou *acidic fibroblast growth factor*)<sup>218</sup> et le FGF-2 (bFGF ou *basic fibroblast growth factor*)<sup>219</sup>. Les quatre récepteurs cellulaires actuellement connus possèdent trois domaines immunoglobulines extracellulaires et deux domaines kinases intracellulaires. Seuls les récepteurs FGFR-1 (flg) et FGFR-2 (bek) sont présents à la surface des CE. Le FGF2 est un agent pro-angiogène puissant *in vitro* et *in vivo* (pour revue<sup>220</sup>). Bien que son expression tissulaire soit augmentée dans les modèles d'ischémie<sup>221</sup>, il ne semble pas être directement stimulé par l'hypoxie<sup>222</sup>. Il a été également montré que l'effet pro-angiogène du FGF est retrouvé dans les tissus ischémiques, aussi bien au niveau du myocarde qu'au niveau des tissus périphériques. Il participe aux différentes étapes aboutissant à la formation des néovaisseaux. Il stimule, d'une part, la production et le relargage d'enzymes nécessaires à la dégradation de la membrane basale et de la MEC (protéases, activateurs du plasminogène, métalloprotéases), prélude indispensable à la prolifération et à la migration des CE. Il participe, d'autre part, aux phénomènes de prolifération et d'organisation des CE en microtubules<sup>223</sup>. Plus tard, en 2001, il a été mis en évidence que le FGF-1 pouvait être libéré dans des conditions d'hypoxie<sup>224</sup>. Notre équipe a montré en 2005 que les ECFC issus de sang de cordons ombilicaux humains présentent un potentiel de prolifération et de tubulogenèse significativement plus important que celui de CE matures (HUVEC) en présence de FGF-2<sup>225</sup>.

#### *Ephrines et vasculogenèse post-natale*

Les récepteurs Eph (*Erythropoietin-producing human hepatocellular carcinoma*) et leurs ligands éphrines sont des protéines membranaires qui sont classés en 2 grands sous-groupes, A et B, en fonction de leurs homologies de structure et de leurs spécificités de liaison. Les récepteurs Eph appartiennent à la grande famille des récepteurs tyrosine kinases et ils s'autophosphorylent lors de la liaison à leurs ligands éphrines apparentés. Les ligands éphrine-B sont des protéines transmembranaires qui se lient de préférence aux récepteurs de la sous-classe EphB. Initialement identifié comme des molécules de guidage des neurones, les récepteurs Eph et les éphrines sont également exprimées par un certain nombre de cellules non neuronales, y compris les CE, les cellules hématopoïétiques et les cellules tumorales<sup>226</sup>. Pendant les premiers stades du développement vasculaire, EphB4 est exprimé spécifiquement dans l'endothélium veineux alors que l'éphrine-B2 est exprimé dans l'endothélium artériel<sup>227</sup>. Des études chez des embryons de souris ont montré que ces 2 protéines sont essentielles pour le développement du cœur embryonnaire et pour l'angiogenèse. En effet, des mutations « nulles » ciblées dans les gènes codant EphB4 et éphrine-B2 provoquent une létalité embryonnaire avec des défauts dans le remodelage du réseau vasculaire périphérique et celui de la trabéculatation du myocarde<sup>227-229</sup>. L'interaction entre les récepteurs Eph et les éphrines nécessite des contacts cellule-cellule car les deux

molécules sont ancrées à la membrane plasmique. La signalisation résultante se propage de façon bidirectionnelle à la fois dans les cellules exprimant le récepteur Eph (signalisation « aller ») et celles exprimant l'éphrine (signalisation « retour »). L'interaction entre EphB4 et éphrine-B2 semble jouer un rôle important non seulement dans les interactions cellule-cellule et cellule-MEC, mais aussi dans la migration, l'adhésion et la prolifération cellulaires<sup>230</sup>.

Outre le rôle des éphrines dans la différenciation artério-veineuse via leurs différents profils d'expression par les CE, leur implication dans la vasculogénèse post-natale a également été exploré. En effet, Foubert *et al* ont vérifié que les PEC expriment EphB4 et l'éphrine-B2. Ils ont ensuite montré que l'activation des PEC humains par la protéine chimérique éphrine-B2-Fc augmentait leur potentiel de revascularisation dans le modèle d'ischémie du membre inférieur chez la souris Nude, via l'induction de l'expression de la PSGL-1 (*P selectin glycoprotein ligand-1*) et son adhésion à la E-sélectine et la P-sélectine<sup>231</sup>.

### *TGF-β1 et vasculogénèse post-natale*

Une analyse de la littérature actuelle montre qu'il y existe davantage de données disponibles concernant les relations entre le TGF-β1 (*transforming growth factor-β1*) et la vasculogénèse post-natale médiée par les PEC par rapport aux données disponibles concernant la TSP-1 (thrombospondine-1) et les PEC, même si au travers de ces études les cellules utilisées sous la dénomination de « progéniteurs endothéliaux » ne sont pas homogènes.

Une étude intéressante de l'équipe de Stefanie Dimmeler a initialement décrit les effets pro-angiogènes du TGF-β1 sur les PEC<sup>232</sup>. Dans cette étude des sérums de patients polytraumatisés ont été testés *in vitro* sur des PEC issus de cellules mononucléées de sang périphérique (PBMC). Après 72 heures de culture de PBMC en présence de sérum de patients polytraumatisés, une augmentation significative du nombre de PEC obtenu à 5 jours est observée. De plus ces sérums améliorent le potentiel de différenciation des PEC en pseudotubes dans le Matrigel®, avec une augmentation d'expression génique de *TGF-β1-R1* & *-R2* et de *VEGFR2*, ainsi qu'au niveau protéique (expression en surface du VEGFR2 évaluée par cytométrie en flux). L'addition au milieu de culture des PBMC, de VEGF recombinant (10 ng/mL) ou de TGF-β1 recombinant en faible concentration (0.1 ng/mL), augmente également le nombre de PEC. Cependant de fortes concentrations de TGF-β1 recombinant (10 ng/mL) le diminuent. Par ailleurs ce potentiel de différenciation des PBMC en PEC est aboli lorsque que sont ajoutés des anticorps bloquants anti-VEGF et anti-TGF-β1 aux sérums des patients polytraumatisés<sup>232</sup>.

Dans un système de support pour la culture d'un tissu monocellulaire, utilisable pour le remplacement de valve / reconstruction en médecine réparatrice cardiovasculaire, une équipe a étudié le comportement des PEC en réponse au TGF-β1<sup>233</sup>. En présence de TGF-β1, les supports (acide polyglycolique / poly-4-hydroxybutyrate)ensemencés de PEC conduisent à la formation d'un tissu plus dense, plus homogène et plus organisé qu'en l'absence de TGF-β1. Le TGF-β1 stimule également la synthèse de matrice extracellulaire (collagènes, fibronectine et laminine), l'expression de CD31 et d'α-SMA, ainsi que la prolifération et l'apoptose des PEC. Les PEC semblent donc acquérir dans ce contexte un phénotype mésenchymateux propice à la réparation tissulaire<sup>233</sup>.

L'équipe de K.-i. Kikuta a montré que l'exposition au TGF-β1 pendant 7 jours entraînait la transdifférenciation de PEC issus de moelle osseuse de rats vers un phénotype de CML, via le

TGF- $\beta$  RII et la phosphorylation de Smad2. De plus le traitement par TGF- $\beta$ 1 à 0.5 ng/mL et 5 ng/mL augmente significativement la prolifération des PEC par rapport aux PEC non traités<sup>234</sup>.

Une des publications présentées dans cette thèse expose plus particulièrement les effets du TGF- $\beta$ 1 sur les propriétés angiogènes des ECFC.

### *PlGF et vasculogénèse post-natale*

Il existe actuellement peu de données concernant le PlGF et la vasculogénèse post-natale dans le contexte physiologique, la majeure partie de la littérature sur le PlGF en faisant la description dans le contexte de l'angiogénèse pathologique. En effet, à l'origine le PlGF a été rapporté comme étant impliqué physiologiquement dans l'angiogénèse placentaire<sup>235, 236</sup>, les études ultérieures ayant plutôt insisté sur son rôle dans l'angiogénèse tumorale.

Notamment, dans le contexte de la tumorigénèse, il a été démontré que le VEGF-A et le PlGF favorisent la vasculogénèse tumorale dans un modèle de mélanome murin, que le VEGFR1/FLT1 permet le recrutement de PEC au site de tumorigénèse, que des anticorps bloquant les VEGFR1 & 2 préviennent la formation par les PEC de vaisseaux dans la tumeur, et que autant le PlGF que le VEGF stimulent la migration *in vitro* des PEC, ce phénomène étant médié par les 2 récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 dans les PEC contrairement aux CE différenciées<sup>32</sup>.

Dans un autre contexte, en pathologie cardiovasculaire, il a été montré que le PlGF était rapidement sécrété par les CE dans la phase aigüe de l'infarctus du myocarde. Le PlGF dans ce contexte pourrait être surexprimé afin de compenser les lésions ischémiques aigües, et semble améliorer la fraction d'éjection ventriculaire gauche en phase chronique<sup>237</sup>. Le PlGF recombinant humain a ensuite été testé comme traitement dans un modèle murin d'infarctus aigu du myocarde. Ces expériences ont montré une augmentation du taux de survie après l'infarctus, ainsi qu'une fonction cardiaque préservée par rapport aux souris contrôle. De plus, les auteurs ont observé une augmentation significative des cellules CD31<sup>+</sup> et des vaisseaux  $\alpha$ SMA<sup>+</sup> dans la zone infarctée, ainsi qu'une mobilisation des PEC murins (cellules Flk-1<sup>+</sup> et Sca-1<sup>+</sup>) dans le sang périphérique chez les souris du groupe traité<sup>238</sup>. Sur la base de ce type de données, des essais de thérapie cellulaire ont été effectués sur un modèle porcin d'infarctus du myocarde. Des PEC autologues et des cellules souches mésenchymateuses (MSC) allogéniques ont été injectés 1 semaine après l'infarctus, et les différents paramètres d'étude ont été mesurés à 1 semaine et 7 semaines de l'infarctus. Au niveau hémodynamique intracardiaque, le volume télésystolique a été retrouvé significativement augmenté dans les groupes MSC et contrôle par rapport au groupe PEC, et la même tendance est retrouvée pour le volume télédiastolique. La zone infarctée quant à elle était significativement réduite dans le groupe PEC comparé aux groupes MSC et contrôle, avec une densité vasculaire plus importante. De plus dans ce contexte, ces ECFC sécrètent des taux significativement plus importants de PlGF par rapport aux MSC, et sont retrouvés incorporés dans les néovaisseaux formés *in vivo*. Les auteurs concluent que l'injection d'ECFC après l'infarctus aigu du myocarde améliore le remodelage myocardique en stimulant la néovascularisation mais ne participent pas à la cardiomyogénèse. L'injection d'ECFC autologues ne stimule pas la récupération de la fonction globale du ventricule gauche mais prévient l'expansion délétère de son volume<sup>239</sup>.

Dans le domaine de la réparation tissulaire par technologies de génie tissulaire, l'équipe de Luttun a introduit des ECFC humains dans un feuillet de fibroblastes dermiques humains auto-assemblés, destiné à être utilisé comme substitut dermique avec un potentiel vasculaire inhérent <sup>240</sup>. Dans cette construction, les ECFC à la différence des HUVEC, améliorent l'organisation de la matrice (organisation des fibres de collagène, contraction et vascularisation de la cicatrice), et la ré-épithélialisation du feuillet de fibroblastes dermiques dans la lésion cicatricielle. Par ailleurs, le milieu conditionné issu de la culture d'ECFC, de même que l'oxygène, stimule le potentiel prolifératif et migratoire des kératinocytes. Le PIGF sécrété par les ECFC possède un effet autocrine stimulant la prolifération des ECFC, ainsi qu'un effet paracrine stimulant la prolifération et la migration de kératinocytes. Tous ces effets entre fibroblastes, kératinocytes et ECFC sont dus à un « *crosstalk* » via les facteurs de croissance dont le PIGF, afin de court-circuiter l'hypoxie <sup>240</sup>.

L'étude du mécanisme du « *crosstalk* » entre ECFC et MSC après stimulation par le BMP-2 humain recombinant (rhBMP-2) a également mis en évidence le rôle du PIGF <sup>241</sup>. Le rhBMP-2 ne modifie pas la viabilité des ECFC mais induit une activation dose-dépendante du chimiotactisme. En revanche le rhBMP-2 stimule la prolifération des MSC humaines, et l'incubation des ECFC avec les surnageants de culture des MSC augmente significativement la viabilité des ECFC, grâce au PIGF dont la synthèse par les MSC est stimulée par le rhBMP-2. Les cellules cancéreuses sécrétant du BMP-2 et le stroma tumoral comportant des MSC, les auteurs concluent que le BMP-2 favorise l'angiogenèse tumorale par un effet chimioattractant sur les ECFC circulant dans le sang périphérique et en augmentant la sécrétion de PIGF par les MSC <sup>241</sup>.

Les effets spécifiques du PIGF sur les propriétés angiogènes des ECFC sont exposés dans une des publications présentées dans cette thèse.

<b>Activateurs de l'angiogenèse</b>	<b>fonctions</b>
Membres de la famille du VEGF	Stimulent l'angio/vasculogenèse, la perméabilité, l'adhésion des leucocytes
VEGFR, NRP-1	Intègrent les signaux angiogènes et de survie
Ang-1 & Tie-2	Stabilisent les vaisseaux, inhibent la perméabilité
PDGF-BB & récepteurs	Recrutement des cellules musculaires lisses
TGF- $\beta$ 1, Endogline, récepteurs au TGF- $\beta$	Stimulent la production de matrice extracellulaire
FGF, HGF, MCP-1	Stimulent l'angio/artériogenèse
Intégrines $\alpha_v\beta_3$ , $\alpha_v\beta_5$ , $\alpha_5\beta_1$	Récepteurs pour les macromolécules et les protéases de la matrice
VE-Cadhérine, PECAM (CD31)	Molécules de jonction endothéliale
Ephrines	Régulent la spécification artérielle/veineuse
Activateurs du plasminogène, MMPS	Remodelage de la matrice, libèrent et activent des facteurs de croissance
PAI-1	Stabilise le néovaisseau
NOS ; COX-2	Stimulent l'angiogenèse et la vasodilatation
AC133	Régule la différenciation de l'angioblaste (cellule vasculogénique)
Chimiokines	Rôle pléiotropique dans l'angiogenèse
Id1/Id3	Détermine la plasticité endothéliale

Tableau 2 : Principales molécules pro-angiogènes, sans distinction entre les cibles cellulaires. Adapté de Carmeliet P et al, Nature 2000;407:249-257

#### 1.3.2.2.2. Facteurs anti-angiogènes

##### *sVEGFR1*

L'effet anti-angiogène du VEGFR1 soluble est actuellement bien reconnu<sup>242-244</sup>, mais il n'y a pas encore d'étude disponible dans la littérature concernant la biologie des ECFC et le sVEGFR1. Cependant l'effet biologique du sVEGFR1 peut être supposé étendu à toute la lignée endothéliale, à partir du stade de différenciation où apparaissent les différents VEGFR.

##### *sNRP-1*

L'effet anti-angiogène de la NRP-1 soluble a été décrit en 2000 par Gagnon *et al* : la sNRP-1 inhibe la liaison du VEGF<sub>165</sub> aux CE et tumorales, et donc la phosphorylation de la tyrosine du KDR induite par le VEGF<sub>165</sub><sup>245</sup>. De façon intéressante, dans un modèle murin d'expression ectopique au niveau dermique de la sNRP-1, les auteurs ont observé une réduction de la perméabilité vasculaire induite par le VEGF<sub>165</sub>, le VEGF<sub>121</sub> et le PAF (*Platelet activating factor*), cet effet ayant été démontré comme étant non spécifique de l'agent perméabilisant<sup>246</sup>. La sNRP-1 permet également de résorber l'inflammation et l'œdème induits par la surexpression de VEGF dans les réactions d'hypersensibilité retardée cutanée<sup>246</sup>. Comme pour le sVEGFR1, la littérature actuelle ne fait pas état d'étude spécifique sur la biologie des ECFC et la sNRP-1, mais son effet peut être également supposé étendu à toute la lignée endothéliale.

##### *PEDF et vasculogénèse post-natale*

Le PEDF (*Pigment Epithelium Derived Factor*) est une glycoprotéine de 50 kDa sécrétée qui a d'abord été identifiée comme un facteur neurotrophique, purifié à partir du milieu conditionné de cultures de cellules épithéliales pigmentaires de la rétine<sup>247</sup>. Il possède de multiples activités biologiques<sup>248-252</sup>, y compris une puissante activité anti-angiogène, capable d'inhiber la néovascularisation pathologique, tels que la néovascularisation rétinienne qui se produit au cours de la rétinopathie diabétique proliférative<sup>249, 251, 252</sup>. Ce PEDF est capable d'interagir avec les PEC, et ces cellules peuvent en sécréter.

De façon intéressante, Wang *et al* ont pu obtenir des ECFC à partir de cellules mésenchymateuses isolées de gelée de Wharton<sup>253</sup>. Dans leur modèle murin de lésion endothéliale, ces ECFC permettent une rapide ré-endothélialisation et inhibent l'hyperplasie néo-intimale. Par ailleurs, le milieu conditionné de ces ECFC issus de gelée de Wharton présente une forte capacité d'inhibition de la migration et de la prolifération des CML, abolie par des anticorps anti-PEDF ou par ARN interférence dirigée contre le PEDF. Ce PEDF sécrété par ces ECFC aurait donc un effet paracrine qui pourrait limiter les phénomènes de resténose observés après certaines procédures de revascularisation comme les angioplasties ou les poses de *stents*<sup>253</sup>.

Dans un modèle murin (souris transgéniques avec une expression de la GFP dépendante du promoteur de Tie2) de rétinopathie induite par l'oxygène, définie par une néovascularisation pathologique de la rétine, Longeras *et al* ont étudié les effets du peptide de 34 acides aminés

correspondant à la partie N-terminale du PEDF<sup>254</sup>. Ils ont d'abord vérifié que ce peptide inhibe la prolifération et induit l'apoptose de CE matures, et qu'il inhibe la formation de nouveaux vaisseaux *in vivo* dans le modèle de membrane chorioallantoïque de poulet. Ils démontrent ensuite que ce peptide inhibe la néovascularisation pathologique de la rétine, et qu'il diminue la mobilisation de PEC (Tie2-GFP<sup>+</sup>, Dil-Ac-LDL<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup>) dérivés de la moelle osseuse, mobilisation qui correspond au pic de progression de cette néovascularisation<sup>254</sup>.

Ce PEDF se présente donc comme une protéine anti-angiogène capable d'inhiber la vasculogenèse post-natale.

### *TSP-1 et vasculogenèse post-natale*

Dans la littérature actuelle, peu de données sont disponibles concernant l'étude de l'effet de la thrombospondine-1 sur les propriétés angiogènes des progéniteurs endothéliaux, même si l'effet de la TSP-1 sur les CE différenciées a été beaucoup plus largement étudié. Cependant une équipe a exploré l'effet du diabète sur la ré-endothélialisation post-lésion artérielle médiée par les PEC, en émettant l'hypothèse que le diabète retarde cette ré-endothélialisation<sup>255</sup>. Chez les souris diabétiques cette ré-endothélialisation est effectivement diminuée dans le modèle de carotide dénudée. Les souris non diabétiques transplantées avec la moelle osseuse de souris diabétique ont également une ré-endothélialisation diminuée. Les PEC issus de souris diabétiques injectés après la lésion artérielle ont une capacité diminuée à être recrutés au niveau du néoendothélium, comparés aux PEC de souris non diabétiques, quelque soit le statut de la souris receveuse (diabétique ou non). *In vitro*, les PEC issus de souris diabétiques présentent des capacités adhésives et migratoires diminuées. L'expression du VEGF et de la eNOS est également diminuée dans les PEC de souris diabétiques, et en particulier, l'ARNm de la TSP-1 a été retrouvé significativement surexprimé, associé à une diminution de l'activité adhésive de ces PEC de souris diabétiques aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Globalement, cette équipe observe un défaut de ré-endothélialisation attribué à un fonctionnement altéré des PEC, impliquant la TSP-1, dans le diabète<sup>255</sup>. Cependant les PEC évalués dans ces travaux correspondent à des CFU-EC d'après les méthodes d'isolation en culture, et des études supplémentaires restent donc à réaliser pour décrypter les effets de la TSP-1 sur la vasculogenèse post-natale médiée en particulier par les ECFC. Un des travaux présentés dans cette thèse contribue à cette compréhension.

<b><i>Inhibiteurs de l'angiogenèse</i></b>	<b><i>fonctions</i></b>
sVEGFR1, sNRP-1	Epurateur pour VEGF, VEGF-B, PlGF
Ang-2	Antagoniste de l'Ang-1
TSP-1,-2	Inhibent la migration, la croissance, l'adhésion et la survie endothéliale
Angiostatine et les domaines « kringles » correspondants	Suppriment l'angiogenèse tumorale
Endostatine (fragment du collagène XVIII)	Inhibe la survie et la migration endothéliale
Vasostatine ; Calréticuline	Inhibent la croissance endothéliale
PF4	Inhibe la liaison du bFGF et du VEGF
TIMPs ; inhibiteurs de MMP ; PEX	Supprime l'angiogenèse pathologique
Meth-1 ; Meth-2	Inhibiteurs contenant des MMPs, TSP et domaines « <i>disintegrin</i> »
IFN- $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ ; IP-10, IL-4, IL-12, IL-18	Inhibe la migration endothéliale, régule négativement le bFGF
Kringle-2 de la prothrombine ; fragment de l'antithrombine	Suppriment la croissance endothéliale
Prolactine ( $M_r$ , 16K)	Inhibe bFGF/VEGF
VEGI	Module la croissance cellulaire
Fragment du SPARC	Inhibe la liaison endothéliale et l'activité du VEGF
Fragment de l'ostéopontine	Interfère avec la signalisation des intégrines
Maspine	Inhibiteur de protéase
PEDF	Inhibe la prolifération et la migration des CE et des CML
Canstatine, <i>Proliferin-related protein</i> , Restine	Mécanismes inconnus

Tableau 3 : Principales molécules anti-angiogènes, sans distinction entre les cibles cellulaires. Adapté de Carmeliet P et al, Nature 2000; 407:249-257

### 1.3.3. Rôles des progéniteurs endothéliaux humains en pathologies humaines

En plus des facteurs de risque cardiovasculaire, plusieurs pathologies cardiovasculaires ont été associées à un nombre de PEC et une fonctionnalité diminués<sup>256, 257</sup>. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, le nombre de PEC est inversement corrélé avec les facteurs de risque classique d'athérosclérose<sup>36, 102</sup>. De plus, les PEC isolés chez les patients coronariens présentent des capacités migratoires inversement corrélées avec le nombre de facteurs de risque cardiovasculaire<sup>102</sup>. L'équipe de Hill a montré une corrélation<sup>36</sup> forte entre le nombre de PEC et la présence de facteurs de risque cardiovasculaire<sup>36</sup>. Par ailleurs, le taux de PEC est un meilleur facteur prédictif des dysfonctions endothéliales que les facteurs de risque habituels<sup>36</sup>.

Concernant l'artériopathie périphérique, les facteurs de risque tels que l'hypertension, l'hyperlipidémie, le diabète, et le fait notamment d'avoir au moins un antécédent d'AVC, sont prépondérants chez les patients diagnostiqués. Cependant, l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs pourrait être un symptôme d'alarme d'une pathologie cardiovasculaire beaucoup plus générale (<http://www.portailvasculaire.fr/espace-sfmv>). L'athérosclérose dans ce contexte induit une occlusion de l'arbre artériel et une hypoxie tissulaire qui stimule l'angiogenèse. Des vaisseaux collatéraux se développent donc physiologiquement chez les patients atteints d'ischémie critique, grâce à l'augmentation de cette réponse angiogène<sup>258</sup>. Les études explorant le rôle des PEC dans la pathogénie de l'ischémie critique des membres inférieurs sont rares et seront abordées ci-après.

La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) et l'hypertension pulmonaire sont 2 pathologies qui sont liées, cette dernière pouvant être une conséquence de la FPI, et dans lesquelles le remodelage vasculaire joue un rôle prépondérant dans leur pathogenèse. Dans la FPI, les régions fibrotiques comportent des CE aussi bien en apoptose qu'en prolifération, entraînant la formation d'anastomoses entre les capillaires alvéolaires et les veines pulmonaires, menant à une architecture vasculaire aberrante<sup>259-261</sup>. De façon intéressante dans ce contexte de CE apoptotiques, un nombre diminué de PEC a été retrouvé<sup>262</sup>. Par ailleurs, notre équipe ainsi qu'une étude encore plus récente ont retrouvé un nombre de CFU-EC significativement diminué dans la FPI<sup>263, 264</sup>; de plus notre équipe dans ce même travail observe un taux d'ECFC chez les patients atteints de FPI ayant une tendance à la diminution par rapport à la population contrôle; cependant, au sein des patients atteints de FPI, le taux d'ECFC est corrélé à la sévérité de la maladie: les patients ayant une DLCO < 40% (forme la plus sévère) ont un taux d'ECFC significativement augmenté par rapport aux patients ayant une DLCO > 40%; de plus, la capacité proliférative des ECFC chez les patients en exacerbation est augmentée comparée aux patients avec FPI stable<sup>263</sup>. Cette diminution de cellules circulantes pourrait donc être due soit à une biodisponibilité moindre des PEC, soit à un afflux de domiciliation pulmonaire vers les sites endommagés. Les PEC pourraient donc être impliqués dans le remodelage vasculaire observé dans la FPI.

La plupart de ces différentes données concernant les PEC et ces 3 catégories de pathologies (cardiovasculaires, artérielles périphériques, pulmonaires) humaines sont développées dans les sous-paragraphe suivants.

#### 1.3.3.1. Pathologies pulmonaires

#### 1.3.3.1.1. *Développement du réseau vasculaire pulmonaire pendant l'embryogenèse*

La cicatrisation ou la fibrogenèse dans le poumon est associée à (ou causée par) la réactivation des voies et des programmes impliqués dans le développement embryonnaire des poumons <sup>265</sup>. Pour comprendre les interactions entre les processus vasculaires et interstitiels dans la fibrose pulmonaire, il est nécessaire de rappeler la façon dont le système vasculaire pulmonaire et le parenchyme interagissent au cours de l'embryologie du poumon.

Le système vasculaire pulmonaire se développe à proximité et de façon synchrone avec les voies respiratoires et la formation des alvéoles <sup>266</sup>. Au cours de la phase embryonnaire du développement pulmonaire, les bourgeons apparaissent et se connectent au mésenchyme environnant. Ces bourgeons sont alimentés par des capillaires qui relient le sac aortique via les artères pulmonaires, et au futur atrium gauche du cœur via les veines pulmonaires <sup>266-268</sup>. Le cartilage, les glandes, et les CML se développent, et l'épithélium se différencie dans les parois des voies respiratoires au cours du stade pseudoglandulaire. En outre, cette phase est également responsable de la constitution des voies respiratoires pré-acinaires, des artères, et des veines <sup>266</sup>. Au cours des étapes canaliculaire et sacculaire, d'autres ramifications s'établissent dans les voies respiratoires, accompagnées par des artères et veines. Les membranes basales endothéliales et épithéliales fusionnent, facilitant ainsi l'échange gazeux. Une condition nécessaire pour la formation d'un échange de gaz effectif est la proximité des capillaires et de l'épithélium après la différenciation des cellules épithéliales alvéolaires (AEC) de type 2 cubiques, en fines cellules de type 1, et une diminution du mésenchyme alentour. Les AEC2 commencent à produire le surfactant autour de 24-25 semaines de gestation, les alvéoles apparaissent, et les alvéoles en forme de coupe avec double-boucles capillaires se développent, augmentant ainsi la surface du lit capillaire alvéolaire. Les voies respiratoires, les artères, et les veines augmentent de taille <sup>266</sup>.

Certaines études suggèrent que le réseau vasculaire pulmonaire provient de vaisseaux pré-existants via l'angiogenèse (prolifération et migration des CE existantes). D'autres études ont prouvé que l'angiogenèse ne peut jouer un rôle que pour les artères proximales, alors que la vasculogenèse (développement vasculaire à partir de progéniteurs endothéliaux durant l'embryogenèse) pourrait être important pour le développement des artères périphériques et des capillaires, qui ensuite se connectent aux artères proximales <sup>267-271</sup>. Plusieurs facteurs de croissance pro-angiogènes sont impliqués dans le développement vasculaire pulmonaire. Le plus largement étudié est le VEGF, qui est impliqué à la fois dans l'angiogenèse et la vasculogenèse. Les cellules épithéliales semblent être une source prédominante de VEGF au cours du développement pulmonaire, ce qui suggère que les voies respiratoires et l'épithélium alvéolaire sont essentiels pour la génération de la totalité du réseau vasculaire pulmonaire <sup>272-275</sup>. Un déficit d'expression du VEGF et de sa signalisation n'ont pas seulement des effets néfastes sur le développement et le maintien vasculaire, mais aussi sur la structure et l'intégrité du poumon entier <sup>275-277</sup>. D'autres facteurs pro-angiogènes, comme l'angiopoïétine-1, sont également impliqués dans la formation des vaisseaux sanguins <sup>278</sup>. En outre, les taux et l'activité finement régulés d'autres « facteurs de croissance », comme le TGF- $\beta$ , sont importants pour un développement vasculaire coordonné, comme illustré par les résultats montrant que des souris surexprimant du TGF- $\beta$ 1 au cours du développement

pulmonaire, présentent un défaut de différenciation épithéliale et une diminution de la vascularisation capillaire<sup>279</sup>

Les trois principales sources de CML vasculaires (CMLV) dans le poumon en cours développement pourraient expliquer certains mécanismes de génération de CMLV retrouvées ensuite dans la physiopathologie de l'hypertension pulmonaire : (1) les CML bronchiques forment la couche interne des CMLV dans les artères qui accompagnent les avant-dernières voies respiratoires<sup>266, 268</sup>, (2) les fibroblastes entourant la paroi artérielle se différencient en CMLV après la libération de facteurs de croissance chimioattractants, tels que le « PDGF » (*Platelet Derived Growth Factor*), ou l'« EGF » (*Epidermal Growth Factor*) de l'endothélium en réponse à l'Ang-1 sécrétée par les cellules mésenchymateuses<sup>280</sup>; (3) les CMLV peuvent également provenir de la lumière vasculaire via la transition endothéliale-mésenchymateuse (EMT)<sup>281</sup>. Des mécanismes de transition similaires pourraient être impliqués dans le remodelage artériel pulmonaire du poumon fibrotique adulte.

#### 1.3.3.1.2. Pathologies interstitielles pulmonaires

Les pathologies interstitielles pulmonaires (PIP) constituent un groupe de troubles diffus du parenchyme pulmonaire, et sont classées en fonction de caractéristiques cliniques, radiologiques et histopathologiques spécifiques<sup>282</sup>. Dans la plupart des cas, les PIP n'ont pas de cause identifiable sous-jacente et sont donc considérées comme idiopathiques. Fréquemment cependant, elles sont associées à une exposition environnementale particulière ou une maladie du tissu conjonctif sous-jacente. La radiographie a permis de caractériser les PIP avec une grande précision. Les PIP constituent un groupe hétérogène de maladies pulmonaires qui représentent plus de 200 entités cliniques<sup>283</sup>. Bien que les différentes PIP aient des présentations cliniques assez similaires - essoufflement croissant, fonction pulmonaire restrictive, perturbation des échanges gazeux et « ombrage » très étendu sur la radiographie du thorax - elles comprennent un très large éventail de pathologies, de manifestations cliniques et d'évolutions. Dans environ deux tiers des cas de PIP, aucune étiologie n'a été rapportée<sup>284</sup>. Le tiers restant est associé à (ou défini par) divers facteurs environnementaux ou professionnels, y compris le tabagisme, l'aspiration, certains médicaments et la radiothérapie<sup>285, 286</sup>. Malgré leur complexité reconnue, il y a peu d'arguments en faveur d'une gestion optimale des PIP. La morbidité des PIP elles-mêmes et les effets indésirables des traitements disponibles peuvent être élevés, avec des conséquences potentiellement graves, comme notamment des risques de mauvaise prise en charge. L'amélioration de la survie et la guérison des différentes formes de PIP sont tributaires d'une meilleure compréhension de la physiopathologie de la maladie, de la précision du diagnostic dans la pratique clinique, et de l'analyse de potentiels biomarqueurs qui pourraient guider le clinicien dans leurs traitements<sup>287</sup>.

L'évolution clinique des patients atteints de PIP est variable et peut présenter de longues périodes de stabilité, une dégradation progressive et régulière, et / ou des périodes de détérioration aiguë<sup>288</sup>. Certaines formes de PIP répondent bien au traitement, d'autres ne sont pas sensibles à de fortes doses d'anti-inflammatoires (par exemple la dexaméthasone) ou d'agents immunosuppresseurs. La transplantation pulmonaire est une alternative pour certains patients, mais de nombreux patients sont trop âgés ou décèdent sur la liste d'attente<sup>289</sup>. Une des raisons possibles expliquant la forte mortalité sur la liste d'attente de transplantation pulmonaire, est l'évolution variable de la maladie, ce qui

complique la prévision du pronostic. Par conséquent, l'identification de facteurs prédictifs de survie est essentielle pour une meilleure prise en charge<sup>290</sup>.

La FPI, de pronostic très défavorable, fait donc partie des PIP<sup>282</sup> et fait l'objet du paragraphe suivant.

#### 1.3.3.1.3. Remodelage vasculaire dans la fibrose pulmonaire idiopathique

La FPI est caractérisée par un remodelage vasculaire hétérogène avec des régions fibrotiques qui contiennent peu de vaisseaux sanguins, alors que les régions adjacentes non fibrotiques sont extrêmement vascularisées<sup>260, 291</sup>. Les régions fibrotiques comprennent des CE apoptotiques mais aussi en prolifération, entraînant la formation d'anastomoses entre les capillaires alvéolaires et les veines pulmonaires menant à une architecture vasculaire aberrante<sup>259-261</sup>. Ces changements conduisent à la réduction du réseau vasculaire pulmonaire. Au cours de la FPI humaine, la diminution du réseau vasculaire est due à l'expansion du tissu cicatriciel mais également à un déséquilibre entre les facteurs pro-angiogènes et anti-angiogènes. En effet, la diminution d'expression de facteurs comme le VEGF est parallèle à l'augmentation d'expression de facteurs comme le PEDF<sup>260, 291</sup>. Par ailleurs, l'apoptose des CE pourrait aussi être induite par une augmentation du stress oxydatif<sup>292</sup>. De façon intéressante dans ce contexte d'apoptose des CE, un nombre diminué de PEC a été retrouvé<sup>262</sup>. Cette diminution de cellules circulantes pourrait donc être due soit à une biodisponibilité moindre des PEC, soit à un afflux de domiciliation pulmonaire vers les sites endommagés. Les PEC pourraient donc être impliqués dans le remodelage vasculaire observé dans la FPI.

Des changements histopathologiques importants de l'artère pulmonaire jouent également un rôle important dans le développement de l'hypertension pulmonaire, maintenant reconnue comme l'un des marqueurs pronostiques de la FPI<sup>293</sup>. Un large éventail d'altérations structurelles de l'artère pulmonaire peut être ainsi observé, allant de lésions isolées caractérisées par l'épaississement de la couche de muscle lisse et par la prolifération de l'intima, à l'occlusion complète du vaisseau par le tissu cicatriciel et les lésions plexiformes. Ces lésions seraient liées à la prolifération des CMLV due à la libération au niveau du tissu fibrotique, et notamment des CE apoptotiques, de facteurs de croissance comme le TGF- $\beta$ 1 ou le PDGF<sup>294</sup>. Ainsi, l'étendue de ces lésions augmente avec la progression de la fibrose dans les tissus adjacents<sup>295</sup>. Le stress oxydatif pourrait également jouer un rôle dans la prolifération des fibroblastes et des CMLV et ainsi contribuer à des changements pathologiques dans les 3 couches de tissu de l'artère pulmonaire<sup>292</sup>. D'autres mécanismes vont aussi probablement contribuer au remodelage vasculaire et à l'hypertension pulmonaire au cours de la FPI, comme un dysfonctionnement des CE conduisant à une diminution de la libération de molécules vasodilatatrices et d'inhibiteurs de la prolifération des CMLV, notamment d'oxyde nitrique (NO) et de prostacyclines<sup>6, 294, 296, 297</sup>. La diminution de la libération de vasodilatateurs et l'augmentation de sécrétion de vasoconstricteurs comme l'endothéline-1, le thromboxane A2 et l'angiotensine II, indiquent que le phénomène de vasoconstriction contribuerait à augmenter la pression artérielle pulmonaire et ainsi le remodelage vasculaire<sup>294, 296</sup>. Par ailleurs, certains facteurs de croissance libérés par le tissu fibrotique, tel que le TGF- $\beta$ 1, pourraient être responsables des processus de transitions épithélio-mésenchymateuse et endothélio-mésenchymateuse, mécanismes qui participeraient aussi à l'accumulation de myofibroblastes dans l'intima ou à l'expansion des CMLV au cours de l'épaississement de la média<sup>298</sup>.

### *Physiopathologie de la FPI : interactions épithélio-mésenchymateuses consécutives à une atteinte pulmonaire*

Après une lésion du tissu pulmonaire, les cellules épithéliales et immunitaires confèrent un environnement pour la réparation ultérieure en stabilisant la matrice riche en fibronectine nouvellement formée pour compenser la perméabilité pulmonaire croissante, en réponse à des signaux prolifératifs et migratoires de la membrane basale alvéolaire dénudée, limitant ainsi la perte de la barrière fonctionnelle, et en relargant des facteurs chimiotactiques qui stimulent la migration des fibroblastes endogènes dans la voie respiratoire ou l'alvéole<sup>299-301</sup>. Un certain nombre de ces facteurs chimiotactiques vis-à-vis des fibroblastes sont détectables dans le fluide de lavage bronchoalvéolaire (BALF): acide lysophosphatidique (LPA), CCL-18, PGE2 & PGF2 $\alpha$ , SDF-1 (CXCL12) parmi d'autres<sup>302-305</sup>. Certaines études sont en faveur d'une origine épithéliale des ces facteurs chimiotactiques. En effet, des expériences d'immunomarquages et/ou d'hybridation *in situ* ont montré que les cellules épithéliales pulmonaires expriment le MCP-1 et le TNF- $\alpha$  après une lésion tissulaire<sup>306, 307</sup>. Dans ce contexte de lésion, les fibroblastes (et peut-être d'autres cellules mésenchymateuses) du parenchyme pulmonaire relarguent des facteurs affectant l'épithélium pulmonaire, comme certains peptides dérivés de l'angiotensine et le FGF7 (KGF)<sup>308-310</sup>. Par analogie avec les interactions entre les cellules tumorales et le stroma, le TGF- $\beta$ 1 latent et le PDGF, et plus largement les facteurs dérivés des fibroblastes, pourraient provenir de l'interstitium et affecter l'épithélium, mais jusqu'à maintenant leur identification et les preuves fonctionnelles restent à définir.

Par ailleurs des études ont rapportés une augmentation d'expression des ligands Wnt et Shh dans les cellules épithéliales anormales dans la FPI<sup>311, 312</sup>, sans savoir pour autant si ces protéines faiblement diffusibles stimulent directement les fibroblastes interstiels.

### *Physiopathologie de la FPI : transition épithélio-mésenchymateuse (Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT)*

La transition épithélio-mésenchymateuse ou EMT représente un aspect de l'expression de la plasticité épithéliale. Par extrapolation, ce phénomène d'EMT est un mécanisme cellulaire de « switch » de lignée par lequel les cellules épithéliales subissent d'importantes reprogrammations transcriptionnelles et deviennent des cellules mésenchymateuses. Malgré que l'EMT soit bien documenté dans l'embryogenèse, son occurrence dans la vie adulte, aussi bien dans la fibrogenèse que dans la progression tumorale, semble plus restreinte, réversible, et souvent moins extrême dans ses conséquences. L'EMT dans la vie adulte est généralement une réponse à une lésion, une inflammation, ou à une signalisation cellulaire épithéliale anormale soutenue. L'EMT dans ce contexte permet aux cellules épithéliales au moins temporairement de « switcher » d'un type cellulaire polarisé et ancré à la matrice avec de nombreux contacts cellule/cellule vers un type cellulaire plus mobile et avec un phénotype migratoire provenant de la perte de contacts E-cadhérine-dépendants, de la réorganisation du cytosquelette avec l'expression de filaments mésenchymateux, et d'extensions de la membrane cellulaire (lamellipodes)<sup>313, 314</sup>. Selon l'importance et la durée de la signalisation « pro-EMT », les cellules épithéliales modifient davantage leur phénotype avec perte totale de la E-cadhérine et de l'expression des protéines de jonction ainsi que

l'acquisition de récepteurs d'adhésion, de protéases et de la production de matrice extracellulaire de profil mésenchymateux complet. La reprogrammation de cette panoplie de facteurs de transcription actifs et de microRNAs guide ce processus<sup>313, 315, 316</sup>. Dans l'ensemble, ces réponses sont supposées favoriser le phénomène de cicatrisation et pourraient en effet constituer une part vitale et réversible des réponses épithéliales vis-à-vis de la rupture de l'homéostasie. De ce point de vue, l'EMT n'est pas seulement un mécanisme de génération de fibroblaste mais un continuum de la réponse épithéliale qui organise la réparation cellulaire.

Le processus d'EMT influence probablement le remodelage tissulaire à travers des mécanismes aussi bien directs qu'indirects. Les cellules épithéliales qui subissent une transition mésenchymateuse avec augmentation de synthèse de nouveaux composants de la matrice pourraient contribuer directement à l'accumulation tissulaire de collagène. Mais l'altération des interactions épithéliales avec les cellules mésenchymateuses environnantes pourraient se produire de façon précoce au cours de l'EMT. Les mouvements des cellules épithéliales ou de leurs expansions cellulaires à proximité des fibroblastes endogènes peuvent autoriser une signalisation paracrine plus étendue. En outre, les chimiokines et les cytokines libérées par les cellules épithéliales qui subissent une EMT peuvent activer ou recruter des fibroblastes, de façon analogue à ce type d'évènements récemment élucidés dans la progression tumorale. Ces mécanismes indirects pourraient être au moins aussi importants que les effets directs de l'EMT sur l'expansion des fibroblastes. Comme indiqué plus haut, les modèles de fibrose pulmonaire pour lesquels il existe le plus de données en faveur du mécanisme d'EMT, sont les modèles pour lesquels on pourrait le plus facilement envisager l'activation de voies paracrines directes et indirectes au cours de l'EMT.

#### *Régulation de l'EMT : détection d'intégrine dans la signalisation du TGF-β1 et l'EMT*

L'acteur central le plus étudié dans l'EMT est le TGF-β1, et la signalisation à travers cette cytokine caractérise la coordination nécessaire pour effectuer les phases précoces et tardives de l'EMT<sup>317</sup>. Les cellules épithéliales semblent utiliser deux systèmes distincts de détection dépendants d'intégrines pour réguler la signalisation « TGF-β1 ». L'activation initiale par le TGF-β1 sur les cellules épithéliales alvéolaires pulmonaires requière la liaison du TGF-β1 latent à l'intégrine αβ6<sup>318</sup>. L'activation du TGF-β1 est ensuite déclenchée par des réponses couplée aux protéines G à des agonistes pro-inflammatoires (acide lysophosphatidique - LPA2 - et thrombine notamment, tous deux via le récepteur PAR-1) qui active l'intégrine<sup>319, 320</sup>. En effet, l'intégrine agit en détectant des « déclencheurs » inflammatoires, cela étant une condition préalable à l'activation par les cytokines. Un second « détecteur » dépendant des intégrines couple les réponses de signalisation vis-à-vis du TGFβ1 actif, aux contacts « cellule/cellule » et « cellule/matrice » : la perte de contacts cellulaires normaux déclenche l'assemblage de complexes de signalisation contenant le système E-cadhérine/β-caténine, l'intégrine α3β1, et les récepteurs au TGF-β1, qui ensuite génèrent des complexes transcriptionnels de β-caténine phosphorylée (au niveau d'une tyrosine cible) et Smad phosphorylée (p-Smad). Ces complexes se déplacent et s'accumulent dans le noyau afin de reprogrammer les cellules épithéliales vers un phénotype davantage migratoire et mésenchymateux. De telles cellules peuvent libérer des facteurs qui modulent l'inflammation et peuvent par ailleurs devenir des fibroblastes ou activer les fibroblastes. Dans ce cas, l'intégrine détecte la lésion tissulaire comme condition préalable à l'initiation de la réparation cellulaire. L'ensemble de ces « capteurs » agit probablement en régulant

négalement cet aspect de la signalisation du TGF- $\beta$ 1 dès lors que l'effet des agonistes pro-inflammatoires s'atténuent et que les contacts cellulaires physiologiques sont rétablis. Le TGF- $\beta$ 1 est sécrété sous la forme d'une cytokine latente liée à un peptide (*Latency Associated Peptide*, LAP) de façon non covalente, qui à la fois séquestre l'activité du TGF- $\beta$ 1 et le localise dans la matrice extracellulaire, en particulier lié à la fibronectine<sup>321</sup>. Les sources de TGF- $\beta$ 1 latent au cours de l'inflammation et de la réparation tissulaire dans les poumons sont probablement nombreuses, mais à la fois les macrophages et les cellules épithéliales sont considérés comme des sites majeurs de sa synthèse et de sa sécrétion. Les cellules épithéliales portant l'intégrine  $\alpha\beta$ 6 lient le TGF- $\beta$ 1 latent via le motif peptidique RGD du LAP et change la conformation de la cytokine vers une conformation active (capable de se lier à son récepteur). La liaison du TGF- $\beta$ 1 latent à  $\alpha\beta$ 6 est nécessaire mais pas suffisante pour l'activation du TGF- $\beta$ 1. L'intégrine doit être activée par des connexions au cytosquelette qui sont établies en aval de la signalisation des récepteurs couplés aux protéines G. Au moins un des facteurs pro-inflammatoires qui entrent en jeu au cours d'une lésion tissulaire (thrombine, LPA2) régule l'activation de l'intégrine<sup>319, 320</sup>. D'autres chimiokines ou cytokines agissant par l'intermédiaire de récepteurs couplés aux protéines G qui ont été décrites comme favorisant l'EMT, comme par exemple l'endothéline 1, pourraient fonctionner au moins en partie grâce à ce mécanisme<sup>322</sup>. Ainsi, les cellules épithéliales répondent à des signaux diffusibles impliquant une lésion à proximité, pour initier la signalisation TGF- $\beta$ 1. Les cellules épithéliales répondent également à des modifications de leur MEC, notamment comme la stimulation de l'engagement intégrine-dépendant du collagène de type I ou de la fibronectine, et de signalisation de l'intégrine qui se traduit par la rigidification cellulaire, la réorganisation du cytosquelette (reflétant l'activation de Rho)<sup>323, 324</sup>, et l'activation d' $\alpha\beta$ 6. Par conséquent, le dépôt d'une matrice provisoire de fibrinogène et de la fibronectine consécutif aux modifications de la perméabilité de la barrière épithéliale induits par la lésion, et le remplacement ultérieur de la matrice par les collagènes fibrillaires, pourrait supporter l'activation du TGF- $\beta$ 1<sup>325</sup>. Bien que les cellules épithéliales pulmonaires distales semblent utiliser exclusivement  $\alpha\beta$ 6 pour activer le TGF- $\beta$ 1, des données récentes indiquent que d'autres types cellulaires comme les cellules épithéliales des voies aériennes, les cellules dendritiques, et les fibroblastes, utilisent un mécanisme similaire. Les cellules dendritiques et les cellules épithéliales des voies aériennes ciliées lient le TGF- $\beta$ 1 latent principalement par l'intégrine  $\alpha\beta$ 8, alors que les fibroblastes auraient recours à l'intégrine  $\alpha\beta$ 5<sup>326-329</sup>. Comme pour les cellules épithéliales, les fibroblastes répondent à l'engagement avec la matrice via l'activation d'intégrine, et cette signalisation FAK/Src dépendante est importante pour l'activation du TGF- $\beta$ 1 latent<sup>329</sup>. Et comme avec les cellules épithéliales, les agonistes pro-inflammatoires ainsi que la MEC semblent activer ce processus. Le facteur Xa est un puissant médiateur de l'activation du PAR-1 (*protease-activated receptor 1*), conduisant ensuite à l'activation intégrine-dépendante du TGF- $\beta$ 1. L'activité du facteur Xa de la coagulation au niveau pulmonaire est élevée dans la FPI, de même que dans les modèles expérimentaux de fibrose pulmonaire, et la cinétique d'activation du facteur X consécutive à une lésion expérimentale corrèle avec la phase fibrotique<sup>328</sup>. Sur les cellules épithéliales des voies respiratoires et les fibroblastes, la liaison du TGF- $\beta$ 1 latent à l'intégrine semble positionnée de manière à favoriser le clivage protéolytique de TGF- $\beta$ 1 latent et la libération de cytokines actives, peut-être en favorisant des signalisations supplémentaires autocrines autant que paracrines<sup>327</sup>. De nombreux travaux rapportant la présence de TGF- $\beta$ 1 actif dans les BALF et

dans des explants de poumons lésés ou fibrotiques, reflètent probablement largement ces voies d'activation du TGF- $\beta$ 1.

Le second système intégrine-dépendant de régulation du TGF- $\beta$ 1 coordonne les contacts cellulaires avec les réponses cellulaires au TGF- $\beta$ 1 actif. Kapus *et al*<sup>330</sup> ont remarqué que les cellules épithéliales rénales cultivées pratiquement à confluence ne parviennent pas à subir des réponses de type EMT au TGF- $\beta$ 1 actif, tandis que les cellules cultivées à faible densité ou maintenu dans des milieux à faible taux de Ca<sup>2+</sup> développent des caractéristiques typiques d'une EMT. Ces études ont également suggéré un rôle pour la  $\beta$ -caténine et la E-cadhérine dans la régulation contact-dépendante de l'EMT. Ces résultats sont par ailleurs intrigant parce que la E-cadhérine est physiquement associée à au moins une fraction de récepteurs au TGF- $\beta$ 1, ce qui suggère la possibilité d'un « *cross-talk* » entre ces protéines de surface<sup>331</sup>. L'intégrine  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 est un récepteur de laminines (surtout les laminines 332 et 331) et du collagène de type IV, mais qui s'associe aussi physiquement avec la E-cadhérine<sup>332, 333</sup>. Dans le poumon, l'intégrine se trouve distinctement dans les bordures cellule/cellule colocalisées avec la E-cadhérine et  $\beta$ -caténine, ainsi que dans les surfaces cellulaires basales en contact avec les membranes basales<sup>334</sup>. Mais les souris déficientes en  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 dans l'épithélium pulmonaire se développent normalement, et les poumons présentent une fonction de barrière normale, ce qui indique que l'intégrine n'a pas de rôle structurel critique dans l'adhésion cellulaire ou dans les contacts cellule/cellule<sup>335</sup>. Au contraire, des cellules primaires épithéliales déficientes en  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 présentent une réponse phénotypique au TGF- $\beta$ 1 actif nettement atténuée, même si la phosphorylation initiale de Smad2/3 et sa translocation nucléaire semblent ne pas être affectées par la perte de l'intégrine. Des études précédentes ont montré que le TGF- $\beta$ 1 suscite une forte phosphorylation sur une tyrosine de la  $\beta$ -caténine, spécifiquement sur la tyrosine 654 (Y654), et que les cellules déficientes en intégrine ne parviennent pas à phosphoryler la  $\beta$ -caténine. Le résidu Y654 de la  $\beta$ -caténine régule sa liaison avec la E-cadhérine; la phosphorylation de ce résidu dissocie la E-cadhérine de la  $\beta$ -caténine<sup>336</sup>. Ainsi, parallèlement à la phosphorylation de Smad2, les complexes de p-Y654- $\beta$ -caténine et p-Smad2 se forment et se transloquent vers le noyau. Les complexes  $\beta$ -caténine/Smad2  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-dépendants et le développement de myofibroblastes ont également été observés *in vivo*. Dans le modèle de fibrose induite par la bléomycine, les souris déficientes en  $\alpha$ 3 spécifiquement dans les cellules épithéliales pulmonaires, ne parviennent pas à former les complexes p-Y654- $\beta$ -caténine/p-Smad2 lors de la phase fibrotique (14-21 jours), et l'apparition de nouveaux myofibroblastes ou d'expression de collagène de type I était nettement atténuée.

L'analyse de biopsies pulmonaires provenant de patients FPI a révélé que la plupart des myofibroblastes dans les foyers fibroblastiques sont fortement positifs pour la p-Y654- $\beta$ -caténine nucléaire<sup>335</sup>. Une sous-fraction de cellules épithéliales alvéolaires est également positive pour la p-Y654- $\beta$ -caténine nucléaire. Ces observations corroborent le principe que l'EMT est un facteur important de l'accumulation des myofibroblastes dans la FPI et sont compatibles avec les données récentes montrant que la voie de signalisation Wnt est active pendant la fibrogenèse chez les patients FPI<sup>311</sup>. Le ligand Wnt est prévu pour stabiliser la p-Y654- $\beta$ -caténine, même si la signalisation Wnt n'est pas nécessaire pour la phosphorylation de la tyrosine de la  $\beta$ -caténine ou pour sa complexation avec Smad2. La signalisation Wnt stabilise également les niveaux de Smad3 via l'inactivation de GSK3 $\beta$ , soutenant davantage le « *cross-talk* » entre GSK3 $\beta$  et la signalisation TGF- $\beta$ 1<sup>337</sup>. Si la  $\beta$ -caténine phosphorylée nucléaire reflète un processus d'EMT, d'autres mécanismes non caractérisés soutenant cette voie de signalisation sont plausibles car les myofibroblastes sont dépourvus de E-cadhérine.

D'autres études sont clairement nécessaires pour élucider à la fois la signalisation qui conduit aux complexes nucléaires p-Y654- $\beta$ -caténine/Smad2 dans les myofibroblastes de patients atteints de FPI, et les conséquences exactes de ces complexes sur les phénotypes de ces myofibroblastes.

#### *Régulation de l'EMT : autres voies de signalisation impliquées l'EMT*

Comme relaté dans le paragraphe précédent, la voie de signalisation du TGF- $\beta$ 1 dépendante des protéines Smad est nécessaire mais pas suffisante à elle seule pour conduire l'EMT. En plus de la contribution importante des contacts cellulaires dans les réponses au TGF- $\beta$ 1, de nombreuses autres voies de signalisation influent sur les transitions mésenchymateuses : des voies impliquant par exemple *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK), AKT, d'autres impliquant des substrats « non Smad » pour le récepteur au TGF- $\beta$ 1 comme PAR-6 et Shc, favorisent l'EMT<sup>317, 338-342</sup>. Mais l'impact de l'activation de la MAPK sur la signalisation Smad est complexe et semble être dépendante du type cellulaire. Dans certaines cellules, la phosphorylation par la MAPK de la région de liaison entre les deux domaines de liaison à l'ADN des protéines Smad supprime leur translocation nucléaire, et cette suppression est l'effet dominant de l'activation de la MAPK sur la signalisation Smad<sup>340</sup>. Dans d'autres contextes, les facteurs de transcription en aval de l'activation de la MAPK, comme la protéine activatrice 1 (AP-1) et le facteur nucléaire- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), sont activés et interagissent avec les protéines Smad dans le noyau, et l'effet dominant est de promouvoir les réponses à la signalisation Smad. Par exemple, la liaison nucléaire de Smad3 à AP-1 dans un système cellulaire est critique pour la liaison au promoteur du gène du collagène I par Smad3 et la transcription dépendante de Smad<sup>343</sup>. L'activation de Jun en aval de la MAPK favorise l'EMT induite par le TGF- $\beta$ 1 des cellules épithéliales alvéolaires<sup>341</sup>. L'implication positive de Jun et d'autres MAPK dans le processus d'EMT contribue probablement à une grande partie de la synergie rapportée entre l'EGF, et éventuellement d'autres activateurs de récepteurs à tyrosine kinase, et le TGF- $\beta$ 1 dans l'EMT<sup>344, 345</sup>. Une voie de signalisation distincte supplémentaire impliquée dans l'EMT a été rapportée dans les cellules exprimant la métalloprotéase matricielle 3 (MMP3, également connu sous le nom stromélysine 1). Les cellules épithéliales du sein surexprimant la MMP3 subissent une EMT à la fois *in vitro* et *in vivo*. De manière intéressante, cette voie d'EMT est dépendante de l'induction de Rac1b à travers un mécanisme dépendant d'espèces réactives de l'oxygène<sup>346</sup>. Dans ce cas, l'EMT peut être bloquée par des agents réducteurs tels que la N-acétylcystéine. Il n'est pas encore très clair si cette voie contribue à l'EMT et/ou au remodelage tissulaire dans le poumon blessé. L'existence d'une interface mécanistique entre la signalisation TGF- $\beta$ 1 et l'expression de MMP3 est également inconnu.

Par opposition à l'ensemble des voies de signalisation responsables de l'EMT induite par le TGF- $\beta$ 1, la signalisation « BMP », via BMP7 (une des protéines de la famille des *Bone Morphogenetic Proteins*, BMP) bloque cette EMT induite par le TGF- $\beta$ 1, ainsi que la fibrose dans les modèles de lésions rénales<sup>347</sup>. BMP7 bloque également la production de collagène par les myofibroblastes induite par TGF- $\beta$ 1<sup>348</sup>. Ces résultats sont pertinents concernant le remodelage des tissus pulmonaires : en effet, *gremlin*, un antagoniste de la signalisation BMP, est surexprimé dans la FPI<sup>349</sup>. En outre, *gremlin* est également surexprimé dans le modèle de fibrose pulmonaire retrouvé dans l'asbestose, alors que l'administration de BMP7 atténue la réponse fibrotique<sup>350</sup>. En revanche, BMP7 ne prévient pas la fibrose chez les

souris exposées à la bléomycine <sup>351</sup>. Le rôle de BMP7 dans la régulation de l'EMT des cellules épithéliales pulmonaires, *in vitro* ou *in vivo*, reste à déterminer.

#### *Régulation de l'EMT : inflammation et EMT*

Lors d'une lésion pulmonaire, différents effets délétères peuvent moduler le devenir de la réparation cellulaire. L'inflammation en fait partie. L'inflammation résulte à la fois d'un état anti-fibrinolytique avec la persistance de matrices provisoires pulmonaires riches en fibrine / fibronectine qui favorisent la croissance des fibroblastes, et potentiellement de la persistance de médiateurs solubles pro-inflammatoires et profibrotiques comme la thrombine et le facteur Xa, des chimiokines et cytokines comme l'IL-6 et l'IL-13, qui favorisent l'activation du TGF- $\beta$ 1 en continue <sup>352, 353</sup>. Par ailleurs, les macrophages qui s'accumulent dans l'infiltrat inflammatoire constituent une source importante de protéases, de TGF- $\beta$ 1 latent, et d'autres cytokines profibrotiques <sup>354</sup>. Par exemple, le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  accentuent l'EMT médiée par le TGF- $\beta$ 1 <sup>355, 356</sup>. En outre, la libération des métalloprotéases et des cathepsines à partir des cellules épithéliales et des macrophages, contribue à la perte des contacts cellulaires et à la rupture des membranes basales, ce qui facilite la migration cellulaire et donc l'EMT <sup>357</sup>. Les cellules épithéliales peuvent également contribuer à maintenir l'inflammation : l'hyperactivité de NF- $\kappa$ B leur permet de libérer un certain nombre de cytokines et de chimiokines qui favorisent l'inflammation pulmonaire <sup>358</sup>. Quand l'inflammation diminue, le stimulus pour l'EMT diminue, et cette transition peut potentiellement s'inverser.

#### *Régulation de l'EMT : hypoxie et EMT*

Un deuxième effet délétère des lésions pulmonaires est l'hypoxie locale provenant d'un œdème alvéolaire et / ou d'un collapsus. L'hypoxie résulte de l'accumulation de HIF1 $\alpha$  et HIF2 $\alpha$ , via la perte de l'ubiquitination dépendant de l'oxygène et de l'inhibition de la dégradation de ces facteurs de transcription, ainsi que de la reprogrammation épithéliale qui ressemble en certains points à celle consécutive à la signalisation TGF- $\beta$ 1 <sup>359</sup>. L'EMT induite par l'hypoxie et HIF-dépendante, un processus initialement rapporté dans les modèles de fibrose rénale, a également été observé plus récemment dans un modèle de tumorigenèse pulmonaire <sup>360, 361</sup>. Les cellules épithéliales alvéolaires subissent une EMT *in vitro* en réponse à l'hypoxie, mais il y a actuellement peu de preuves *in vivo* de ce phénomène au cours de la fibrogenèse <sup>362</sup>. Cependant il faut noter que l'augmentation de l'expression de HIF1 $\alpha$  et de ses gènes cibles a été décrite à la fois dans la fibrose induite par la bléomycine et dans des prélèvements de patients FPI <sup>363</sup>. En outre, les souris avec l'haplo-insuffisance du complexe protéique Von Hippel Lindau (VHL), un élément requis pour l'ubiquitination de HIF, développent spontanément une fibrose pulmonaire, impliquant la signalisation dépendante de HIF dans la fibrogenèse pulmonaire <sup>364</sup>. Le collapsus alvéolaire est important dans la phase de guérison après une lésion du poumon, et a été proposé comme un mécanisme physiopathologique de la FPI <sup>365</sup>.

Les études sur l'EMT induite par l'hypoxie ont décrit l'implication de la stabilisation à la fois de HIF1 $\alpha$  et HIF2 $\alpha$  dans la reprogrammation transcriptionnelle de l'EMT <sup>360, 361</sup>. D'autres études récentes révèlent que l'un des effecteurs de la reprogrammation agit via l'induction de la lysyl oxydase, agissant à la fois au niveau extracellulaire pour stabiliser le dépôt de

collagène et au niveau intracellulaire pour favoriser la signalisation « EMT-like » via la stabilisation du répresseur « Snail-1 » de la E-cadhérine <sup>366</sup>. En revanche, HIF2 $\alpha$  est l'isoforme majeur de HIF, critique pour l'EMT dans la tumorigenèse du poumon <sup>361</sup>.

#### *Physiopathologie de la FPI : TGF- $\beta$ 1 & Angiostatine*

L'angiostatine provient de la protéolyse du plasminogène par une métalloélastase des macrophages et d'autres MMP, ou par réduction de la plasmine <sup>367-369</sup>. L'angiostatine est constituée des quatre premiers domaines « kringle » de la plasmine. Un domaine kringle est une structure en triple boucle reliées par trois paires de ponts disulfure <sup>370</sup>. L'angiostatine inhibe la prolifération, induit l'apoptose, et empêche la migration des CE *in vitro* <sup>371, 372</sup>. Les mécanismes moléculaires impliqués incluent l'activation de la kinase d'adhésion focale (FAK), la génération de céramide, l'activation de RhoA, et l'inhibition d'une « a/b ATP synthase » à la surface des CE <sup>372-376</sup>. Des niveaux élevés de l'angiostatine plaquettaire ont été rapportés chez certains patients atteints d'HTAP idiopathique <sup>377</sup>. Une surexpression pulmonaire d'angiostatine aggrave l'hypertension pulmonaire dans un modèle d'hypoxie chronique, qu'on suppose être une conséquence de la vascularisation diminuée <sup>378</sup>.

L'angiostatine pourrait être impliquée dans la physiopathologie de la FPI par l'activation altérée du plasminogène. En effet, dans les tissus sains, le plasminogène est clivé par l'activateur du plasminogène tissulaire (tPA) ou « urokinase » (uPA) pour former l'enzyme active, la plasmine, qui contribue directement, et par l'intermédiaire de l'activité accrue des MMP, à la dégradation de la MEC <sup>379</sup>. Dans la FPI, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 (PAI-1) est induit par le TGF- $\beta$  et inhibe l'activation du plasminogène <sup>379</sup>. Il en résulte une décomposition réduite de la MEC, et une augmentation du recrutement de cellules inflammatoires <sup>379</sup>. Le plasminogène non clivé peut ensuite être de plus en plus clivé pour générer l'angiostatine, probablement par des métalloélastases de macrophages, ou par effet direct du PAI-1 sur le plasminogène. Des niveaux d'angiostatine localement élevés dans le tissu fibreux peuvent contribuer à l'apoptose des CE, et à une raréfaction vasculaire <sup>380</sup>. Toutefois, l'implication de l'angiostatine dans la fibrose et l'hypertension pulmonaire liée à la FPI doit être démontrée avant que l'angiostatine puisse être considéré comme une nouvelle cible thérapeutique, ou même comme un biomarqueur de l'évolution clinique.

#### *1.3.3.1.4. Hypertension pulmonaire*

L'hypertension pulmonaire (HTP) se caractérise par une obstruction vasculaire pulmonaire conduisant à une augmentation progressive des résistances à l'écoulement sanguin et, à terme, à une défaillance cardiaque droite pouvant être à l'origine du décès du patient en l'absence de traitement. Elle est définie par une pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm)  $\geq 25$  mmHg au repos, mesurée lors du cathétérisme cardiaque droit <sup>381</sup>. Une PAP occluse  $\leq 15$  mmHg définit une HTP précapillaire.

Il existe plusieurs formes d'hypertensions pulmonaires, regroupées en 5 classes distinctes (Tableau 4) en fonction des similitudes qu'elles présentent dans leur physiopathologie, leur présentation clinique et leur prise en charge thérapeutique. La classification a été revue et modifiée à Dana Point (Californie) en 2008 <sup>382</sup>.

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) regroupe toutes les formes présentant une atteinte des artères de petit calibre. Qu'elles soient idiopathiques, héritables ou associées à

diverses pathologies (connectivite, cardiopathie congénitale, hypertension portale, infection par le VIH, bilharziose, anémie hémolytique chronique) ou à la prise d'anorexigènes, ces formes sont caractérisées par une dysfonction endothéliale pulmonaire et des modifications histologiques similaires, justifiant une prise en charge thérapeutique identique. Des mutations germinales de gènes codant des récepteurs des membres de la superfamille du TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ) tels que BMPRII (*bone morphogenetic protein receptor type 2*)<sup>383</sup>, ALK-1 (*activin-receptor-like kinase-1*) et endogline, ont été rapportées. Les mutations d'ALK-1 et d'endogline sont responsables de la télangiectasie hémorragique héréditaire, maladie caractérisée par la présence de multiples malformations artérioveineuses. Dans la maladie veino-occlusive et l'hémangiomatose capillaire pulmonaire, l'atteinte vasculaire prédomine au niveau des veines et des capillaires. Malgré un pronostic plus sévère, les nombreuses similitudes cliniques et physiopathologiques avec les HTAP idiopathiques justifient leur inclusion dans ce groupe.

Les autres formes d'HTP se distinguent de l'HTAP par l'association à une pathologie bien identifiée permettant aux patients de bénéficier d'un traitement spécifique. Les HTP post-capillaires secondaires aux dysfonctions cardiaques gauches systoliques ou diastoliques ou aux valvulopathies gauches représentent le groupe 2. Le groupe 3 comprend les HTP compliquant les maladies respiratoires chroniques hypoxémiantes, le groupe 4, l'HTP post-embolique chronique. Le groupe 5 comprend les HTP secondaires à des pathologies diverses, hématologiques, systémiques, métaboliques ou autres<sup>382</sup>.

La prévalence de l'HTAP est d'environ 15 à 50 par millions d'individus en Europe<sup>384</sup>, 15 cas par million en France. Elle représente seulement 10% des HTP mais suscite beaucoup d'intérêt pour la compréhension de sa physiopathologie et le développement de nouveaux traitements.

<b>1. Hypertension artérielle pulmonaire</b>
HTAP idiopathique HTAP héritable (mutation de BMPR 2, ALK-1, endoglin ou inconnue) HTAP induite par la prise d'anorexigènes ou toxiques HTAP associée à : connectivites hypertension portale infection par le virus de l'immunodéficience humaine cardiopathies congénitales bilharziose anémie hémolytique chronique HTAP persistante du nouveau-né Maladie veino-occlusive et/ou hémangiomasose capillaire pulmonaire
<b>2. Hypertension pulmonaire due à une cardiopathie gauche</b>
Dysfonction systolique Dysfonction diastolique Valvulopathie
<b>3. Hypertension pulmonaire due à une affection respiratoire et/ou une hypoxémie</b>
Bronchopneumopathie chronique obstructive Pneumopathies interstitielles Affection respiratoire associant un syndrome restrictif et obstructif Syndrome d'apnée du sommeil et autres syndromes d'hypoventilation alvéolaire Séjour prolongé en haute altitude
<b>4. Hypertension pulmonaire post-embolique chronique</b>
<b>5. Divers</b>
Affections hématologiques : syndromes myéloprolifératifs, splénectomie Maladies systémiques : sarcoïdose, histiocytose X, lymphangioléiomyomatose, neurofibromatose, vascularite Affections métaboliques : glyco-génose, maladie de Gaucher, dysthyroïdies Autres : médiastinites fibreuses, obstruction tumorale, insuffisance rénale chronique dialysée
Tableau 4 : Classification OMS des hypertensions pulmonaires (Dana Point, 2008).

Concernant le rôle de progéniteurs endothéliaux dans l'HTP, Marsboom *et al* ont décrit une diminution des capacités pro-angiogènes des CFU-EC chez la souris <sup>385</sup>. Ces résultats suggèrent l'existence d'un mécanisme compensatoire de mobilisation et recrutement de PEC dans l'HTP mais qui se révèle insuffisant car ces cellules présentent un défaut de fonctionnalité. L'ensemble de ces études n'est pas en faveur d'un rôle pathogène des PEC dans ce modèle, comme l'appuie l'aggravation de l'HTP chez les souris EPOR<sup>-/-</sup> chez qui la mobilisation des PEC est complètement inhibée <sup>386</sup>.

Les études réalisées chez l'homme ont montré des résultats contradictoires ne permettant pas de conclure sur le rôle exact des PEC, à la fois en termes de quantification et de fonctionnalité.

Certains ont observé une diminution du nombre de PEC en comparaison à des sujets contrôles. Diller *et al* ont observé une diminution des cellules CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> dans l'HTAP idiopathique et le syndrome d'Eisenmenger <sup>387</sup>. Fadini *et al* ont décrit une diminution des cellules CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> dans l'HTP secondaire à la fibrose pulmonaire idiopathique <sup>262</sup>. Junhui *et al* ont montré une diminution des cellules CD133<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> et des CFU-EC dans l'HTAP idiopathique <sup>388</sup>. Cette diminution pourrait s'expliquer par un défaut de mobilisation des cellules. En effet, une baisse d'expression de la eNOS au niveau des lésions plexiformes pulmonaires <sup>389</sup>, des concentrations élevées de diméthylarginine asymétrique (ADMA), inhibiteur de la NOS <sup>390</sup>, et la présence de marqueurs d'inflammation <sup>391</sup> ont été observés,

conduisant tous à une altération de la mobilisation des cellules progénitrices. Cette diminution pourrait aussi être le reflet d'une tentative de réparation endothéliale avec consommation des progéniteurs qui se révèle insuffisante pour pallier les lésions endothéliales existantes/continues. D'ailleurs, la capacité angiogène des CFU-EC semble altérée dans l'HTAPI<sup>388</sup> et chez les patients ayant un syndrome d'Eisenmenger<sup>387</sup>, ainsi que la production de facteurs angiogènes<sup>387</sup>. Cet épuisement pourrait aussi être lié à une grande mobilisation des PEC lors de la formation des lésions plexiformes, dont l'accès est facilité par une néovascularisation importante de l'adventice<sup>392</sup>.

A l'inverse, d'autres groupes ont décrit une augmentation des PEC dans l'HTP. Asosingh *et al* ont montré une augmentation des CFU-EC et des cellules progénitrices circulantes CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> dans l'HTAP idiopathique, sans modification du nombre d'ECFC, dans le sang périphérique et au niveau des artères pulmonaires, ainsi qu'une corrélation entre le nombre de cellules CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> et la PAP<sup>393</sup>. Les capacités prolifératives des CFU-EC étaient accrues chez ces patients. Yao *et al* ont identifié des cellules CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> au sein des tissus endartériectomisés de patients souffrant d'HTP thromboembolique chronique<sup>394</sup>. Toshner *et al* ont décrit une augmentation des cellules CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> dans l'HTAP idiopathique<sup>5</sup> ainsi que la présence de cellules progénitrices (CD45<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> ou c-kit<sup>+</sup>) au niveau des lésions vasculaires pulmonaires, telles que les lésions plexiformes et les lésions occlusives. L'origine de ces cellules, résidentes ou provenant de la circulation n'est pas connue. Cependant, l'expression de SDF-1 et de son récepteur le CXCR4 au niveau des lésions est en faveur d'un mécanisme de mobilisation des cellules<sup>5</sup>, ainsi que l'amélioration de l'hypertension lors de l'inhibition du recrutement de cellules progénitrices par la voie SDF-1/CXCR4<sup>395</sup>. Par ailleurs, un phénotype hyperprolifératif des ECFC de patients souffrant d'HTAP idiopathique et mutés pour le récepteur BMPRII a été décrit, ainsi qu'une diminution de leur capacité à former un réseau vasculaire, en comparaison à des sujets contrôles<sup>5</sup>.

### 1.3.3.2. Pathologies cardiovasculaires

#### 1.3.3.2.1. Artériopathie périphérique

La maladie occlusive artérielle athérosclérotique touchant les extrémités inférieures est aussi connue sous le nom d'artériopathie périphérique. Cette affection touche 8 à 12 millions d'individus aux Etats-Unis, et la prévalence en Europe et en Asie est en augmentation. Le stade ultime de l'évolution de l'artériopathie des membres inférieurs est l'ischémie dite critique, ou artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI). Elle est définie par des douleurs ischémiques au repos depuis plus de 2 semaines, une ulcération, ou une gangrène du pied ou des orteils, avec une pression artérielle systolique mesurée au niveau de la cheville, inférieure à 50 mm de mercure (Hg), et/ou une pression artérielle systolique mesurée au niveau des orteils, inférieure à 30 mmHg<sup>396</sup>. L'évolution clinique est le plus souvent péjorative. Ainsi, le taux d'amputation est de l'ordre de 25% après un an d'évolution. Les localisations multifocales de l'athérosclérose et l'âge moyen élevé des patients expliquent aussi l'importante mortalité observée dans cette maladie. Dans tous les cas, la restauration d'une perfusion par pontage ou angioplastie doit être envisagée en première intention. Elle n'est cependant réalisable que dans 70% des cas. De plus, la perméabilité des pontages, surtout dans l'ischémie critique, est médiocre puisqu'elle ne dépasse pas 50 à 70% 3 ans après la chirurgie. L'occlusion des pontages est donc une cause

fréquente d'ischémie critique aiguë des membres inférieurs. Lorsque la revascularisation est impossible, les prostanoïdes ont été essayés, mais sans succès probant<sup>397</sup>. Aucune autre thérapeutique n'a démontré son efficacité dans ce contexte. Le traitement actuel repose donc sur les soins locaux des troubles trophiques associés éventuellement à une antibiothérapie prescrite par voie générale. La survie de ces patients est très compromise à court terme.

Dans l'AOMI a lieu une angiogenèse réactionnelle en réponse à l'hypoxie résultant de l'occlusion artérielle athérosclérotique. Comme abordé dans le paragraphe 1.1., ce contexte d'hypoxie va entraîner la mobilisation de PEC, grâce notamment à la sécrétion de VEGF et à la stabilisation de HIF. Les travaux retrouvés dans la littérature qui explorent le lien entre progéniteurs endothéliaux et artériopathie périphérique sont axés sur leur mobilisation après un exercice physique ou sur leur potentiel en tant que biomarqueur de la sévérité de la maladie.

Comme évoqué dans le paragraphe 1.4.2.1.4., l'exercice physique augmente les PEC définis comme CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> chez des patients atteints d'artériopathie périphérique, mais diminue le nombre de PEC lorsqu'on prend en compte la négativité du CD31 et du CD146<sup>155</sup>. Une autre étude chez des patients atteints d'artériopathie périphérique, montre que l'exercice physique permet d'augmenter significativement le nombre de CFU-EC, parallèlement à une diminution de la diméthylarginine asymétrique, un inhibiteur de la NOS, reflétant ainsi un processus angiogène augmenté et une restauration de la fonction endothéliale<sup>156</sup>. Par ailleurs ce taux de CFU-EC pourrait servir de marqueur de sévérité en regard de la classification de Fontaine, le nombre de CFU-EC diminuant dans les phases avancées de l'artériopathie périphérique<sup>398</sup>.

A notre connaissance, seule notre équipe a étudié à ce jour le rôle des ECFC dans la physiopathologie de l'artériopathie périphérique<sup>399, 400</sup>. Ce type d'étude fait l'objet d'un des travaux présentés dans cette thèse.

#### 1.3.3.2.2. *Insuffisance cardiaque et syndromes coronariens aigus*

L'insuffisance cardiaque (IC) est un syndrome clinique complexe qui peut résulter de n'importe quel trouble cardiaque structurel ou fonctionnel qui porte atteinte à la capacité du ventricule à se remplir de sang ou à l'éjecter. Les manifestations cardinales de l'IC sont la dyspnée et la fatigue, ce qui peut limiter la tolérance à l'effort, et la rétention d'eau, ce qui peut conduire à une congestion pulmonaire et un œdème périphérique. Toutes ces anomalies peuvent nuire à la capacité fonctionnelle et la qualité de vie des personnes atteintes, mais ils ne dominent pas nécessairement le tableau clinique au même moment. Certains patients présentent une intolérance à l'exercice, mais peu de signes de rétention hydriques, tandis que d'autres se plaignent principalement de l'œdème et rapportent peu de symptômes de dyspnée ou de fatigue. Comme tous les patients n'ont pas de surcharge de volume au moment de l'évaluation initiale ou ultérieure, le terme «insuffisance cardiaque» est préféré au terme «insuffisance cardiaque congestive»<sup>401</sup>.

Les syndromes coronariens aigus (SCA) sont un spectre de présentations cliniques comprenant l'angine de poitrine (ou angor) instable et l'infarctus du myocarde (IDM). Les SCA sont provoqués par l'obstruction partielle ou totale de la circulation sanguine dans les artères coronaires, généralement à la suite d'une rupture de plaque d'athérosclérose et d'une thrombose consécutive. Le processus aboutit à l'IDM, comprenant les IDM avec élévation du segment ST («*ST elevation myocardial infarction*», STEMI) et les IDM sans

décalage du segment ST (« *non-ST elevation myocardial infarction* », NSTEMI) objectivé à l'électrocardiogramme, si l'occlusion de l'artère coronaire persiste jusqu'à la nécrose des cardiomyocytes. Le symptôme le plus typique dans les SCA est une douleur thoracique causée par l'ischémie myocardique aiguë. L'angor stable est défini par un angor sans changement de fréquence ou de présentation pendant les 6 semaines précédant le diagnostic. L'angor stable est contrôlé par le repos et / ou les médicaments anti-angoreux par voie sublinguale / orale / transcutanée (pour revue, cf<sup>402</sup>).

La réduction du nombre de PEC est considérée actuellement comme un mécanisme par lequel les facteurs de risque exercent un effet négatif sur la fonction cardiovasculaire et, ainsi, participe à l'apparition et/ou aggrave les maladies cardiovasculaires. Une des hypothèses serait qu'un patient avec un faible taux de PEC serait plus sensible au développement ou à la progression des maladies cardiovasculaires en raison de la réparation endothéliale défectueuse et du défaut de revascularisation compensatoire d'une ischémie tissulaire.

Hill *et al*<sup>36</sup> ont été les premiers à démontrer une corrélation directe entre PEC précoces et la fonction endothéliale *in vivo*. Des études ultérieures ont confirmé la relation entre réactivité vasculaire et PEC ou PEC précoces, dans différentes populations de sujets<sup>403-406</sup>. Ces résultats cohérents obtenus en utilisant différentes méthodologies permettent d'étayer le concept selon lequel les PEC représentent un biomarqueur de la fonction endothéliale. De plus, il existerait une corrélation entre les premiers stades de la maladie cardiovasculaire (lorsque les symptômes sont encore au stade infraclinique des lésions vasculaires) et un taux faible de PEC<sup>67, 407, 408</sup>. Cette diminution du taux de PEC est retrouvée dans les atteintes cardiaques dues à l'athérosclérose, mais également dans l'artériopathie des membres inférieurs et les accidents vasculaires cérébraux où des taux bas de PEC sont associés à une diminution du nombre de PEC précoces et d'ECFC<sup>400, 407, 409</sup>.

A ce jour, une seule étude a inclus un nombre conséquent de sujets<sup>410</sup>. Ainsi, la valeur pronostique du nombre de PEC circulants a été étudiée par Werner *et al*. Cette étude prospective a quantifié le nombre de PEC CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> par cytométrie en flux chez 519 patients coronariens<sup>410</sup>. L'association entre le taux de base des PEC, la mortalité cardiovasculaire, la survenue d'un premier événement cardiovasculaire (infarctus du myocarde, hospitalisation, revascularisation et mort cardiovasculaire) et toute cause de mortalité après 12 mois a été évaluée. La période sans événements cardiovasculaires cumulés a été corrélée au taux de PEC circulants CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>, à la mortalité cardiovasculaire et à la date du premier événement cardiovasculaire. Les taux élevés de PEC ont été corrélés à une faible mortalité cardiovasculaire et à une survenue du premier événement cardiovasculaire plus faible<sup>410</sup>. Des résultats semblables ont été obtenus dans une plus petite cohorte comprenant 43 volontaires sains, 44 coronariens stabilisés et 33 coronariens après un épisode aigu<sup>411</sup>.

De manière étonnante, la seule étude, à ce jour, ayant exploré le taux d'ECFC et la présence de maladies cardiovasculaires dans une cohorte de patients atteints de coronaropathie a révélé des taux élevés de ces cellules<sup>412</sup> associés à une gravité croissante du degré de sténose observée par angiographie. Cette étude n'a jamais été confirmée et l'implication physiopathologique de ce résultat (tentative de réparation?) reste donc à explorer.

Dans le cadre d'événements cardiovasculaires aigus, comme l'infarctus du myocarde<sup>34, 413, 414</sup> ou l'accident vasculaire cérébral<sup>415, 416</sup> les taux de PEC sont augmentés, car ils sont mobilisés à partir de la moelle osseuse dans la circulation sanguine. Les syndromes coronaires aigus et l'infarctus du myocarde entraînent une augmentation du nombre de PEC,

indiquant que la réparation tissulaire induite par les PEC est une réponse "physiologique" de l'organisme après ischémie sévère<sup>413, 414, 417</sup>. L'équipe du Pr. Françoise Dignat-George a montré qu'une courte période d'ischémie accompagnée d'un traumatisme vasculaire limité au cours de l'angioplastie coronaire entraîne une augmentation du nombre de PEC. Ceci démontre que les PEC peuvent être mobilisés en réponse à toute atteinte endothéliale<sup>418, 419</sup> et confirme l'hypothèse de la réponse de l'organisme après une ischémie.

L'augmentation du taux de PEC représente donc une tentative de compensation visant à provoquer une régénération vasculaire et une amélioration de la perfusion, censées circonscrire l'ischémie résiduelle. Cette mobilisation dans le cadre d'événements cardiovasculaires aigus et notamment dans le cas d'infarctus du myocarde a été confirmée pour les ECFC<sup>420, 421</sup>. La présence d'ECFC chez les patients en post IDM a notamment été corrélée à une taille réduite de l'IDM et pourrait donc être considérée comme un marqueur d'intégrité microvasculaire chez les patients en post IDM<sup>421</sup>.

L'équipe de Stefanie Dimmeler a étudié, dans un modèle de patte ischémisée de souris immunodéprimée pouvant recevoir des cellules humaines, les cellules mononucléées de la moelle provenant de patients sains et de patients atteints d'IC. Cette équipe a montré que les cellules issues de patients atteints d'IC avaient des propriétés de revascularisation moindres que celles des patients témoins normaux. Des expériences *in vitro* ont également étudié les propriétés migratoires de ces cellules provenant de patients atteints d'IC. Ces cellules présentent un potentiel de migration vers le VEGF et le SDF-1 diminué, dans un modèle de chambre de Boyden, comparé aux cellules mononucléées issues de patients sains<sup>422</sup>. Une diminution des taux de PEC a également été retrouvée dans les situations d'IC<sup>423</sup> où le taux de PEC a été inversement corrélé au stade d'IC évalué par la classification de la *New York Heart Association* (NYHA) qui permet de quantifier et surveiller le retentissement fonctionnel de l'insuffisance cardiaque<sup>424</sup>.

Une forte mobilisation des PEC semble être associée à un meilleur résultat en termes de récupération de la fonction ventriculaire gauche<sup>413, 425</sup> ou de handicap neurologique<sup>426</sup> après un infarctus aigu du myocarde ou un accident vasculaire cérébral. À l'inverse, dans des conditions pathologiques, telles que la circulation extracorporelle<sup>427</sup>, la réponse angiogène à l'ischémie peut être compromise par l'approvisionnement insuffisant en PEC dans le tissu ischémique.

Dans le syndrome coronarien aigu (547 patients), des taux élevés de PIGF ont été retrouvés, et ont été corrélés à un risque augmenté d'évènements (décès ou IDM non fatal) à 30 jours<sup>428</sup>. Les cardiopathies congénitales peuvent se compliquer d'hypertension artérielle pulmonaire (*cf* § 1.3.3.1.4.). Dans ce contexte, notre équipe a observé que les taux de PIGF, marqueur à la fois de régénération endothéliale et d'inflammation, étaient plus élevés chez les patients atteints d'hypertension artérielle pulmonaire irréversible secondaire à une cardiopathie congénitale<sup>429</sup>. Le PIGF se présentant donc comme un potentiel biomarqueur des pathologies cardiaques, nous nous sommes proposés d'étudier le rôle du système PIGF/VEGFR1 dans la biologie des ECFC, afin de mieux comprendre le rôle de ces cellules dans les syndromes coronariens aigus, l'angor stable et dans le contexte de la chirurgie cardiaque. Ce travail constitue la troisième étude présentée dans cette thèse.

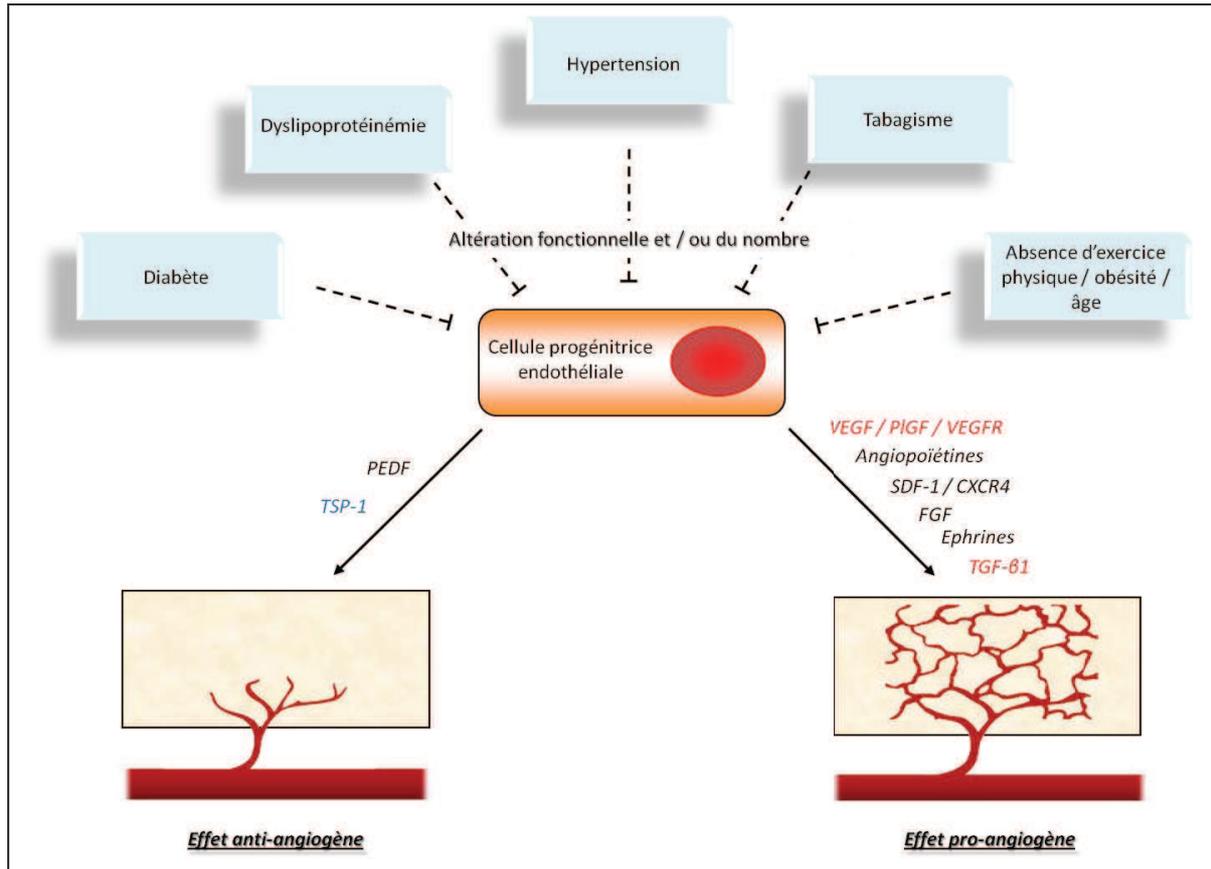


Figure 4 : Principaux facteurs décrits et abordés dans cette thèse, ayant la capacité de moduler les propriétés des PEC. Pour certains facteurs, il existe des données contradictoires, principalement à cause de la définition non standardisée des PEC.

#### **1.4. Conclusion : la définition des PEC reste encore incomplète**

Cette revue de la littérature sur les PEC permet de faire le point sur les connaissances actuelles concernant leurs principales propriétés biologiques et physiologiques. Malgré leurs propriétés vasculogéniques et leur potentiel thérapeutique en biologie vasculaire reconnus, leur définition précise reste à compléter. En effet, l'absence de marqueur phénotypique notamment détectable en CMF rend difficile la caractérisation de ces cellules et peut expliquer en grande partie les discordances observées dans les différents travaux publiés sur les PEC. La plupart des types cellulaires présumés être des PEC serait en fait des sous-types hématopoïétiques à capacité pro-angiogène. Les CFU-EC ou CAC en sont le parfait exemple, et pourraient être mieux étudiées à travers des sous-types phénotypiques de la hiérarchie hématopoïétique déjà établis, plutôt que de chercher à définir de nouveaux marqueurs. Les ECFC quant à eux présentent la capacité à s'intégrer dans les vaisseaux nouvellement formés et constituent donc le sous-type cellulaire correspondant le mieux à l'appellation de progéniteurs voire de précurseurs endothéliaux. C'est également la raison principale justifiant que les travaux de cette thèse sont focalisés sur le comportement et le rôle des ECEC, plutôt que sur ceux des CFU-EC, en pathologie humaine.

Les propriétés des PEC ont largement été étudiées dans le domaine des pathologies tumorales, mais également aux travers des pathologies ischémiques et cardiovasculaires. Il est actuellement reconnu que la présence d'un ou plusieurs facteurs de risque cardiovasculaire est associée à une diminution globale du nombre et/ou de la fonctionnalité des PEC, ce qui suggère donc l'utilité des PEC en tant que biomarqueur dans les pathologies cardiovasculaires, et qu'inversement les pathologies cardiovasculaires pourraient nous aider à améliorer notre compréhension de la biologie des PEC.

L'étude des récepteurs et des agonistes impliqués dans la modulation des propriétés angiogènes des PEC et plus précisément des ECFC, pourrait contribuer à définir un ensemble de marqueurs phénotypiques voire un marqueur spécifique des ECFC.

Cette première partie sur les progéniteurs endothéliaux humains, et notamment leurs rôles en pathologies (vasculaires) humaines, souligne l'importance de mener des études cliniques afin de mieux cerner la biologie des ECFC. En effet, comme l'indique le tableau 5, il existe actuellement peu d'études cliniques établies afin d'étudier la fonction des ECFC dans les pathologies évoquées dans le paragraphe 1.3.3. L'étude du comportement des ECFC dans ces modèles pathologiques représente un moyen intéressant pour améliorer notre compréhension de leur rôle dans l'homéostasie vasculaire, et ainsi de mieux définir les ECFC.

<b>Etude</b>	<b>Nombre de patients (+ population contrôle)</b>	<b>Principales données concernant les ECFC</b>
<b>Fibrose pulmonaire idiopathique</b>		
Smadja DS et al, Angiogenesis 2013 <sup>263</sup>	77	Tendance à la diminution du taux d'ECFC chez les patients FPI, corrélé à la sévérité de la maladie (le taux d'ECFC est plus élevé dans la forme la plus sévère <i>i.e.</i> DLCO < 40%); biodisponibilité moindre des ECFC ou « homing » pulmonaire augmenté. Rôle possible des ECFC dans le remodelage vasculaire pathologique dans la FPI.
<b>Artériopathie oblitérante des membres inférieurs</b>		
Delva P et al, Endothelium. 2008 <sup>430</sup>	69	Taux d'ECFC ainsi que leur activité proliférative augmentés chez les patients atteints d'artériopathie des membres inférieurs sévère.
Smadja DS et al, Cytotherapy 2012 <sup>400</sup>	11	Taux d'ECFC dans le sang périphérique diminué chez les patients atteints ischémie critique.
<b>Syndromes coronariens aigus, maladie coronarienne</b>		
Güven H et al, J Am Coll Cardiol 2006 <sup>412</sup>	48	Corrélation positive entre le taux d'ECFC avec la présence et le degré de sévérité de la maladie coronarienne.
Massa M et al, Exp Hematol 2009 <sup>420</sup>	19 (+ 12 sangs de cordon comme contrôles supplémentaires)	Augmentation du nombre d'ECFC chez les patients présentant un infarctus aigu du myocarde.
Wang CH et al, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2011 <sup>431</sup>	97	Augmentation du potentiel d'activation des ECFC <i>ex vivo</i> (augmentation d'expression de VCAM-1, de la E-selectine, et de ICAM-1 après stimulation par le TNF- $\alpha$ ) aux passages précoces, issus des patients présentant une maladie coronarienne.
Meneveau N et al, Basic Res Cardiol 2011 <sup>421</sup>	88	La présence et le nombre de colonies d'ECFC est corrélée positivement avec la réduction des obstructions microvasculaires et la réduction de la taille de la zone infarctie chez les patients présentant un infarctus aigu du myocarde.
Compioni D et al, PLoS One 2013 <sup>432</sup>	70	Les cellules mononucléées périphériques (PBMC) isolées entre 7 et 14j du diagnostic de SCA génèrent des ECFC chez 13% des patients (contre 77% pour les CFU-EC); cette génération d'ECFC est corrélée à une sécrétion augmentée de PDGF-AA par les PBMC correspondants; après expansion, ces ECFC présentent une expression (analyse par FISH) uniforme des CD105, CD31, CD146, VWF, une expression variable des CD34, CD106, CD184, et sont négatives pour les CD45, CD90, CD117, CD133; expansion clonogénique des ECFC avec capacités prolifératives variables.
<b>Circulation extracorporelle</b>		
Hoesli SJ et al, J Perinatol 2010 <sup>433</sup>	12	Isolement d'ECFC à partir de sang périphérique de nouveau-nés à terme et gravement malades, assistés d'une circulation extracorporelle.

Tableau 5 : Liste des études cliniques pertinentes (juillet 2013) à propos du rôle / de la mobilisation des ECFC dans la fibrose pulmonaire idiopathique, l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs, les syndromes coronariens aigus, la maladie coronarienne et en cas de circulation extracorporelle.

## 2. Biomarqueurs plasmatiques en pathologies vasculaires

### 2.1. Définitions

On retrouve dans la littérature plusieurs définitions du terme « biomarqueur » comportant certaines nuances, notamment selon les différents domaines physiopathologiques concernés.

Un marqueur biologique ou biomarqueur est paramètre indiquant un changement dans l'expression ou l'état d'une mesure biologique (*e.g.* concentration sérique/plasmatique d'une protéine, mesure / « *monitoring* » d'une fonction organique) à un moment donné, qui corrèle avec le risque de progression de la pathologie, ou avec la susceptibilité d'évolution de la maladie à un traitement donné, à un moment futur donné<sup>434</sup>. Lorsqu'un biomarqueur a été validé, il peut être utilisé pour diagnostiquer le risque lié à la maladie, détecter la maladie chez un individu, concevoir/adapter des traitements pour la maladie chez un individu<sup>434</sup>. Dans l'évaluation du potentiel des thérapies médicamenteuses, un biomarqueur peut être utilisé comme un paramètre de substitution pour un effet naturel, comme la survie ou la morbidité irréversible<sup>434</sup>. Si un traitement modifie le biomarqueur, qui présente une implication directe pour améliorer la santé, le biomarqueur sert de critère de substitution pour évaluer les avantages cliniques apportés<sup>434</sup>. Le biomarqueur se substitue alors aux « vrais critères d'évaluation clinique » tels que la mortalité ou la survenue de complications cardiovasculaires, habituellement utilisés pour analyser l'efficacité et la sécurité d'une thérapeutique<sup>435</sup>. De tels critères de substitution permettent théoriquement de raccourcir la durée du suivi et surtout de diminuer l'effectif de l'étude afin de tester plus rapidement une stratégie thérapeutique. Cette définition insiste sur les applications cliniques potentielles qui feront qu'un éventuel biomarqueur sera utilisable en pratique clinique courante.

Une seconde définition décrit un biomarqueur comme étant une caractéristique mesurée objectivement, avec une précision et une reproductibilité suffisantes, évaluée comme indicateur ou marqueur d'un processus biologique, physiologique ou pathologique, ou à la réponse pharmacologique à un traitement<sup>436</sup>. Cette définition souligne les caractéristiques analytiques que doit remplir un potentiel biomarqueur afin d'être utilisable du point de vue de la mesure biologique.

La littérature biomédicale et la terminologie MeSH [le MeSH (*Medical Subject Headings*), thésaurus biomédical de référence, est un outil d'indexation, de catalogage et d'interrogation des bases de données de la NLM (*National Library of Medicine*, Bethesda, USA), notamment MEDLINE/PubMed] réservent le terme de biomarqueurs à des données biochimiques et moléculaires, mesurables et quantifiables, telle qu'une concentration protéique, plutôt qu'à des données morphologiques et fonctionnelles. En raison de l'anatomie du système cardiovasculaire, les biomarqueurs cardiovasculaires sont et seront en principe des biomarqueurs moléculaires obtenus à partir de prélèvements sanguins, c'est-à-dire des biomarqueurs « circulants » plutôt que tissulaires. Les marqueurs génétiques peuvent rentrer dans ce domaine d'application.

Il est à noter que la découverte de nouveaux biomarqueurs évoque de nouveaux mécanismes physiopathologiques et cibles thérapeutiques.

## 2.2. Caractéristiques du biomarqueur idéal

Afin d'être utilisable en pratique clinico-biologique, un potentiel biomarqueur doit remplir un cahier des charges précis.

Les biomarqueurs sont des substances biologiques provenant d'organes, qui peuvent être mesurés et évalués comme indicateurs du fonctionnement biologique normal, du processus pathogène, ou de la réponse pharmacologique à une intervention thérapeutique de l'organe concerné. Leur mesure ne doit pas être soumise à la variabilité « inter-observateur ». Un marqueur biochimique idéal du point de vue clinique, devrait être un indicateur pronostique, devrait faciliter le diagnostic précoce, procurer une image fidèle de la réponse thérapeutique, et aider à la stratification du risque associé à chaque étape de la maladie<sup>437</sup>. Son domaine d'utilisation mise à part, un nouveau biomarqueur n'aura une valeur clinique que si sa mesure est exacte, si sa reproductibilité est obtenue d'une manière standardisée, si elle est acceptable pour le patient, si elle est facile à interpréter par les cliniciens, si elle a une sensibilité et une spécificité élevées vis-à-vis de la pathologie/évolution qu'il est sensé identifier, si elle explique une part raisonnable de l'évolution du phénomène observé, indépendamment des autres biomarqueurs déjà définis, et s'il existe des données suggérant que la connaissance des taux de ce potentiel biomarqueur permettrait d'adapter la prise en charge du patient<sup>438</sup>.

Un biomarqueur en pathologie ne doit pas nécessairement être très informatif du point de vue biologique, par contre il doit posséder une forte corrélation statistique avec plusieurs aspects cliniques de la pathologie en question. En effet, divers biomarqueurs [e.g. *C-reactive protein* (CRP)] ne sont pas nécessairement impliqués dans le mécanisme pathologique concernant le système cardiovasculaire. Du point de vue des paramètres analytiques, il est nécessaire de définir les valeurs seuils permettant de distinguer la population d'individus sains de celle des cas. Il faut donc connaître la distribution des valeurs du potentiel biomarqueur au sein de ces populations. Le choix de ces seuils (95<sup>ème</sup> ou 99<sup>ème</sup> percentiles par exemple) dépend de l'importance du chevauchement entre les deux populations et de la question clinique posée au biomarqueur. Se pose ensuite la question de la précision diagnostique ou prédictive, évaluée en termes de sensibilité (proportion de cas diagnostiqués par le marqueur, *i.e.* de vrais positifs) et de spécificité (d'autant plus importante que la proportion de sujets indemnes non reconnus par le marqueur, *i.e.* de vrais négatifs, est importante). Ces niveaux de sensibilité et de spécificité dépendent de la valeur-seuil choisie (*cut-off*). Les valeurs prédictives, qui prennent en compte la prévalence de la pathologie étudiée, positive (probabilité d'avoir la maladie en cas de test diagnostique positif) et négative (probabilité de ne pas avoir la maladie en cas de test diagnostique négatif) sont également importantes. Les taux de faux négatifs seront d'autant plus importants que la maladie est fréquente ; de même, les taux de faux positifs seront d'autant plus importants que la maladie est rare, malgré un test diagnostique caractérisé par des fortes sensibilité et spécificité.

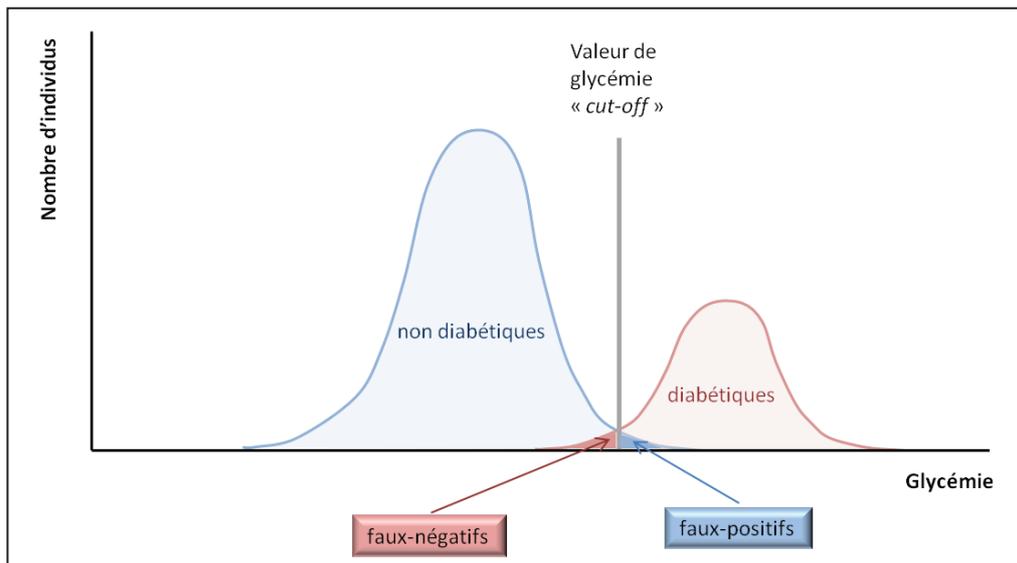


Figure 5 : Représentation schématique illustrant les notions de valeur « cut-off », de faux-négatifs et de faux-positifs. Dans l'exemple choisi, le paramètre biologique servant de biomarqueur est la glycémie pour la pathologie diabétique.

	Malades	Sains	
Test +	<b>A</b> (« VP »)	<b>B</b> (« FP »)	$N1 = A+B$
Test -	<b>C</b> (« FN »)	<b>D</b> (« VN »)	$N2 = C+D$
	$n1 = A+C$	$n2 = B+D$	$N = A+B+C+D$

Tableau 6 : Correspondance entre le résultat d'un test diagnostique (*i.e.* mesure de la concentration d'un biomarqueur) et le nombre de cas diagnostiqués ou non, ou le nombre d'individus sains correctement discriminés ou non. *VP* : Vrai Positifs ; *VN* : Vrai Négatifs ; *FP* : Faux Positifs ; *FN* : Faux Négatifs ; *N1* : Tests positifs ; *N2* : Test négatifs ; *n1* : Malades ; *n2* : Non malades ; *sensibilité* =  $A/n1$  ; *spécificité* =  $D/n2$  ; *valeur prédictive positive VPP* =  $A/N1$  ; *valeur prédictive négative VPN* =  $D/N2$

### 2.3. Biomarqueurs dans la fibrose pulmonaire idiopathique

Avant d'aborder les différents biomarqueurs plasmatiques ou sériques potentiels dans la FPI, il est utile de citer les principaux paramètres physiologiques utilisés en pneumologie en tant que biomarqueurs, que sont la capacité totale pulmonaire (CTP), le volume expiratoire forcé (VEF), la capacité vitale forcée (CVF) et la capacité de diffusion du poumon pour le monoxyde de carbone (DLCO) notamment.

La fonction pulmonaire peut être évaluée grâce à l'index de Tiffeneau [= VEF / CVF].

Les résultats des études concernant ces paramètres étant controversés, il est difficile de conclure que l'évolution de la CVF ou de la DLCO pourrait être des biomarqueurs valides pour la survie dans la FPI.

Un autre test utilisé en pathologies cardiaques et pulmonaires est la distance de marche durant 6 minutes (6-MWD). Ce test a été évalué dans une cohorte de 822 patients atteints de FPI (essai INSPIRE)<sup>439</sup>. Cette étude conclue qu'une diminution de plus de 50 m au test de 6-MWD (6MWT) à 24 semaines, est significativement associée à une augmentation du risque de décès à 1 an chez ces patients FPI.

L'imagerie médicale [scanner haute résolution (HRCT) ou PET scan] est bien sûr indispensable.

Dans les pathologies pulmonaires, un autre milieu biologique et couramment exploré. Il s'agit des fluides de lavage broncho-alvéolaire (BALF) où les taux de différentes protéines ou cellules retrouvées également dans la circulation périphérique peuvent être hautement informatifs. Les divers candidats au statut de biomarqueurs dans la FPI sont donc évalués dans ces différents milieux dans les études sur ce sujet.

#### 2.3.1. Biomarqueurs diagnostiques

##### *Krebs von den lungen-6 antigen (KL-6)*

Il s'agit d'une glycoprotéine « *mucin-like* », découverte en 1989<sup>440</sup>, exprimée à la surface extracellulaire des cellules alvéolaires de type II et des cellules épithéliales bronchiolaires<sup>441</sup>. C'est un facteur chimiotactique qui favorise la migration<sup>442</sup>, la prolifération et la survie<sup>443</sup> des fibroblastes pulmonaires.

Plusieurs études retrouvent des taux sériques significativement élevés de KL-6 chez des patients atteints de FPI<sup>444, 445</sup> ou autres PIP<sup>444</sup> par rapports aux volontaires sains. De plus ces taux sériques de KL-6 corrélient avec ceux retrouvés dans le BALF<sup>442</sup> reflétant une production pulmonaire de KL-6 accrue<sup>446</sup>. Le dosage sérique de KL-6 présente par ailleurs la meilleure précision pour le diagnostic de PIP comparé aux dosages de protéines A et D du surfactant<sup>445</sup> et aurait un rôle mécanistique plausible dans le développement de la fibrose pulmonaire.

##### *Protéines A et D du surfactant (SP-A & SP-D)*

Les surfactants pulmonaires sont des complexes lipoprotéiniques synthétisés par les cellules Clara des voies respiratoires et les cellules épithéliales alvéolaires, et sécrétés dans une couche de liquide qui recouvre l'endothélium<sup>447</sup>. Le rôle du surfactant est d'abaisser les forces de tension superficielle à l'interface air-liquide dans le poumon, ce qui lui permet de

s'étirer plus facilement lors de l'inhalation et de prévenir un collapsus lors de l'expiration. De plus le surfactant joue un rôle de protection contre divers agents pathogènes.

Dans ces complexes lipoprotéïques, la part protéique représente 5 à 10% <sup>448</sup>. La SP-A et la SP-D sont des membres du sous-groupe collectine de la famille lectine de type C.

Les taux de SP-A dans le BALF sont significativement plus faibles chez les patients atteints de FPI comparativement aux contrôles, mais non significativement différents par rapport aux autres PIP <sup>444</sup>. A l'inverse, les taux sériques de SP-A sont significativement plus élevés chez les patients atteints de FPI comparativement aux sujets sains <sup>444, 445, 449</sup> et aux patients avec d'autres PIP <sup>444</sup>. Le taux sérique de SP-A pourrait donc être un biomarqueur diagnostique discriminant pour la FPI.

Contrairement à la SP-A, les taux de SP-D dans le BALF ne sont pas significativement différents par rapport aux sujets sains, mais significativement plus faibles chez les patients atteints de FPI comparativement aux autres PIP <sup>444</sup>. Les taux sériques de SP-D sont significativement plus élevés chez les patients atteints de FPI comparativement aux sujets sains et aux patients avec d'autres PIP <sup>444, 445, 449</sup>.

### *Périostine*

La périostine est une protéine de la MEC qui peut contribuer à la fibrose dans les poumons, le cœur et la moelle osseuse <sup>450</sup>, et qui peut être excrétée par les cellules épithéliales bronchiques en réponse à l'interleukine-13 (IL-13) <sup>451</sup>. Des analyses d'immunohistochimie suggèrent que le pourcentage de tissu pulmonaire exprimant la périostine est significativement plus élevé chez les patients atteints de FPI comparativement aux autres PIP ou aux sujets sains <sup>450</sup>.

### *Métalloprotéases matricielles 1 et 7 (MMP-1 et MMP-7)*

Les MMP sont structurellement et fonctionnellement de la famille des protéases à « doigt de zinc » impliquées dans la dégradation des composants de la MEC <sup>452</sup>. La MMP-1 est la collagénase interstitielle la plus exprimée et dégrade les collagènes fibrillaires <sup>453</sup>. La MMP-7 est le plus petit membre de la famille des MMP et peut dégrader divers composants de la MEC.

L'expression de la MMP-7 a été localisée à la surface des cellules épithéliales et des macrophages alvéolaires dans les tissus pulmonaires de patients atteints de FPI, mais elle n'est pas retrouvée dans les tissus pulmonaires sains. De plus, les taux sériques de MMP-7 dans le BALF sont plus élevés chez les patients FPI que chez les sujets sains, ce qui pourrait être en faveur d'une corrélation avec l'activité pulmonaire. Cependant la MMP7 ne serait pas spécifique de la FPI, puisque son expression dans le BALF et les tissus pulmonaires n'est pas significativement différente par rapport aux autres PIP <sup>454-457</sup>.

Les taux de MMP-7 dans le BALF ont été négativement corrélés avec la CVF <sup>455</sup>. De même pour les taux sériques de MMP-7 qui sont inversement corrélés avec la CVF et la DLCO <sup>458</sup>.

D'une manière générale, les taux sériques et dans le BALF de MMP-1 et MMP-7 sont significativement plus élevés chez les patients atteints de FPI comparativement aux sujets sains <sup>458</sup>. Séparément, les taux de MMP-1 ou de MMP-7 ne permettent pas de discriminer les patients FPI des sujets sains, cependant une approche combinée y parvient (MMP-1  $\geq$  2.15 ng/mL et MMP-7  $\geq$  1.99 ng/mL).

### 2.3.2. Biomarqueurs pronostiques

#### *Brain natriuretic peptide (BNP)*

Le BNP est un peptide sécrété par les cardiomyocytes en réponse à une augmentation de volume ou de pression<sup>459</sup>. Chez les patients avec une insuffisance cardiaque décompensée, les taux sériques élevés de BNP sont indépendamment associés avec la mortalité<sup>460</sup>. Les taux de BNP ont également été étudiés comme marqueurs d'hypertension pulmonaire et d'insuffisance ventriculaire droite<sup>461</sup>.

La relation entre les concentrations sériques de BNP et la survie de patients atteints de FPI a été étudiée par Song *et al*<sup>462</sup>, dans une cohorte de 131 patients. Notamment, la survie moyenne de patients FPI avec des taux sériques élevés de BNP était de 11 mois, significativement plus courte que la moyenne de survie de 22.5 mois des patients FPI avec des taux normaux de BNP. En analyse multivariée, ces taux élevés de BNP se présentaient donc comme un prédicteur indépendant de la mortalité. En effet, le taux de mortalité à 1 an des patients atteints de FPI avec des taux sériques élevés de BNP était de 70.5% contre 23.7% pour les patients avec des taux normaux. Même si le BNP n'est pas mécaniquement relié à la pathogenèse de la FPI, ces résultats suggèrent qu'il pourrait servir de biomarqueur pronostique dans cette pathologie.

#### *Albumine*

Zisman *et al*<sup>463</sup> ont étudié l'association entre l'hypoalbuminémie et la survie de 1269 patients atteints de FPI (et d'autres types de PIP) à un stade avancé et qui étaient en liste d'attente pour transplantation pulmonaire. Dans cette étude, les plus faibles concentrations sériques d'albumine étaient fortement associées et de manière indépendante avec une augmentation de la mortalité. Malgré que l'albumine ne soit pas impliquée dans le développement de la FPI, ces résultats suggèrent que l'hypoalbuminémie pourrait servir de biomarqueur pronostique dans cette pathologie.

#### *Krebs von den lungen-6 antigen (KL-6)*

Dans une étude prospective portant sur 152 patients atteints de FPI notamment, les patients avec un taux sérique de KL-6 > 1000 U/mL présentaient une survie aggravée par rapport aux patients avec des taux moindres<sup>464</sup>, démontrant ainsi une corrélation indépendante avec le taux de survie (analyse multivariée).

#### *Protéines A et D du surfactant*

Les taux sériques élevés de SP-A mesurés lors du diagnostic ont été indépendamment associés au décès dans 3 études différentes<sup>449, 465, 466</sup>, et 2 de ces études ont montré que des les taux sériques élevés de SP-D étaient associés à une mortalité augmentée<sup>449, 466</sup>.

Cependant dans ces études, des écart-types importants ont été observés pour les mesures des concentrations de SP-A et SP-D, posant la question de la reproductibilité de ces mesures, et constituant donc une limitation à leur utilisation en tant que biomarqueur.

#### *Périostine*

Les taux sériques élevés de périostine pourraient être corrélés avec une diminution plus importante de la capacité vitale sur une période de 6 mois <sup>450</sup>.

#### *Métalloprotéase matricielle 7 (MMP-7)*

Récemment Richards *et al* <sup>467</sup> ont analysé les concentrations de 92 protéines chez 241 patients FPI. Cinq de ces protéines (MMP-7, ICAM-1, IL-8, VCAM-1 et S100A12) ressortent significativement associées avec le décès et/ou la progression de la maladie ; notamment les taux sériques de MMP-7 > 4.3 ng/mL étaient indépendamment associés à une augmentation de la mortalité dans une cohorte dérivée de 140 patients FPI.

#### *CC Chemokine Ligand 18 (CCL18)*

Le CCL18 est une petite chimiokine comportant le motif « CC », produite par les cellules myéloïdes humaines <sup>290</sup>, et qui sert de chimioattractant pour guider la migration des cellules. Il est connu pour déclencher des réponses biologiques *in vitro* dans les cellules lymphoïdes B & T, les cellules dendritiques, les progéniteurs hématopoïétiques, les fibroblastes et potentiellement les monocytes/macrophages, mais pas dans les neutrophiles <sup>303</sup>. Il dérive des macrophages alvéolaires dans une large variété de pathologies pulmonaires fibrotiques incluant la FPI, et stimule la production de collagène par les fibroblastes pulmonaires <sup>303, 468</sup>. Chez les patients FPI, les taux sériques et dans le BALF de CCL18 sont significativement augmentés par rapport aux sujets sains, et corrént négativement avec la capacité totale pulmonaire et la DLCO <sup>469</sup>. Les taux sériques de CCL18 pourraient avoir une valeur pronostique. En effet, dans une étude de 72 patients FPI, le taux sérique de base de CCL18 était corrélé à des modifications de la CTP et de la CVF sur une période de 6 mois <sup>290</sup>. Une analyse multivariée a montré que des taux de CCL18 > 150 ng/mL étaient indépendamment associés avec le décès chez les patients FPI.

Le CCL18 pourrait jouer un rôle dans le développement de la fibrose mais de façon non spécifique. Ainsi ces données positionnent le CCL18 comme un potentiel biomarqueur pronostique de la FPI.

#### *YKL-40*

YKL-40 est une protéine « *chitinase-like* » qui régule la prolifération cellulaire et la survie. Elle n'est pas spécifique de la FPI, puisque des taux élevés sont également retrouvés dans la fibrose hépatique <sup>470</sup>, la sarcoïdose <sup>471</sup>, la broncho-pneumopathie chronique obstructive <sup>472</sup> et l'asthme <sup>473</sup>. Malgré que son mécanisme d'action ne soit pas clairement élucidé, YKL-40 semble avoir des effets mitogéniques sur les fibroblastes pulmonaires <sup>474</sup> et induirait la sécrétion de cytokines profibrotiques et pro-inflammatoires par les macrophages alvéolaires <sup>472</sup>.

Le marquage immunohistochimique révèle une localisation de YKL-40 au niveau de cellules épithéliales bronchiolaires et des macrophages alvéolaires adjacents aux zones fibrotiques chez les patients FPI <sup>475</sup>. De plus chez ces patients, les taux sériques et dans le BALF de YKL-40 sont significativement plus élevés par rapport aux sujets sains <sup>475</sup>. Cependant il n'y a pas de corrélation entre les taux sériques et ceux du BALF. Par contre les taux sériques sont inversement corrélés avec la DLCO et la PaO<sub>2</sub>.

De façon intéressante, Korthagen *et al* ont observé chez les patients FPI que les taux sériques de YKL-40 > 79 ng/mL étaient associés à une survie médiocre, de même que les taux dans le BALF > 17 ng/mL<sup>476</sup>.

De part son manque de spécificité, le YKL-40 ne serait pas un bon biomarqueur diagnostique mais pourrait être un potentiel biomarqueur pronostique.

### *Lymphocytes T*

Les lymphocytes T ont été montrés comme étant le type de cellules mononucléées prédominant dans les poumons de patients atteints de FPI, et la densité de cellules CD3<sup>+</sup> comme un marqueur significatif de faible survie<sup>477</sup>. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dans le parenchyme pulmonaire sont significativement corrélés à une fonction pulmonaire diminuée<sup>478</sup>, et le pourcentage de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés a été retrouvé comme significativement plus important dans les BALF de patients asymptomatiques atteints de PIP comparativement à des sujets sains<sup>479</sup>.

Dans une étude de 89 patients FPI, la proportion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> totaux exprimant le CD28 (CD28%) était significativement plus importante chez les sujets sains contrôles par rapport aux 89 cas<sup>480</sup>. Ces données suggèrent que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>/CD28<sup>+</sup> sont régulés négativement dans la FPI. Dans un sous-groupe de patients de cette étude, le CD28% a été corrélé à la DLCO et la CVF. Les auteurs concluent finalement qu'un CD28% < 82 est associé significativement à une survie médiocre.

Kotsianidis *et al*<sup>481</sup> ont étudié la population de lymphocytes T régulateurs (Treg) CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/FOXP3<sup>+</sup> dans une large cohorte incluant 21 mâles atteints de FPI. Comparé aux contrôles sains et aux patients atteints d'autres PIP, le pourcentage de Treg était diminué dans les BALF et le sang périphérique des patients FPI. Malgré une absence de corrélation entre le nombre de Treg et les tests évaluant les fonctions pulmonaires, il y avait une corrélation significative entre la fonction des Treg et la CVF ainsi que la CTP.

Le rôle des lymphocytes T dans la pathogenèse de la FPI reste à éclaircir, cependant, autant les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>/CD28<sup>+</sup> que les Treg pourraient avoir une utilité en tant que biomarqueurs pronostiques dans la FPI.

### *Fibrocytes circulants*

Les fibrocytes circulants peuvent être assimilés à des cellules progénitrices mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse capables de produire les composants de la MEC, et de se (dé)différencier en fibroblastes et myofibroblastes lors d'un processus de cicatrisation<sup>482</sup>. Le recrutement diminué des fibrocytes a été démontré comme protecteur vis-à-vis de la fibrose dans des modèles murins<sup>483</sup>, corroborant un rôle mécanistique dans le développement de la fibrose pulmonaire. Par ailleurs, des fibrocytes ont été détectés dans des tissus pulmonaires humains de patients FPI, et pourraient être recrutés dans les poumons via le système SDF-1/ CXCR4<sup>484</sup>.

Moeller *et al*<sup>485</sup> ont étudié la quantité et l'importance des fibrocytes circulants exprimant le CD45 et le collagène-1 (Col-1) chez des patients FPI avec une maladie stable et des exacerbations aiguës. Une analyse rigoureuse de cette étude montre qu'il n'y a pas de corrélation entre le compte de fibrocytes CD45<sup>+</sup>/Col-1<sup>+</sup> avec les paramètres cliniques de sévérité de la maladie incluant la CPT, la CVF, la DLCO, le 6-MWD, et la score de sévérité au scanner haute résolution. Cependant, la survie pour les patients avec plus de 5% de

fibrocytes était plus mauvaise que pour les patients avec un pourcentage plus faible de fibrocytes, malgré que la majorité de ce sous-groupe comprenait des patients avec exacerbations aigües.

Les fibrocytes circulants pourraient jouer un rôle important dans la pathogenèse de la fibrose pulmonaire, et auraient donc une utilité en tant que biomarqueur pronostique.

### *VEGF*

Malgré que la majorité des PIP soit associée à un remodelage vasculaire aberrant, le rôle du VEGF dans la pathogenèse de la FPI n'a pas encore été clairement défini <sup>486</sup>.

Dans 2 études séparées, les taux de VEGF dans le BALF de patients FPI étaient significativement plus bas que ceux d'individus sains non-fumeurs <sup>487, 488</sup>. De nombreuses études ont ainsi évalué les taux de VEGF dans les BALF et le sang, mais il en sort des résultats contradictoires. Ainsi le VEGF ne serait pas un biomarqueur approprié, du moins à visée diagnostique, dans la FPI <sup>488, 489</sup>. Cependant, Ando *et al* ont décrit une tendance des taux sériques de VEGF chez les patients FPI (au dessus de la médiane), à corrélérer avec une survie médiocre, comparativement aux patients avec des taux de VEGF plus faibles (en dessous de la médiane) <sup>490</sup>.

Le VEGF pourrait donc servir potentiellement de biomarqueur pronostique.

### **2.3.3. Biomarqueurs de suivi**

#### *Périostine*

Plusieurs études ont montré que l'IL-13 est impliquée dans la prolifération des fibroblastes <sup>491-494</sup>, et qu'elle pourrait donc contribuer au développement de la FPI. En tant que marqueur de l'expression de l'IL-13 chez les patients asthmatiques, les taux sériques élevés de périostine pourrait servir à définir le groupe de patients bons répondeurs vis-à-vis d'un traitement par un anticorps anti-IL-13 (Lebrikizumab) <sup>495</sup>. Une utilisation similaire du taux sérique de périostine pourrait permettre de prédire la réponse à un traitement chez les patients atteints de FPI.

#### *Ostéopontine*

L'ostéopontine est une glycoprotéine acide phosphorylée qui fonctionne comme une cytokine pro-inflammatoire clé, impliquée dans la réponse immune et la réparation tissulaire <sup>496, 497</sup>. Elle favorise la migration, l'adhésion, et la prolifération des fibroblastes dans les modèles murins de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine <sup>498</sup>.

L'expression d'ARN messagers de l'ostéopontine dans les tissus pulmonaires de patients FPI est significativement plus importante que chez les contrôles sains. Le marquage immunohistochimique montre que l'ostéopontine est localisée dans les cellules épithéliales alvéolaires et les macrophages <sup>499</sup>. Dans certains modèles expérimentaux, l'ostéopontine induit la prolifération et la migration des fibroblastes et des cellules épithéliales, et favorise le dépôt de MEC, ce qui lui suggère un plausible rôle mécanistique dans le développement de la fibrose <sup>499</sup>.

Les taux d'ostéopontine dans le BALF sont significativement plus élevés chez les patients FPI que chez les contrôles sains <sup>499</sup>. Dans une étude incluant 17 patients atteints de PIP dont 8 FPI, Kadota *et al* ont démontré que les concentrations plasmatiques d'ostéopontine étaient significativement plus élevées chez les patients PIP que chez les contrôles sains et chez les sujets atteints de sarcoïdose <sup>500</sup>. Des concentrations de 300 à 380 ng/mL pourraient discriminer les patients PIP des sujets sains, mais il n'y a pas de différences significatives de concentrations plasmatiques d'ostéopontine entre les patients FPI et les autres PIP. L'ostéopontine plasmatique est inversement corrélée avec la PaO<sub>2</sub>, mais pas avec la CVF ou la DLCO.

Du fait de ces caractéristiques, l'ostéopontine pourrait servir de biomarqueur de suivi dans la FPI.

D'après les caractéristiques décrites dans les paragraphes précédents, la MMP-7, le CCL18, le YKL-40, ainsi que les lymphocytes T auraient également le potentiel pour servir de biomarqueur de suivi de l'évolution de la FPI.

Biomarqueur potentiel	diagnostique	pronostique	de suivi
BNP		✓	
Taux d'albumine		✓	
KL-6	✓	✓	
Protéine A du surfactant	✓	✓	
Protéine D du surfactant	✓	✓	
Périostine	✓	✓	✓
MMP1	✓*		
MMP7	✓*	✓	✓
CCL18		✓	✓
YKL-40		✓	✓
Lymphocytes T		✓	✓
VEGF		✓	
Fibrocytes circulants		✓	
Ostéopontine			✓

Tableau 7: Principales protéines / cellules candidates actuellement décrites dans la littérature en tant que biomarqueur potentiel dans la FPI. \* MMP1 et MMP7 en association permettent le diagnostic.  
Adapté de Vij R & Noth I, Transl Res. 2012;159:218-227

### 2.3.4. Autres biomarqueurs potentiels dans la FPI

#### *PEDF*

D'autres études sont également nécessaires pour évaluer si les taux de PEDF dans le sang ou les BALF peuvent être utilisés comme un biomarqueur prédictif potentiel de l'activité de la FPI et, par conséquent, du pronostic. Certaines études ont donné des résultats intéressants dans le domaine de l'oncologie (avec des taux diminués de PEDF en tant que biomarqueur prédictif de mauvais pronostic), et récemment aussi chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque<sup>501-504</sup>.

#### *FGF-2*

Bien que des taux réduits de FGF-2 dans les tissus fibreux sont compatibles avec une densité capillaire diminuée, et suggèrent une contribution potentielle à l'apoptose des CE et à une raréfaction vasculaire, le FGF-2 pourrait également être impliqué dans la croissance des CMLV, de manière comparable à l'hypertension pulmonaire chez l'homme et aux modèles expérimentaux animaux d'hypertension pulmonaire. Ces données suggèrent que le FGF-2 pourrait avoir un rôle dans le remodelage vasculaire des fibroses pulmonaires<sup>505, 506</sup>. La pertinence du FGF-2 dans la FPI est actuellement à éclaircir: le FGF-2 pourrait contribuer à réduire l'apoptose des CE, mais la détermination des effets globaux du FGF-2 sur le processus de fibrose et le remodelage nécessitent des investigations complémentaires, de même que le potentiel du FGF-2 en tant que biomarqueur.

#### *Chimiokines CXC*

Les résultats contradictoires des différentes études existantes s'expliquent probablement par la grande hétérogénéité de la pneumonie interstitielle commune humaine en termes d'angiogenèse, avec la preuve de la prolifération des CE et de la densité capillaire augmentée dans les régions d'« interface » directement adjacentes au tissu fibreux, où l'apoptose des CE et la raréfaction vasculaire dominent<sup>259, 260</sup>. La fonction exacte des chimiokines de type CXC dans la FPI et la physiopathologie de l'hypertension pulmonaire (processus de contre-régulation, contribution au remodelage de l'artère pulmonaire, réponse à une blessure épithéliale ou une inflammation) doit être élucidée. Cette information est essentielle pour décider si, et quelles chimiokines CXC peuvent être utiles en tant que cibles thérapeutiques ou biomarqueurs dans la FPI en relation avec l'hypertension pulmonaire.

#### *PDGF*

La famille du PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) comporte plusieurs isoformes. Les PDGF-A et PDGF-B sont les mieux caractérisés, alors les PDGF-C et PDGF-D ont été décrits récemment<sup>507</sup>. L'expression du PDGF est retrouvée dans les fibroblastes, les cellules épithéliales et les plaquettes<sup>508</sup>. Le PDGF est biologiquement actif sous forme d'hétéro- ou d'homodimères de chaînes A et B, et se lie aux complexes de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  des récepteurs au PDGF<sup>507</sup>. Le PDGF permet la chimio-attraction et la prolifération des cellules mésenchymateuses du mur vasculaire, c'est-à-dire les péricytes (CMLV ou des cellules

mésenchymateuses SMA<sup>+</sup>)<sup>509-511</sup>. Dans la FPI débutante, le PDGF est non seulement retrouvé dans les macrophages, les fibroblastes et cellules épithéliales alvéolaires de type 2, mais aussi dans les CE et les CMLV, suggérant une contribution du PDGF au remodelage vasculaire<sup>512</sup>. En revanche, les vaisseaux dans la FPI avancée n'expriment pas de PDGF. En plus de la prolifération et la migration des fibroblastes, le PDGF semble être impliqué dans le remodelage de la paroi de l'artère pulmonaire grâce à l'activation des CMLV et des fibroblastes, ce qui entraîne une « muscularisation » plus importante, ainsi qu'une fibrose de l'intima et de l'adventice<sup>513</sup>. Cette hypothèse est étayée par des expériences sur des modèles d'hypertension pulmonaire<sup>514</sup>. Par conséquent, l'inhibition du PDGF pourrait devenir une cible utile pour réduire à la fois, la fibrogenèse et le remodelage vasculaire. En outre, les taux sériques ou dans les BALF de PDGF pourraient être un biomarqueur prédictif de l'évolution de la FPI, mais des études ultérieures sont nécessaires pour établir la pertinence du PDGF.

### *Endostatine*

Les endostatines sont générées à partir du clivage du collagène XVIII, et ont un poids moléculaires compris entre 20 et 30 kDa. Diverses voies de signalisation sont impliquées dans l'activité anti-angiogène de l'endostatine, comme l'inhibition du VEGFR2 et de la MMP-2<sup>515</sup>. Il a été suggéré que l'endostatine est produite par les cellules épithéliales lésées, ce qui, comme pour le PEDF, peut établir un lien entre les lésions épithéliales et la raréfaction vasculaire dans la FPI. Les données expérimentales sur l'hypertension pulmonaire hypoxique ont mis en cause l'endostatine dans le remodelage vasculaire de l'artère pulmonaire<sup>516</sup>. Deux conclusions principales peuvent être tirées : l'inhibition de l'endostatine pourrait réduire les conséquences d'une lésion épithéliale sur le réseau vasculaire pulmonaire, et être par conséquent, une cible utile pour les futurs traitements ; de plus les niveaux sériques d'endostatine pourraient représenter un paramètre utile pour évaluer l'étendue des lésions épithéliales et vasculaires des poumons, mais également la progression de la maladie.

### *Endothéline-1 (ET-1)*

Les principales fonctions vasculaires de l'ET-1 sont la vasoconstriction et la croissance des CMLV<sup>296</sup>. L'ET-1 interagit avec les récepteurs couplés aux protéines G ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub><sup>517</sup>. L'ET-1 possède d'importantes propriétés profibrotiques : elle est impliquée dans le remodelage vasculaire de l'artère pulmonaire dans différentes formes d'hypertension pulmonaire humaines ou expérimentales, de même que dans des modèles de fibrose pulmonaire<sup>518-520</sup>. L'étendue de l'hypertension pulmonaire est directement corrélée avec les taux d'ET-1 dans le sang périphérique des patients atteints de FPI<sup>521</sup>. Il est probable que l'ET-1 soit impliquée dans le remodelage de l'ensemble des trois couches de l'artère dans la FPI, car l'ET-1 pourrait être libéré par les CE lésées et les cellules épithéliales dans les zones de fibrose, et contribuer ainsi à des lésions de l'intima et à la croissance des CMLV de l'intérieur (libération à partir des CE) et de l'extérieur (sécrétion à partir des cellules épithéliales)<sup>6, 522</sup>. Bien que les données expérimentales suggèrent que l'ET-1 serait un objectif central pour traiter la FPI et l'hypertension pulmonaire associée, les données cliniques actuelles concernant l'inhibition du récepteur à l'ET-1 dans la FPI ne montrent qu'un succès très limité. Il n'y a que peu de données disponibles concernant le potentiel de l'ET-1 en tant que biomarqueur, mais les

résultats obtenus jusqu'à présent indiquent que les taux urinaires plutôt que les concentrations plasmatiques pourraient être utilisés<sup>523</sup>.

### *Angiotensine II*

L'angiotensine II (AT II) n'est pas seulement un vasoconstricteur très puissant, mais il est aussi impliqué dans la croissance et la prolifération des CMLV<sup>524</sup>. L'AT II est probablement impliqué dans la physiopathologie de l'hypertension pulmonaire, en tenant compte de l'expression élevée de l'enzyme de conversion de l'AT dans les CE des patients atteints d'hypertension pulmonaire; toutefois, la diminution effective de l'hypertension pulmonaire expérimentale par l'inhibition de l'AT II n'a pas été observée chez les patients atteints d'HTAP<sup>524, 525</sup>. En outre, un rôle important de l'AT II a été montré dans l'apoptose des cellules épithéliales et dans la fibrose, aussi bien dans la FPI humaine et la fibrose pulmonaire expérimentale<sup>526, 527</sup>. L'augmentation du taux d'AT II dans le tissu fibreux pourrait contribuer au développement de l'hypertension pulmonaire via la vasoconstriction et le remodelage de la paroi de l'artère pulmonaire<sup>294, 528</sup>. L'inhibition de l'AT II pourrait être une approche thérapeutique valable dans l'hypertension pulmonaire associée à la FPI, mais sa pertinence globale doit être établie par des études en cours. Les taux d'AT II ou d'enzymes de conversion pourraient être utilisés comme biomarqueurs, mais leur pertinence pronostique doit être prouvée<sup>529</sup>.

### *Système Ang-1/Ang-2/Tie*

Les connaissances actuelles sur le système « Ang-Tie » dans la FPI sont très limitées, mais les études menées sur la fibrose rénale montrent que la thérapie par Ang-1 induit une augmentation de la capillarisation, plus probablement par la stabilisation des vaisseaux<sup>530, 531</sup>. Il existe une certaine controverse à propos de la façon dont agit Ang-1 dans l'hypertension pulmonaire expérimentale chez les rongeurs : bien que le transfert de gènes d'Ang-1 par vecteur cellulaire améliore la survie et l'hémodynamique pulmonaire dans l'hypertension pulmonaire induite par la monocrotaline, la surexpression d'Ang-1 a induit de l'hypertension pulmonaire chez des rats sains<sup>532, 533</sup>. Néanmoins, le système Ang-1/Ang-2/Tie-2 peut avoir un impact important sur la compréhension des processus complexes qui conduisent à la raréfaction vasculaire dans la fibrose pulmonaire, et à la découverte de nouvelles options thérapeutiques prometteuses. Dans la FPI, l'activation des CE par l'induction de l'expression d'Ang-2 pourrait contribuer à l'apoptose des CE dans le cadre de l'inhibition de l'angiogenèse locale dans le tissu fibreux. D'un autre côté, la diminution de libération d'Ang-1 à partir de CMLV dysfonctionnelles pourrait aussi déstabiliser localement les CE, contribuant ainsi à des lésions des CE. Par conséquent, la supplémentation par Ang-1, ou l'inhibition de l'Ang-2 pourrait aider à restaurer l'intégrité endothéliale dans la FPI. Bien que les angiopoïétines puissent avoir le potentiel de biomarqueurs intéressants de la pathologie vasculaire pulmonaire dans la FPI, il n'y a actuellement pas de données qui permettraient un tel postulat.

### *Angiostatine*

L'angiostatine pourrait être en rapport avec la physiopathologie de la FPI par l'intermédiaire d'une activation altérée du plasminogène. Dans le tissu normal, le plasminogène est clivé par

le tPA ou l'uPA pour former l'enzyme active, la plasmine, qui contribue directement et par l'intermédiaire de l'activité accrue de MMP à la dégradation de la MEC<sup>379</sup>. Dans la FPI, l'expression de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 (PAI-1) est induite par le TGF- $\beta$  et inhibe l'activation du plasminogène<sup>379</sup>. Il en résulte une décomposition réduite de la MEC et le recrutement accru de cellules inflammatoires<sup>379</sup>. Le plasminogène non clivé peut alors être de plus en plus clivé soit par la métalloélastase spécifique dérivée des macrophages, soit par d'autres MMP ou encore par effet direct du PAI-1 sur le plasminogène, et générer de l'angiostatine. Les taux d'angiostatine localement élevées dans le tissu fibreux peuvent contribuer à l'apoptose des CE et à la raréfaction vasculaire<sup>380</sup>. Cependant, l'implication de l'angiostatine dans la fibrose et l'hypertension pulmonaire secondaire à la FPI doit être établie avant que l'angiostatine puisse être considéré comme une nouvelle cible thérapeutique, ou même comme un biomarqueur prédictif de l'évolution clinique.

### TGF- $\beta$

L'importance centrale du TGF- $\beta$  suggère qu'il pourrait également être un biomarqueur intéressant dans la FPI, mais les taux TGF- $\beta$  dans les BALF sont très variables, ce qui peut limiter la valeur de ce marqueur, et indique la nécessité de plus grandes études pour établir des taux plus fiables dans les BALF<sup>534, 535</sup>.

#### 2.3.5. Focus sur le *Transforming Growth Factor- $\beta$ 1*

La super famille « *Transforming Growth Factor- $\beta$*  » (TGF- $\beta$ ) comprend plusieurs polypeptides dimériques : les activines, les « *Bone Morphogenetic Proteins* » (BMP) et les TGF- $\beta$ . Ces protéines ont été identifiées principalement par le biais de leurs rôles dans le développement : elles régulent entre autres la différenciation tissulaire à travers leurs effets sur la prolifération, la différenciation et la migration cellulaires, ainsi que sur l'apoptose. Le TGF- $\beta$  est une cytokine multipotente comprenant plusieurs isoformes : TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, et - $\beta$ 3, TGF- $\beta$ 1 étant l'isoforme la plus abondante dans la plupart des tissus. Les protéines intracellulaires R-Smad (« *receptor-activated Smad* » comprenant les Smad1, 2, 3, 5 et 8) sont phosphorylés une fois que le TGF- $\beta$  se lie aux récepteurs transmembranaires de type I et II. Les R-Smad phosphorylés se lient avec Co-Smad (Smad4) pour former des complexes hétéromériques, se transloquent vers le noyau et régulent la transcription des gènes cibles du TGF- $\beta$ . Les protéines I-Smad (Smad6 et 7) régulent négativement la signalisation TGF- $\beta$ , de manière compétitive vis-à-vis des R-Smad pour son interaction avec le récepteur membranaire ou avec Co-Smad, et en ciblant les récepteurs I et II vers le protéasome pour dégradation. Les récepteurs de type III ne sont pas impliqués directement dans la signalisation : ils chaperonnent le TGF- $\beta$  vers le récepteur de type II<sup>317, 536, 537</sup>. Le TGF- $\beta$ 1 est sécrété physiologiquement sous une forme latente car associée à une protéine dimérique « *Latency Associated Peptide* » (LAP), et devient active lorsque TGF- $\beta$ 1 mature se dissocie de sa LAP. Le TGF- $\beta$ 1 est un inducteur très puissant du chimiotactisme : il stimule la migration des monocytes, des lymphocytes, des neutrophiles et des fibroblastes dès des concentrations de l'ordre de  $10^{-15}$  M<sup>538</sup>.

En pathologie, le TGF- $\beta$ 1 se présente comme une cytokine pléiotropique ayant un rôle majeur dans le développement de la fibrose dans divers organes incluant les reins, le foie, les poumons et la peau<sup>536</sup>.

### *Les protéines Smads sont structurellement les effecteurs de la signalisation TGF- $\beta$*

Chez les vertébrés, il y a huit protéines Smad : Smad1 à Smad8. Smad2 et Smad3 sont activées via une phosphorylation carboxy-terminale par les récepteurs aux TGF- $\beta$  et aux activines, respectivement T $\beta$ RI et ActRIB, tandis que Smad1, Smad5 et Smad8 sont activées par ALK-1, ALK-2, BMP-RIA/ALK-3 et BMP-RIB/ALK-6 en réponse aux BMP<sup>539-542</sup> ou d'autres ligands. Ces R-Smad sont libérés du complexe de récepteurs (I et II) pour former un complexe hétérotrimérique composé de deux R-Smad et de Smad4 (Co-Smad), et transloquer ensuite dans le noyau. Bien qu'impliquée de façon ubiquitaire dans la transcription médiée par Smad, Smad4 n'est pas essentiel pour la réponse au TGF- $\beta$  : des réponses au TGF- $\beta$  peuvent se produire en l'absence de Smad4 et certaines lignées cellulaires déficientes en Smad4 ont une réactivité limitée au TGF- $\beta$ <sup>543</sup>. Smad6 et Smad7 qui sont structurellement divergentes agissent en tant qu'inhibiteurs de la signalisation TGF- $\beta$ /Smads<sup>539-541</sup>. R-Smad et Smad4 contiennent un domaine MH1 (domaine de liaison à l'ADN, d'interaction avec les facteurs de transcription) et un domaine MH2 (interaction avec les récepteurs, oligomérisation, activation transcriptionnelle, interaction avec CBP/p300, interaction avec les facteurs de transcription) C-terminaux conservés, entourant un segment « linker » divergent selon les isoformes<sup>539-541</sup>. Les Smads inhibiteurs n'ont pas de domaine MH1 reconnaissable, mais ont un domaine MH2. Le domaine MH2 possède une analogie structurelle limitée avec le domaine FHA liant les phosphopeptides<sup>544</sup>. Les domaines MH1 et MH2 peuvent interagir avec certains facteurs de transcription spécifiques de séquence, tandis que l'extrémité C-terminale de la R-Smad à la fois recrute et interagit avec les co-activateurs de la protéine de liaison à CREB (*CREB-binding protein*, CBP) ou p300<sup>539-541</sup>. À l'exception de Smad2, les domaines MH1 des protéines Smads peuvent se lier l'ADN, alors que les domaines MH2 permettent l'oligomérisation de Smad et l'interaction « récepteur (type I)/Smad ».

### *Régulation des taux de Smads*

Contrairement à l'expression des R-Smads, l'expression des inhibiteurs Smad6 ou Smad7 est hautement régulée par des signaux extracellulaires. L'induction de l'expression de Smad6 et Smad7 par les BMP et les TGF- $\beta$  représente un mécanisme d'auto-inhibition rétroactif pour la signalisation induite par le ligand<sup>539-541</sup>. En conséquence, l'inhibition de l'expression de Smad6 et Smad7 au cours de la différenciation adipocytaire pourrait résulter de la perte concomitante de la signalisation autocrine TGF- $\beta$  et BMP<sup>545</sup>. L'activation du récepteur au facteur de croissance épidermique (*Epidermal Growth Factor*, EGF) et possiblement d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase, la signalisation « interféron- $\gamma$  » via les protéines STAT (*signal transducer and activator of transcription*), et l'activation de NF- $\kappa$ B par le TNF- $\alpha$ , induisent également l'expression de Smad7, conduisant à l'inhibition de la signalisation TGF- $\beta$ <sup>539-541</sup>. La dégradation par le système « ubiquitine-protéasome » contrôle les niveaux de Smads au niveau post-traductionnel. Les ligases d'ubiquitine E3 de la famille HECT (*homologous to the E6-AP carboxy terminus*), Smurf1 (Smad ubiquitination-regulatory factor 1) et Smurf2, antagonisent la signalisation TGF- $\beta$  en interagissant avec les R-Smads et en les ciblant pour la dégradation<sup>546</sup>. La dégradation médiée par Smurf contrôle donc les niveaux de R-Smads et la sensibilité des cellules aux signaux entrants. Smurf1 interagit avec Smad1 et

Smad5, ce qui affecte les réponses aux BMP<sup>547</sup>, alors que Smurf2 interagit de façon plus globale avec les différents R-Smads, ce qui permet une interférence avec les signalisations BMP et TGF- $\beta$ /activines<sup>546, 548, 549</sup>. Néanmoins, les analyses d'embryons de xénope indiquent que Smurf1 et Smurf2 ciblent principalement la voie des BMP<sup>547, 548</sup>. La dégradation par le protéasome régule également les taux de R-Smads après translocation dans le noyau. Ainsi, Smad2 phosphorylée au niveau de sa partie C-terminale peut subir une ubiquitination, et l'inhibition de la dégradation par le protéasome stimule son accumulation nucléaire<sup>550</sup>. Dans le noyau, Smad3 phosphorylée au niveau de sa partie C-terminale peut interagir avec une protéine à motif en anneau (« *ring-finger* »), ROC1, permettant son association avec le complexe de ligase d'ubiquitine SCF composé par ROC1, Skp1, Cullin1 et  $\beta$ TRCP1/Fbw1a ( *$\beta$ -transducine-repeat-containing protein 1*) et par conséquent son export nucléaire et sa dégradation par le système ubiquitine-protéasome dans le cytoplasme<sup>551</sup>. Cependant, seule une petite fraction de Smad2 et Smad3, en l'absence ou en présence de TGF- $\beta$ , est ubiquitinée, et via la signalisation TGF- $\beta$ , Smad2 ou Smad3 phosphorylées peuvent former un complexe stable avec Smurf2<sup>549</sup>. Ainsi, la majeure partie de Smad2 ou Smad3 nucléaire n'est pas ciblée pour la dégradation, mais déphosphorylée et relocalisée dans le cytoplasme<sup>552, 553</sup>. Contrairement à R-Smad, Smad4 n'est pas soumis à une dégradation médiée par l'ubiquitine. A la place, la sumoylation de Smad4 améliore sa stabilité<sup>554</sup>. Cependant, certaines mutations associées aux tumeurs permettent l'ubiquitination et / ou la diminution de la stabilité de Smad4<sup>555</sup>. Jab1, la sous-unité CSN5 du signalosome COP9 qui a été initialement identifié comme un co-activateur de c-Jun, a été décrit comme impliquée dans le ciblage de Smad4 pour l'ubiquitination et la dégradation<sup>556</sup>.

### *Régulation de l'activation de Smad*

Smad6 et Smad7 régulent également l'activation des R-Smads<sup>539-541</sup>. Smad6 et Smad7 inhibent la signalisation TGF- $\beta$  par la liaison de leurs domaines MH2 au récepteur de type I, ce qui empêche le recrutement et la phosphorylation des Smads effecteurs<sup>539-541</sup>. Smad6 interfère également avec l'hétéromérisation des Smads activées par les BMP avec Smad4, prévenant ainsi la formation d'un complexe Smad effecteur. En outre, le recrutement d'un complexe « Smad7 / Smurf1 » ou « Smurf2 / récepteur de type I au TGF- $\beta$  » résulte en l'ubiquitination du récepteur par les protéines Smurf et cible le récepteur pour la dégradation<sup>557, 558</sup>, possiblement dans des compartiments contenant la cavéoline<sup>559</sup>, conduisant à une inhibition de l'activation de R-Smad.

### *Interactions hétéromériques des Smads activées*

Après la phosphorylation C-terminale, les R-Smads se dissocient du récepteur de type I, sans doute en raison de changements conformationnels qui permettent également la transition du monomère primaire R-Smad non phosphorylé, à un complexe oligomérique<sup>560, 561</sup>. Les R-Smads activés forment des oligomères dans lesquels l'extrémité C-terminale phosphorylée entre en contact avec les poches de liaison à la phosphosérine dans la région de la boucle L3 d'un R-Smad ou Smad4 voisin. Les R-Smads phosphorylées de manière endogène peuvent former différents hétérotrimères, avec deux R-Smad et un Smad4 (tout en respectant les coefficients de stœchiométries), ou des hétérodimères<sup>560, 561</sup>. Les hétérodimères et hétérotrimères Smad peuvent aussi coexister ensemble dans des complexes de

transcription, en fonction des facteurs de transcription qui interagissent ; par exemple, des complexes de Smad2-Smad4 avec Fast-1 ou Fast-3 contiennent deux Smad2 et un Smad4, alors que les complexes Smad3-Smad4 au niveau du promoteur de c-Jun, peuvent former des hétérodimères<sup>562</sup>. La plupart des réponses transcriptionnelles induites par le TGF- $\beta$  sont médiées par Smad3 et Smad4, tandis que les réponses à l'activine sont médiés par Smad2 et Smad4, ce qui suggère un complexe avec deux Smad3 ou deux Smad2, respectivement, avec un Smad4. Certaines réponses aux TGF- $\beta$  (par exemple, l'induction de l'expression p15<sup>Ink4B</sup>) nécessitent une activation concomitante de Smad2 et Smad3 avec Smad4<sup>563</sup>. Le modèle hétérotrimérique permet donc l'incorporation de deux R-Smads différents dans le complexe et pourrait imposer des seuils de signalisation différentiels vers l'expression des gènes.

### *Translocation nucléaire des Smads*

Les récepteurs au TGF- $\beta$  demeurent actifs pendant au moins 3-4 heures après la liaison du ligand, et l'activation continue du récepteur maintient les complexes Smad dans le noyau, où ils régulent l'expression des gènes<sup>552</sup>. L'import nucléaire d'un complexe Smad suit les paradigmes « classiques » de translocation nucléaire, établies à travers les études sur d'autres protéines. Sans stimulation par un ligand, la R-Smad est localisée dans le cytoplasme, tandis que Smad4 est distribué à la fois dans le noyau et le cytoplasme<sup>552, 564, 565</sup>. L'import nucléaire des R-Smads ne nécessite pas Smad4, bien que Smad4 se « co-transloque » avec les R-Smads. L'import nucléaire de Smad1 et Smad3 est conféré par une séquence de localisation nucléaire riche en lysine (NLS) dans le domaine MH1, qui est conservée au sein de toutes les R-Smads<sup>565</sup>. La phosphorylation C-terminale du domaine MH2 et les changements de conformation consécutifs peuvent exposer la NLS et permettre la liaison de l'importine- $\beta$ <sup>566, 567</sup>. Contrairement à Smad3, l'import nucléaire de Smad2 pourrait être indépendant de l'importine- $\beta$ , en raison d'une insertion dans son domaine MH1, et pourrait exiger à la place le domaine MH2<sup>552, 553, 565, 567</sup>. Dans le noyau, les R-Smads sont constamment déphosphorylées, ce qui entraîne la dissociation des complexes Smad et l'exportation des Smads inactifs vers le cytoplasme<sup>552, 553</sup>. Le transfert nucléocytoplasmique de Smad2 nécessite son domaine MH2 afin d'interagir avec les nucléoporines CAN/Nup214 et Nup153<sup>553</sup>. Contrairement à l'import ligand-dépendant de R-Smads, Smad4 se transfère de façon continue entre le noyau et le cytoplasme en raison des activités combinées d'une NLS constitutivement active dans le domaine MH1 et d'un signal d'export nucléaire (NES) dans la région de liaison (région « linker »), dont l'activité dépend du récepteur de transport nucléaire CRM1<sup>552, 564</sup>. Ce NES pourrait être masqué dans le complexe avec les R-Smads, permettant aux complexes Smad de s'accumuler dans le noyau. A noter chez le xénope, la Smad4 $\beta$  dépourvue de NES est localisée presque exclusivement dans le noyau, alors que la Smad4 $\alpha$ , qui comporte un NES, est majoritairement cytoplasmique dans les cellules non stimulées<sup>552, 568</sup>. Smad7 et Smad6 sont localisés dans le noyau de certaines cellules en l'absence de TGF- $\beta$ <sup>569, 570</sup>. Leurs activités en dosage transcriptionnel<sup>571, 572</sup>, et l'interaction de Smad7 avec CBP/p300<sup>573</sup> suggèrent qu'ils sont des (co)facteurs de transcription, ce qui pourraient expliquer leur coopération avec la signalisation TGF- $\beta$ , dans l'inhibition de la différenciation adipocytaire et la stimulation de la prolifération cellulaire<sup>545</sup>. Le TGF- $\beta$  induit l'export de Smad7, alors que le BMP induit l'export de Smad6<sup>569, 570</sup>. L'export de Smad7 induit par le TGF- $\beta$  pourrait nécessiter une interaction avec Smurf1 ou Smurf2<sup>570</sup>, alors que la localisation cytoplasmique de Smad6 induite par le BMP pourrait exiger son association avec une protéine de rétention cytoplasmique<sup>569</sup>.

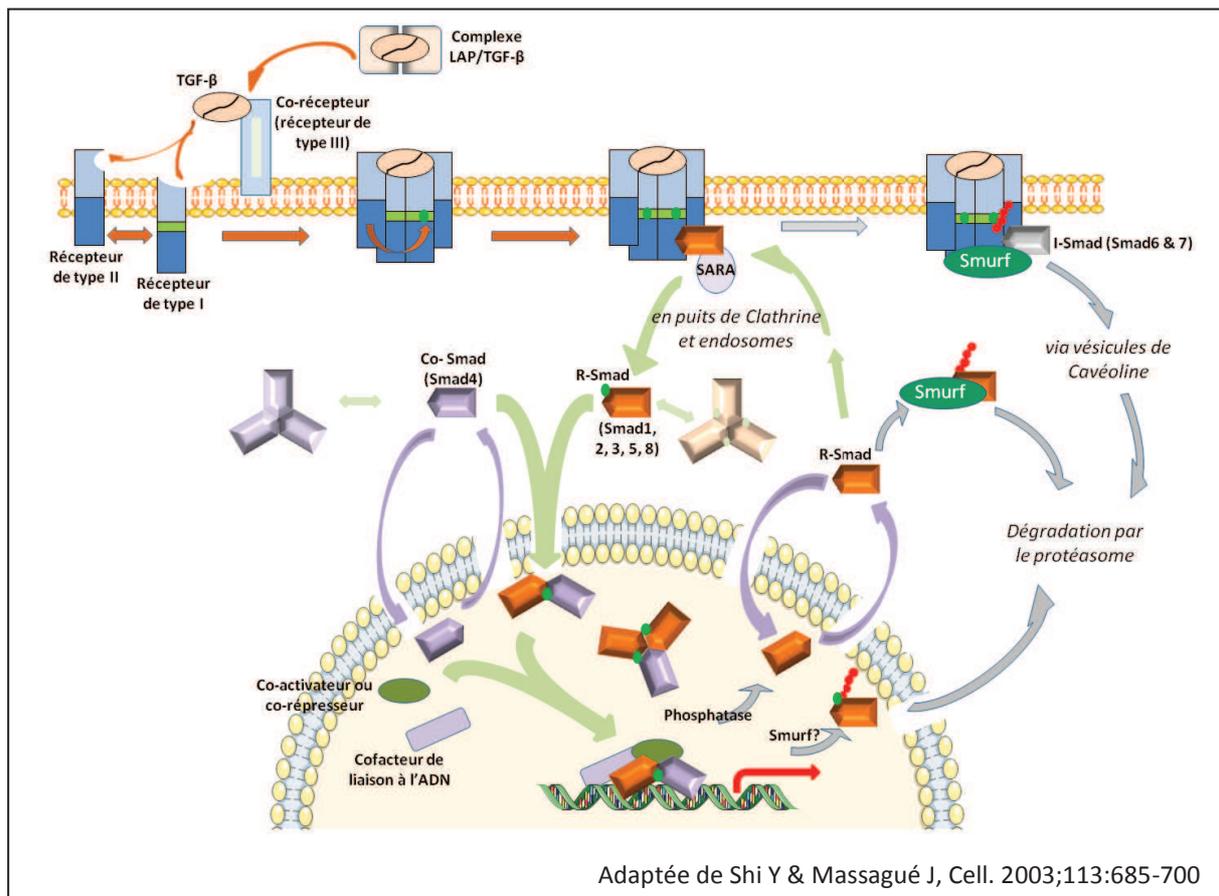


Figure 6 : Signalisation TGF- $\beta$  via ses effecteurs principaux, les protéines Smads, de la membrane plasmique au noyau. Les flèches indiquent le flux de signalisation selon le code « couleurs » suivant : **orange** pour l'activation du ligand et des récepteurs ; **gris** pour l'inactivation des Smads et des récepteurs ; **vert** pour l'activation des Smads et la formation du complexe transcriptionnel ; **violet** pour le trafic nucléocytoplasmique des Smads. Les groupes phosphates sont représentés par des cercles **verts** et les groupes ubiquitines par des cercles **rouges**.

### Régulation de l'activité des Smads par les voies des kinases

La phosphorylation C-terminale de par le récepteur de type I est l'événement clé de l'activation de Smad<sup>539-541</sup> ; cependant d'autres voies dépendantes des kinases régulent davantage la signalisation Smad, comme le suggèrent les modèles de phosphorylation complexes des Smads endogènes. La phosphorylation de Smad2 et la transcription en réponse à l'EGF et au facteur de croissance hépatocytaire (*Hepatocyte Growth Factor*, HGF), remettent en question la théorie selon laquelle seuls les ligands TGF- $\beta$  peuvent activer les Smads<sup>574</sup>. La voie Erk *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK), stimulée par l'activation des récepteurs à tyrosine kinase et/ou Ras, cible les R-Smads. Erk MAPK phosphoryle le domaine MH1 de Smad2 et les segments « linker » de Smad1, Smad2 et Smad3<sup>575, 576</sup>. L'activation du récepteur tyrosine kinase et de Ras (protéine oncogénique) inhibe la translocation nucléaire induite par le ligand des Smads activés<sup>575</sup>, ce qui pourrait expliquer l'altération de la réponse au TGF- $\beta$  dans certaines cellules avec une signalisation Ras hyperactive. D'autres études n'ont pas retrouvé de translocation nucléaire diminuée de Smad dans les cellules transformées (Ras hyperactive) ou dans des cellules avec signalisation MAPK activée<sup>574, 576</sup>.

<sup>577</sup>. En outre, la coopération entre Ras/MAPK et la signalisation TGF- $\beta$  dans des cellules à comportement tumoral, ne semble pas être compatible avec la signalisation Smad défectueuse dans les cellules transformées (Ras hyperactive) <sup>578</sup>. D'autres kinases pourraient phosphoryler des sites Erk MAPK, comme suggéré par la phosphorylation de ces sites dans Smad2, mais pas Smad1, au cours de développement <sup>579</sup>.

La phosphorylation des Smads peut également résulter de l'activation de la MAPK/Erk kinase kinase 1 (MEKK1), qui agit en aval de Ras et en amont de Erk MAPK induite par les facteurs de croissance et les voies SAPK/JNK (c-Jun N-terminal kinase) activées par le stress. L'activation de MEKK1 augmente la phosphorylation Smad2, son hétéromérisation avec Smad4, sa translocation nucléaire et son activité transcriptionnelle <sup>580</sup>. JNK phosphoryle Smad3 en dehors de son motif SSXS C-terminal, et améliore la translocation nucléaire et la transcription induites par le TGF- $\beta$  <sup>577</sup>. L'induction de Erk MAPK et de la signalisation JNK par le TGF- $\beta$  lui-même, pourrait réguler l'activation de Smad et la signalisation Smad. L'activation de la protéine kinase II Ca<sup>2+</sup>/Calmoduline dépendante (CaMKII) entraîne également la phosphorylation de Smad2, Smad3 et Smad4, inhibe l'import nucléaire induit par le TGF- $\beta$  et l'activité transcriptionnelle de Smad2, et affecte l'hétéromérisation de Smad. CaMKII phosphoryle Smad2 dans le segment « linker » et le domaine MH1 <sup>581</sup>. La phosphorylation des domaines MH1 de Smad2 et Smad3 par la protéine kinase C (PKC), qui abroge la liaison de Smad3 à l'ADN, suggère un rôle régulateur de la PKC dans la transcription médiée par Smad <sup>582</sup>. Contrairement aux R-Smads, la Smad4 des mammifères n'est pas régulée par phosphorylation. Chez le xénope, Smad4 $\beta$  mais pas Smad4 $\alpha$ , est phosphorylée, mais le rôle de cette phosphorylation reste inconnu <sup>568</sup>. Smad6 et Smad7 sont également phosphorylées indépendamment de la stimulation par le TGF- $\beta$ .

#### *Activation transcriptionnelle versus répression transcriptionnelle induite par le TGF- $\beta$*

De nombreux gènes sont activés en réponse aux ligands TGF- $\beta$ , alors que d'autres voient leur transcription réprimée. Les co-répresseurs des Smads qui inhibent l'activation transcriptionnelle Smads-dépendante ne sont pas impliqués dans la répression induite par le TGF- $\beta$ , ce qui pose la question de savoir ce qui définit l'activation transcriptionnelle par rapport à la répression via les Smads. Le TGF- $\beta$  inhibe la progression du cycle cellulaire en régulant la transcription de régulateurs du cycle. Parmi eux, c-Myc et les membres de la famille Id sont régulés négativement par le TGF- $\beta$  <sup>583, 584</sup>. Dans des cellules où l'expression de c-Myc est régulée négativement par le TGF- $\beta$ , Smad3 réprime la transcription de c-Myc en association avec les facteurs de transcription E2F4 et E2F5 et le co-répresseur p107. Ce complexe est pré-assemblé dans le cytoplasme et, en réponse au traitement par TGF- $\beta$ , se transloque vers le noyau, où en association avec Smad4, il se lie à un site de liaison Smad-E2F dans le promoteur de c-Myc et réprime l'expression de c-Myc <sup>583</sup>. Dans la régulation négative d'Id1, Smad3 activé par le TGF- $\beta$  induit directement l'expression d'ATF3, et ATF3 et Smad3 forment alors un complexe qui réprime le promoteur d'Id1 <sup>584</sup>. De même, SIP1, induite par le TGF- $\beta$ , régule négativement l'expression de la E-cadhérine <sup>585</sup>. En dehors de la répression de la transcription des membres Id dans plusieurs lignées de différenciation, le TGF- $\beta$  inhibe également la différenciation des myoblastes, des ostéoblastes et des adipocytes via la répression fonctionnelle de facteurs de transcription clés qui sous-tendent ces voies de différenciation. Smad3 réprime la transcription via Runx2/CBFA1 (*core-binding factor, runt domain,  $\alpha$ -subunit*) dans la différenciation ostéoblastique <sup>586</sup>, via MyoD et d'autres facteurs de transcription myogéniques à motif basique hélice-boucle-hélice (bHLH)

dans les myoblastes<sup>587</sup>, et via les protéines de liaison des « CCAAT/enhancers » (C/EBP) dans la différenciation adipocytaire<sup>588</sup>. Smad3 réprime la fonctionnalité de MyoD en interagissant physiquement avec le domaine HLH de MyoD, empêchant la fonction de dimérisation de MyoD avec E12/E47, qui est nécessaire pour la liaison efficace à l'ADN au niveau des séquences « E-Box »<sup>587</sup>. Smad3 n'interfère pas avec la liaison de Runx2 ou C/EBP à l'ADN et réprime la fonction de transcription de C/EBP<sup>586, 588</sup>. Que les Smads répriment ou activent la transcription dépend aussi du type cellulaire et de la séquence du promoteur. Smad3 coopère avec des protéines Runx pour activer la transcription dans les cellules épithéliales, et réprime la transcription à partir du même promoteur dans les cellules mésenchymateuses. Le contexte de séquence de reconnaissance de Runx définit l'activation médiée par les Smads par rapport à la répression<sup>586</sup>. Enfin, le domaine MH1 de Smad3 peut interagir avec les histones désacétylases (HDAC)<sup>589</sup>. Ainsi, des mécanismes distincts, en fonction du facteur de transcription interagissant, du promoteur et du contexte intracellulaire, mènent à la répression médiée par les Smads et déterminent si les Smads activent ou répriment la transcription.

### *Régulation via les protéines associées aux récepteurs de type I & II*

Les complexes de récepteurs au TGF- $\beta$  sont des points nodaux pour des assemblages multiprotéiques qui régulent la fonction des récepteurs et les voies de signalisation Smads et non-Smads. Ces interactions sont susceptibles de dépendre de l'activation des récepteurs et de leur localisation subcellulaire, et varient tout au long du « cycle de vie » du complexe récepteur.

En plus des protéines d'ancrage qui lient les Smads à leurs récepteurs, plusieurs protéines à répétitions « WD-40 » peuvent s'associer avec les récepteurs au TGF- $\beta$ . Par exemple, TRIP-1 (*TGF- $\beta$ -receptor-interacting protein 1*) interagit avec le récepteur de type II liant le TGF- $\beta$  et est phosphorylée par ce récepteur de type II. Les taux augmentés de TRIP-1 répriment la transcription induite par le TGF- $\beta$ , et certains mutants améliorent les réponses au TGF- $\beta$ , probablement par interférence avec le TRIP-1 endogène<sup>590</sup>. TRIP-1 participe également au complexe de facteur d'initiation de la traduction eIF3, possiblement en liant TRIP-1 à la régulation traductionnelle induite par le TGF- $\beta$ . Un tel lien est également proposé pour le facteur de traduction eIF2A, qui, à l'instar de TRIP-1, interagit avec le récepteur de type II et régule négativement la réponse en termes d'expression génique<sup>591</sup>. La sous-unité régulatrice B $\alpha$  de la protéine phosphatase 2A (PP2A), une autre protéine « WD-40 repeat », peut également interagir directement avec les récepteurs de type I au TGF- $\beta$ , et améliore la signalisation anti-mitogène du TGF- $\beta$ <sup>592</sup>. Lors de l'activation du récepteur, PP2A-B $\alpha$  se lie à des récepteurs de type I, possiblement en activant la signalisation médiée par PP2A. Une troisième protéine « WD-40 repeat », STRAP, peut s'associer avec les récepteurs de type I et de type II au TGF- $\beta$ , et avec Smad2, Smad3 et Smad7. STRAP stabilise l'association de Smad7 avec le récepteur et inhibe la transcription TGF- $\beta$ -dépendante, probablement en interférant avec la liaison de Smad2 ou Smad3 au récepteur<sup>593</sup>. Les récepteurs au TGF- $\beta$  interagissent également avec l'immunophiline FKBP12 au niveau d'un motif « Leu-Pro » conservé adjacent au domaine GS des récepteurs de type I non encore liés à leur ligand. FKBP12 diminue la signalisation TGF- $\beta$  par inhibition de la phosphorylation du récepteur de type I par le récepteur de type II<sup>594</sup>, ce qui corrèle avec la diminution de l'internalisation du récepteur et la phosphorylation de Smad<sup>595</sup>. Les récepteurs de type I ayant une liaison à FKBP12 défectueuse ont une signalisation basale élevée, mais une signalisation en réponse au TGF- $\beta$

normale, et l'inactivation de l'expression de FKBP12 aboutit à un phénotype cohérent avec l'hyperactivité du récepteur au TGF- $\beta$ <sup>596</sup>. Ainsi, la FKBP12 pourrait se comporter comme une sauvegarde contre une signalisation « perméable » via les récepteurs au TGF- $\beta$ . Bien que la FKBP12 puisse jouer un rôle dans la signalisation « calcineurine » et « NF-AT », il n'existe aucune preuve indiquant que le TGF- $\beta$  induit la signalisation FKBP12-dépendante. La sous-unité  $\alpha$  de la farnésyl transférase peut aussi interagir avec le récepteur de type I, mais aucune réponse n'a été corrélée à cette interaction<sup>597</sup>.

### *Signalisation indépendante de Smad via les voies des MAPK*

Outre la transcription médiée par les Smads, le TGF- $\beta$  active d'autres cascades de signalisation, y compris les voies des MAPK. Certaines de ces voies régulent l'activation des Smads, comme décrit ci-dessus, mais d'autres pourraient induire des réponses sans rapport avec la transcription.

Le TGF- $\beta$  peut activer les voies Erk, JNK et p38 MAPK kinase. L'activation avec une cinétique lente dans certains cas, pourrait résulter de réponses transcriptionnelles Smad-dépendantes, mais l'activation rapide (5 à 15 min) dans les autres cas suggère une réponse indépendante de la transcription<sup>539</sup>. Des études utilisant des cellules déficientes en Smad4 ou des Smads dominants négatifs, soutiennent la possibilité d'une activation de la voie MAPK qui serait indépendante des Smads<sup>577</sup>. En outre, les récepteurs de type I mutés, défectueux pour l'activation des Smads, activent la signalisation p38 MAPK en réponse au TGF- $\beta$ <sup>598</sup>.

Les mécanismes d'activation de Erk, JNK ou p38 MAPK par le TGF- $\beta$  et leurs conséquences biologiques sont mal caractérisés. L'activation rapide de Ras par le TGF- $\beta$  dans les cellules épithéliales pourrait impliquer Ras dans la signalisation Erk MAPK induite par le TGF- $\beta$ <sup>599</sup>. Les signalisations JNK et p38 MAPK sont activées par différentes MAPK kinase kinases (MAPKKKs) en réponse à de nombreux stimuli. A la fois le TGF- $\beta$  et le BMP-4 peuvent activer la TAK1 (*TGF- $\beta$ -activated kinase 1*), un membre de la famille MAPKKK<sup>600</sup>. La protéine XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*) pourrait lier l'activation du récepteur TGF- $\beta$ /BMP à la signalisation TAK1<sup>600</sup>; cependant, une interaction directe entre XIAP et les récepteurs de type I n'a pas été démontrée, et les souris déficientes en XIAP répondent au TGF- $\beta$ <sup>601</sup>. MEKK1 pourrait également fonctionner en amont de l'activation des MAPKKs médiée par le TGF- $\beta$ ; ainsi, MEKK1 et TAK1 pourrait activer JNK via la MAPK kinase 4 (MKK4), et p38 MAPK via MKK3 ou MKK6, en réponse au TGF- $\beta$ . Comme TAK1 peut phosphoryler et activer la kinase I $\kappa$ B, stimulant ainsi la signalisation NF- $\kappa$ B, la signalisation TGF- $\beta$ /BMP pourrait induire la signalisation NF- $\kappa$ B. Une caractérisation plus poussée de ce réseau d'interactions permettrait de mieux comprendre l'activation des MAPK par les ligands TGF- $\beta$ .

L'activation des voies Erk et JNK induite par le TGF- $\beta$  peut se traduire par la phosphorylation des Smads et réguler l'activation des Smads<sup>574-577</sup>. En outre, l'activation de la signalisation Ras/Erk MAPK induite par le TGF- $\beta$  peut induire l'expression du TGF- $\beta$ 1, amplifiant ainsi la réponse au TGF- $\beta$  et induisant des réponses secondaires aux TGF- $\beta$ <sup>599</sup>. L'activation des voies MAPK par le TGF- $\beta$  pourrait également influencer sur les réponses transcriptionnelles par des effets directs sur les facteurs de transcription interagissant avec Smad [par exemple, le substrat c-Jun de JNK ou le substrat ATF-2 (*activating transcription factor 2*) de p38 MAPK], permettant la convergence des voies Smad et MAPK induites par le TGF- $\beta$ <sup>539-541</sup>. La double capacité du TGF- $\beta$  à activer les signalisations Smad et MAPK joue un rôle dans la transdifférenciation épithéliale-mésenchymateuse induite par le TGF- $\beta$ , qui dépend en partie des voies Erk et/ou p38 MAPK<sup>598, 602, 603</sup>. Bien que cette convergence se traduise souvent par

une coopérativité, ces voies peuvent aussi se neutraliser les unes les autres. Par exemple, Smad6 peut se lier à TAK1 et réguler négativement son activité<sup>604</sup>, alors que Smad7 peut améliorer et maintenir l'activation de JNK<sup>605</sup>. En outre, c-Jun inhibe la signalisation Smad2 via l'association avec des co-répresseurs de Smad, et cette interaction est régulée par la signalisation JNK<sup>606</sup>. Ainsi, l'équilibre entre l'activation directe des Smads et les voies MAPK définit souvent les réponses cellulaires au TGF- $\beta$ .

#### *Autres voies de signalisation induite par le TGF- $\beta$*

En fonction de la lignée cellulaire, le TGF- $\beta$  peut activer rapidement les Rho-like GTPases, y compris RhoA, Rac et Cdc42, bien que l'activation retardée de RhoA et Cdc42, à cause de la synthèse de nouvelles protéines, ait également été observée<sup>602, 607, 608</sup>. Le TGF- $\beta$  augmente également l'expression de RhoB<sup>609</sup>, possiblement en inhibant sa dégradation par le protéasome, et induit l'expression de NET1, un facteur d'échange de guanine spécifique de RhoA qui est nécessaire à l'activation de RhoA<sup>610</sup>. Enfin, l'activation de Ras en réponse au TGF- $\beta$  pourrait également conduire à l'activation d'une Rho-like GTPase.

Rac et Cdc42 régulent l'activation des voies JNK et p38 MAPK, probablement en interagissant directement avec les MAPKKs en amont de JNK et p38 MAPK, alors que Rho, Rac et Cdc42 affectent l'organisation du cytosquelette<sup>611</sup>. L'activation de petites GTPases par le TGF- $\beta$  pourrait jouer un rôle dans les réponses de type expression génique. RhoB s'oppose<sup>609</sup>, tandis que Rac1 contribue<sup>602</sup> à l'expression génique induite par le TGF- $\beta$ , et l'activation de la signalisation JNK Rho-dépendante contribue à l'activation de Smad<sup>577</sup>. Ces GTPases sont également nécessaires aux changements dans l'organisation du cytosquelette induits par le TGF- $\beta$  et à la transdifférenciation épithéliale-mésenchymateuse. L'activation de Rac1, RhoA et p38 MAPK, un effecteur de Cdc42, est nécessaire à la réorganisation rapide de la membrane et à la formation de lamellipodes en réponse au TGF- $\beta$ <sup>608</sup>. L'activation de RhoA et de son effecteur la kinase p16<sup>ROCK</sup>, ainsi que celle de Cdc24, p38 MAPK et de la signalisation Smad, ont été impliquées dans la formation de fibres de stress TGF- $\beta$ -induite et la transdifférenciation épithéliale-mésenchymateuse<sup>598, 602, 607, 608, 610</sup>.

Le TGF- $\beta$  peut également activer la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), comme l'indique la phosphorylation de son effecteur Akt<sup>612, 613</sup>. Cette activation peut être directe, avec l'implication éventuelle de RhoA<sup>612</sup>, mais peut aussi résulter de l'expression du TGF- $\alpha$  induite par le TGF- $\beta$  et l'activation consécutive du récepteur EGF<sup>613</sup>. L'inhibition chimique de l'activité de la PI3K réduit la phosphorylation de Smad2 et la transcription TGF- $\beta$ -induite, ainsi que la transdifférenciation épithéliale-mésenchymateuse<sup>612</sup>; toutefois, l'inhibition de la PI3K à des concentrations plus faibles d'inhibiteurs n'a pas d'incidence sur la transition épithéliale-mésenchymateuse TGF- $\beta$ -induite<sup>614, 615</sup>. Le rôle de la PI3K dans la différenciation reste à préciser.

Le TGF- $\beta$  peut également induire une signalisation via PP2A, qui se compose d'une sous-unité catalytique C et d'une sous-unité régulatrice A, avec laquelle une sous-unité régulatrice B peut interagir. Suite à la liaison du TGF- $\beta$  à son récepteur, la sous-unité B $\alpha$  de la PP2A s'associe avec le récepteur de type I activé<sup>592</sup>. Vu que B $\alpha$  inhibe l'activité du dimère A/C, ce recrutement devrait permettre d'améliorer l'activité de PP2A. Suite à la stimulation par le TGF- $\beta$ , les sous-unités A et C, ainsi que B $\alpha$ , interagissent avec p70<sup>S6K</sup>, une kinase clé dans le contrôle traductionnel et la progression du cycle cellulaire<sup>616</sup>. La déphosphorylation et la diminution de l'activité de p70<sup>S6K</sup> résultantes sont supposées contribuer à l'arrêt de croissance TGF- $\beta$ -induit indépendamment des Smads<sup>616</sup>, suggérant un rôle de PP2A dans la

réponse au TGF- $\beta$ . La Protéine Phosphatase 1 (PP1) est également impliquée dans la signalisation TGF- $\beta$ . Sa sous-unité catalytique (PP1c) interagit avec la SARA de drosophile, et régule négativement la signalisation Dpp en affectant la phosphorylation du récepteur de type I<sup>617</sup>.

Enfin, la signalisation TGF- $\beta$  régule également la stabilité des protéines. En particulier, le TGF- $\beta$  augmente la dégradation du co-répresseur de Smad, SnoN<sup>554, 618, 619</sup>, et du récepteur T $\beta$ RI<sup>557, 558</sup>. La dégradation TGF- $\beta$ -induite de SnoN implique Smad2 ou Smad3 comme des protéines d'amarrage pour cibler SnoN vers la dégradation par le protéasome. Ainsi, Smad2/3 interagit avec SnoN et Smurf2 ou le complexe de promotion de l'anaphase, qui servent ensuite de ligases de l'ubiquitine E3 pour SnoN<sup>549, 618, 619</sup>. De même, en réponse au TGF- $\beta$ , Smad7 interagit avec Smurf1 ou Smurf2, et l'interaction de ce complexe avec T $\beta$ RI conduit à l'ubiquitination du récepteur et sa dégradation<sup>557, 558</sup>. Reste à déterminer si d'autres protéines interagissant avec les Smads sont soumises à la dégradation TGF- $\beta$ -induite, et si la dégradation médiée par l'ubiquitine contribue à la réponse cellulaire à la signalisation de la famille TGF- $\beta$ .

#### *Place du TGF- $\beta$ 1 en tant que biomarqueur dans la FPI*

Compte tenu de la physiopathologie complexe de la FPI, il semble probable que les processus biologiques qui sous-tendent la progression de la fibrose soient également impliqués dans le remodelage vasculaire et l'hypertension pulmonaire<sup>620</sup>

En outre, les taux et l'activité finement régulés du TGF- $\beta$  (entre autres « facteurs de croissance ») sont importants pour un développement vasculaire coordonné, comme illustré par les résultats montrant que des souris surexprimant du TGF- $\beta$ 1 au cours du développement pulmonaire, présentent un défaut de différenciation épithéliale et une diminution de la vascularisation capillaire<sup>279</sup>.

Il est intéressant de noter, dans le contexte de l'apoptose des CE dans la FPI, que la diminution du nombre de PEC soit retrouvée dans la FPI. Cela suggère que aussi bien la disponibilité réduite que le « homing » pulmonaire augmenté vers les sites de lésion, éventuellement associés à un dysfonctionnement des EPC, pourrait être impliqués dans la lésion endothéliale de la FPI<sup>262, 621</sup>. Dans le contexte de l'hypertension pulmonaire, qui pourrait donc présenter des mécanismes physiopathologiques communs avec la FPI<sup>297, 620</sup>, notre équipe a montré que les effets bénéfiques des prostanoides étaient médiés au moins en partie par les ECFC dont le nombre est augmenté chez les patients bénéficiant du traitement par tréprosténil en sous-cutané, et qui présentent un phénotype hyperprolifératif<sup>622</sup>. Ce rôle bénéfique des ECFC dans le traitement de l'hypertension pulmonaire est opposé à celui décrit dans la FPI sous l'effet du TGF- $\beta$ 1, ce dernier étant détaillé dans le premier travail présenté dans cette thèse.

Le TGF- $\beta$ 1 étant l'un des acteurs principaux dans le développement de la fibrose, il se positionne donc comme un potentiel biomarqueur dans la FPI en tant qu'élément causal de la pathologie.

## 2.4. Biomarqueurs dans l'artériopathie des membres inférieurs

### 2.4.1. Principaux candidats dans la littérature actuelle

Un certain nombre de biomarqueurs ont été associés à l'artériopathie des membres inférieurs (AMI) dans les études de populations définies (Tableau 8), tels que des cytokines ou chimiokines inflammatoires, des marqueurs de dysfonction endothéliale, des médiateurs de l'angiogenèse ou de la régénération vasculaire, des lipoprotéines, des indicateurs de stress oxydatif ou d'ischémie-reperfusion, des modulateurs métaboliques, et des protéines de la coagulation<sup>623-629</sup>.

Cependant, aucun de ces biomarqueurs ne sont spécifiques de l'AMI, puisqu'ils sont également élevés dans la maladie coronarienne et d'autres troubles vasculaires. Néanmoins, il est fort probable que les processus pathologiques dans la circulation périphérique conduisent à la libération de biomarqueurs spécifiques de l'AMI, car il existe des différences significatives dans le système vasculaire en termes d'expression génique endothéliale et des CMLV<sup>630</sup>. Les études précliniques montrent ainsi des différences fonctionnelles ; la vasodilatation endothélium-dépendante et la vasoconstriction des muscles lisses, en réponse à une variété d'agonistes, diffèrent dans les artères coronaires et celles des membres inférieurs<sup>631</sup>. De même chez les humains, les réponses endothélium-dépendantes dans les artères périphériques sont tout à fait différentes de celles dans les artères centrales<sup>632</sup>. Ces différences dans la réactivité vasculaire entre les artères périphériques et coronaires reflètent les différences dans l'expression des récepteurs de surface cellulaire et des voies de signalisation. Il y a aussi des différences bien établies entre les lits vasculaires dans l'expression des chimiokines endothéliales et des molécules d'adhésion. Ces différences anatomiques sont connues pour jouer un rôle physiologique dans le « homing » lymphocytaire et autres trafics cellulaire dans la surveillance immunitaire<sup>633</sup>. La variation phénotypique entre les cellules vasculaires est une manifestation de leur exposition à des milieux disparates, de leur divergence de développement, et de leurs différences épigénétiques persistantes<sup>634, 635</sup>.

<b>Cytokines inflammatoires</b>	CRP <sup>625</sup> , interleukine-6 <sup>636, 637</sup>
<b>Marqueurs de la dysfonction endothéliale</b>	ADMA <sup>638-641</sup> , molécules d'adhésion cellulaires solubles (« CAMs ») <sup>642, 643</sup> , facteur Willebrand <sup>644</sup>
<b>Modulateurs de l'angiogenèse</b>	Tie-2 soluble, VEGF <sup>629</sup> , HGF (« <i>Hepatocyte Growth Factor</i> ») <sup>645</sup>
<b>Lipoprotéines</b>	LDL oxydés <sup>623, 624, 646</sup> , Lipoprotéine (a) <sup>647</sup>
<b>Indicateurs du stress oxydatif</b>	Homocystéine <sup>648</sup> , 8-Hydroxy-2-déoxy-2-déoxyguanosine <sup>649</sup> , isoprostanes <sup>650</sup>
<b>Protéines de la coagulation</b>	Thrombomoduline <sup>651</sup> , D-Dimères, tPA, PAI-1, fibrinogène <sup>652, 653</sup>

Tableau 8 : Potentiels biomarqueurs associés à l'artériopathie des membres inférieurs. Adapté de Cooke JP & Wilson AM, J Am Coll Cardiol. 2010;55(19):2017–2023

### 2.4.2. Panel de biomarqueurs dans l'AMI

Pour tout biomarqueur utilisé seul (comme la CRP), un certain pourcentage de sujets présentant des taux anormaux n'ont pas la maladie (faux positifs), tandis que les sujets atteints peuvent avoir des taux normaux (faux négatifs). Une approche pour résoudre ce problème est d'utiliser une combinaison de biomarqueurs, dans laquelle chacun des biomarqueurs apporte indépendamment une information diagnostique. Les panels de biomarqueurs et les indices de scores commencent à être utilisés en médecine pour affiner le diagnostic et aider à évaluer le pronostic. Par exemple, les indices de scores, intégrant de nouveaux biomarqueurs, ont été utilisés pour prédire les évolutions cliniques dans les cancers hépatocellulaires et du sein<sup>654, 655</sup>. En 2006, Wang *et al* ont combiné plusieurs biomarqueurs issus de l'étude de Framingham pour prédire les pronostics et le décès dans les pathologies cardiovasculaires<sup>656</sup>.

Fung *et al* ont identifié la cystatine C comme un biomarqueur candidat supplémentaire. Une étude ultérieure portant sur 540 individus à haut risque cardiovasculaire a montré que la  $\beta$ 2-microglobuline, la cystatine C, la CRP haute sensibilité et le glucose étaient associés à l'AMI, indépendamment des facteurs de risque traditionnels que sont l'âge, le diabète, l'hyperlipidémie, l'hypertension et le tabac. Parmi les biomarqueurs plasmatiques testés, la  $\beta$ 2-microglobuline et la cystatine C présentaient la meilleure corrélation avec l'AMI, supérieure à celle avec l'âge, le statut tabagique ou diabétique. Un score issu de ce panel de biomarqueurs ( $\beta$ 2-microglobuline, la cystatine C, la CRP haute sensibilité et glucose) présentait une association augmentée avec le statut artéritique, indépendamment des facteurs de risque cardiovasculaires classiques<sup>657</sup>.

### 2.4.3. Focus sur la Thrombospondine-1

Comme évoqué dans le paragraphe 2.4.1., la littérature fait état de facteurs pro-angiogènes en tant que potentiels biomarqueurs dans l'AMI. Les facteurs anti-angiogènes pourraient également être impliqués dans la pathogenèse de l'AMI. La thrombospondine (TSP-1) a été retrouvée surexprimée dans des coupes histologiques humaines et murines de tissus ischémiques des membres inférieurs<sup>658, 659</sup>. Cependant les concentrations plasmatiques de TSP-1 n'ont pas encore été mesurées chez des patients artéritiques.

La TSP-1 est une glycoprotéine adhésive intervenant dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice. Elle comporte de multiples sites de liaison au calcium, ainsi que différents types de séquences répétées d'acides aminés. Ces séquences répétées peptidiques présentent des homologies de structure avec diverses autres protéines (protéine de *Plasmodium falciparum*, précurseur de l'EGF notamment). En particulier, le motif peptidique RGD (arginine-glycine-acide aspartique) présent dans la séquence répétée de type 3 de la thrombospondine, est également retrouvé dans la fibronectine, le fibrinogène, le facteur Willebrand et la vitronectine. Ce motif RGD est reconnu par l'intégrine plaquettaire  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (ou GP IIb/IIIa), et permet l'association de la thrombospondine aux cellules<sup>660</sup>.

La famille « thrombospondine » comprend cinq protéines secrétées qui ont des rôles distincts en physiologie et dans le développement<sup>661</sup>. TSP-3, TSP-4 et COMP (*Cartilage Oligomeric Matrix Protein*, ou TSP-5) sont des protéines pentamériques retrouvées en

majorité dans les os et la matrice extracellulaire (MEC) du cartilage. Jusqu'à maintenant, les descriptions de leur association avec le cancer sont très limitées<sup>662-667</sup>.

TSP-1 et TSP-2 constituent une sous-famille de TSP trimériques, toutes deux ayant des propriétés anti-angiogènes<sup>668</sup>. TSP-2 est exprimée par les cellules vasculaires mais n'est pas retrouvée dans les plaquettes. Les polymorphismes de *THBS1* et *THBS2*, gènes codant respectivement TSP-1 et TSP-2, sont associés à des risques cardiovasculaires augmentés<sup>669-671</sup> mais pas avec le cancer<sup>672</sup>.

La TSP-1 est une protéine qui est exprimée de façon transitoire dans la matrice extracellulaire et module les fonctions cellulaires d'une manière « contexte-spécifique » via des récepteurs membranaires de surface cellulaire et d'autres composants de la matrice extracellulaire<sup>673</sup>. La TSP-1 circule à une concentration plasmatique d'environ 100 pM, et les granules  $\alpha$  plaquettaires représentent un pool préformé de stockage important qui peut rapidement être mobilisé au niveau des sites de lésion tissulaire. Les protéines matricielles ont des rôles variés, notamment en modulant le comportement cellulaire (récepteurs de surface cellulaire) et en interagissant avec d'autres protéines de la matrice extracellulaire, des enzymes sécrétées ou des facteurs de croissance. Les études concernant les interactions impliquant la TSP-1 ont montré diverses fonctions physiologiques ainsi que des rôles dans la pathogenèse de la réponse lésionnelle et du cancer, mais les phénotypes relativement modérés des souris déficientes pour la TSP-1 suggèrent que celle-ci ne se présente pas comme un acteur central pouvant être exploité en thérapeutique. Cependant des études plus récentes ciblant la signalisation via son récepteur le CD47, ont mis en évidence des rôles critiques de la TSP-1 dans la régulation précoce du dynamisme cardiovasculaire, de la perfusion tissulaire, de l'hémostase, du système immunitaire et de l'homéostasie mitochondriale. La plupart de ces fonctions étant médiées par une puissante et redondante inhibition de la voie canonique du monoxyde d'azote (NO)<sup>674</sup>. En effet, cette voie de signalisation via le NO est un axe central du mécanisme d'action de la thrombospondine.

### *Rôle central de la signalisation par le NO dans l'angiogenèse, le tonus vasculaire et l'hémostase*

L'acteur principal de la production endogène de NO dans les CE est l'isoforme endothéliale de la *nitric oxide synthase* (eNOS ou NOS3). La NOS3 est une enzyme finement régulée, notamment par des modulations de son expression, de ses modifications post-traductionnelles, par sa localisation subcellulaire et via la liaison de plusieurs protéines régulatrices<sup>675</sup>. Le NO diffuse rapidement à travers les tissus et les membranes cellulaires pour se lier à sa principale cible, la guanylate cyclase soluble (sGC) afin de stimuler la production de GMP cyclique (cGMP). Ce dernier régule de nombreuses voies de signalisation qui affectent les fonctions des cellules vasculaires. Le NO à de faibles concentrations favorise la survie des cellules vasculaires, leur prolifération et leur migration. A de plus fortes concentrations, il déclenche des voies de signalisation additionnelles directement ou après conversion en espèces réactives de l'azote (*reactive nitrogen species*, RNS)<sup>676</sup>, mais le contrôle de la signalisation NO dans les cellules vasculaires semble être spécifique de la voie « NO – cGMP ».

Dans le système cardiovasculaire, la signalisation NO – cGMP a plusieurs fonctions physiologiques importantes (Figure 7). Le NO produit par l'endothélium diffuse au travers de la paroi vasculaire et permet la relaxation des CMLV dans les artères, augmentant ainsi le diamètre vasculaire, diminuant la résistance et améliorant le flux sanguin vers les tissus

cibles. Le NO dérivé des CE sert ainsi de médiateur pour l'auto-régulation locale précoce du tonus artériel, en réponse aux variations des forces de cisaillement mécanique détectées par l'endothélium, et aux facteurs circulant tels que le VEGF-A ou l'acétylcholine. Le NO diffuse également dans la lumière des vaisseaux, où il régule l'hémostase en limitant l'agrégation plaquettaire<sup>677</sup>. Enfin, le NO agit d'une manière autocrine pour réguler la perméabilité endothéliale et l'angiogenèse<sup>678</sup>. Ces réponses vasculaires au NO se produisent sur des échelles de temps différentes (Figure 7). L'hémostase et le tonus vasculaire sont régulés de façon précoce, tandis que l'angiogenèse nécessite une augmentation maintenue des niveaux de NO.

### *Les facteurs angiogènes stimulent la synthèse de NO*

Le VEGFA stimule la NOS3 via différentes voies (Figure 7). Le rôle central de NOS3 dans la signalisation du VEGFA est mis en évidence par les défauts d'angiogenèse et de réponses de perméabilité précoces au VEGFA observés dans les modèles de souris déficientes *Nos3*<sup>679</sup>. Les réponses angiogènes à l'angiopoïétine 1 (protéine = ANG1, gène = ANGPT1) et l'angiopoïétine protéine « like » 1 (protéine = ANG3, gène = ANGPTL1) sont diminués de façon similaire dans ces mêmes modèles de souris déficientes *Nos3*<sup>680, 681</sup>. La signalisation pro-angiogène par le *Fibroblast Growth Factor* – 2 (FGF2) implique également le NO<sup>682</sup>.

### *La TSP-1 bloque l'angiogenèse médiée par le NO*

L'effet de la TSP-1 sur l'angiogenèse a largement été étudié en cancérologie.

Le niveau d'expression de la TSP-1 dans de nombreux cancers chez l'Homme est inversement corrélé avec la progression de la maladie<sup>683, 684</sup>, comme parfaitement illustré dans le cancer du colon<sup>685</sup>. Cependant quelques études ont rapporté un manque de corrélation avec la progression et d'autres, une corrélation positive avec la progression du cancer<sup>686</sup>. Toutefois, l'analyse précise des tumeurs pour lesquelles une corrélation positive a été démontrée, révèle que l'expression augmentée de TSP-1 ne provient pas des cellules tumorales elles-mêmes mais plutôt des cellules stromales de la tumeur<sup>687-689</sup>. L'induction de l'expression stromale de TSP-1 semble être un effet paracrine des facteurs de croissance sécrétés par les cellules tumorales. Les études de carcinogenèse spontanée et chimiquement induite chez des souris transgéniques pour TSP-1 ou TSP-2 soutiennent l'hypothèse que l'induction paracrine de l'expression de TSP-1 et TSP-2 a un effet inhibiteur important sur la progression de la tumeur<sup>690, 691</sup>.

Malgré des preuves évidentes montrant que la TSP-1 inhibe puissamment l'angiogenèse *in vivo*, des concentrations relativement importantes de TSP-1 sont nécessaires pour inhiber la prolifération et la migration endothéliale *in vitro*. Une des raisons pouvant expliquer cette contradiction est l'absence de NO dans ces expérimentations. En effet, la TSP-1 devient un inhibiteur 100 fois plus puissant en présence de NO exogène<sup>692</sup>. La croissance de cellules vasculaires stimulée par le NO dans une matrice tridimensionnelle de collagène est nettement plus importante à partir d'explants de muscle squelettique de souris *Thbs-1*<sup>-/-</sup> qu'à partir de ceux de souris sauvage. Une faible concentration de TSP-1 (10 pM, cf Figure 7) suffit à bloquer l'augmentation de prolifération des CE murines et humaines, d'adhésion à la matrice et de migration induite par le NO. Cette concentration est plus faible que la

concentration plasmatique usuelle<sup>693</sup>, ce qui montre que les taux de TSP-1 circulant sont suffisants pour limiter la signalisation NO-cGMP dans l'endothélium.

Cependant, l'inhibition de la signalisation NO-cGMP n'est pas restreinte aux CE. La TSP-1 inhibe cette voie de signalisation de façon importante dans les VSMC et les plaquettes<sup>694, 695</sup>. En effet, les VSMC sont une cible importante à travers laquelle la TSP-1 peut réguler la perfusion tissulaire. Par ailleurs en supprimant l'activité anti-thrombotique du NO, la TSP-1 sécrétée pendant l'activation plaquettaire possède un rôle important dans l'hémostase<sup>694</sup>. Inversement, la TSP-1 n'est pas capable de réguler la synthèse de cGMP dans la plupart des lignées de cellules tumorales<sup>696</sup>, suggérant que l'inhibition de la signalisation NO-cGMP par la TSP-1 est spécifique aux cellules vasculaires.

### *Les récepteurs de la TSP-1 impliqués dans l'inhibition de la signalisation NO*

La TSP-1 régule l'angiogenèse grâce à neuf récepteurs au moins au sein des cellules vasculaires<sup>697</sup>, capables de lier différents domaines de la TSP-1. Même si la TSP-1 est un puissant inhibiteur de l'angiogenèse, son domaine N-terminal possède une activité pro-angiogène<sup>286, 698</sup> grâce à ses interactions avec plusieurs intégrines :  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  et  $\alpha 9\beta 1$ <sup>698-701</sup>. Le domaine N-terminal de la TSP-1 module également les adhésions focales des CE et la perméabilité vasculaire via la calréticuline (CRP55) et la protéine 1 relative au récepteur des lipoprotéines de faible densité (LRP-1 ou A2MR ou APOER)<sup>702, 703</sup>.

Les motifs répétés centraux de type 1 de la TSP-1 et la TSP-2 inhibent l'angiogenèse en engageant le récepteur CD36<sup>704, 705</sup> (ou FAT, GPIIIB, GPIV), un récepteur « *scavenger* » de class B et une translocase d'acide gras, exprimé par l'endothélium des microvaisseaux et les CMLV.

Le CD47 est un récepteur de surface cellulaire de haute affinité pour le domaine C-terminal de la TSP-1 et de faible affinité pour le domaine C-terminal de la TSP-2<sup>706</sup>. Le CD47 est exprimé de façon ubiquitaire et a également un rôle important dans la régulation de la phagocytose en engageant son contre-récepteur SHPS1<sup>707</sup>.

Ces 2 récepteurs CD36 et CD47 permettent à la TSP-1 d'inhiber la signalisation NO-cGMP. L'activation du CD36 par la TSP-1 est suffisante pour inhiber la signalisation NO-cGMP mais pas indispensable. En effet, La TSP-1 reste un puissant inhibiteur de cette signalisation dans les cellules vasculaires déficientes en CD36<sup>708</sup>. Le CD47 est donc le récepteur indispensable et nécessaire à l'activité inhibitrice de la TSP-1, comme l'atteste l'absence d'activité inhibitrice de la TSP-1 dans les cellules vasculaires issues de souris *Cd47*<sup>-/-</sup><sup>708</sup>. Notamment des doses 100 fois moindre de TSP-1 sont suffisantes pour inhiber la signalisation NO-cGMP via le CD47 *versus* CD36.

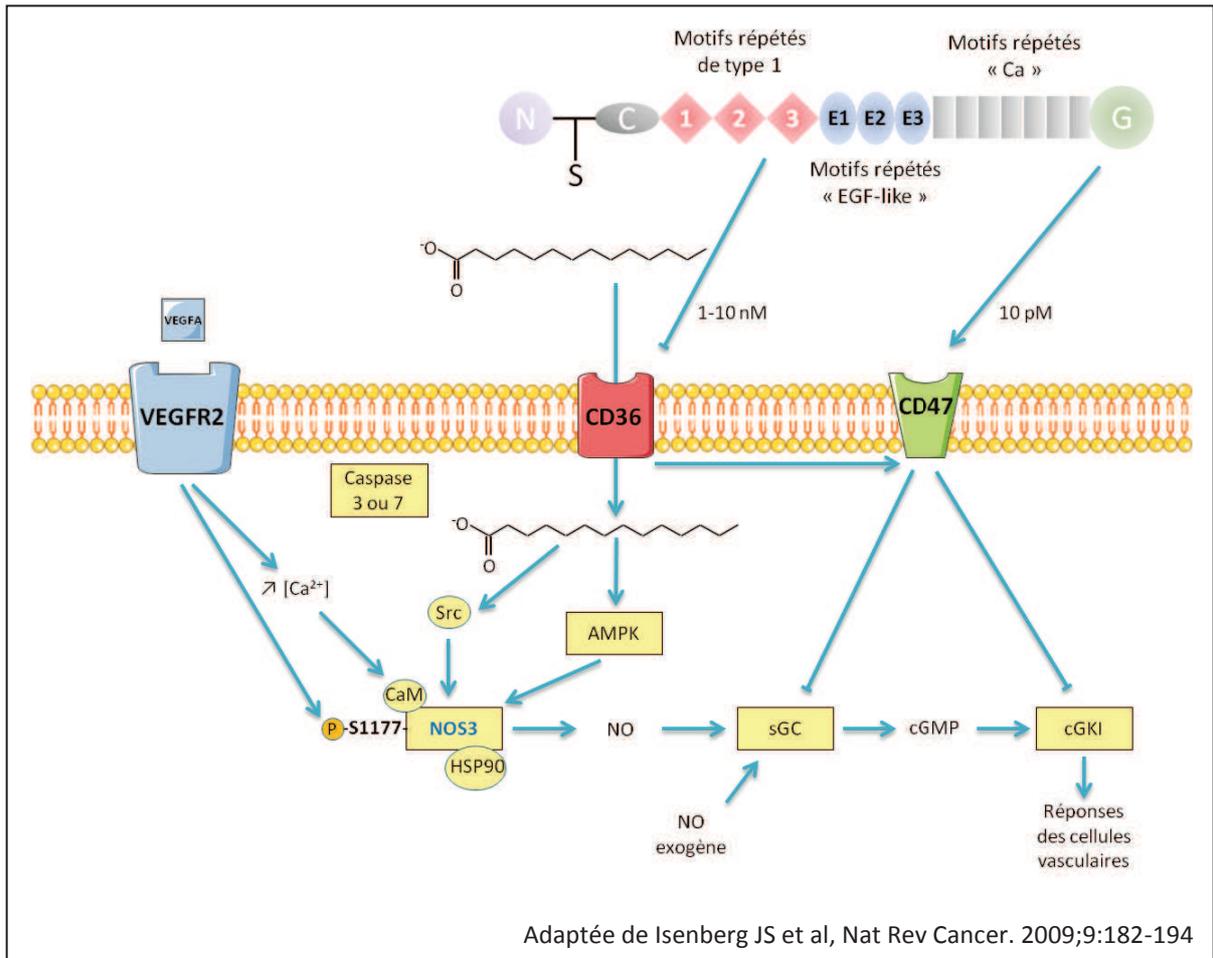


Figure 7 : TSP-1 et ses récepteurs CD47 et CD36. CD47 et CD36 permettent l'inhibition de la signalisation NO-cGMP par la TSP-1.

*La TSP-1 régule le flux sanguin.*

De part la présence du CD47 sur les CMLV, la TSP-1 est donc capable de bloquer la relaxation induite par le NO des CMLV contractées *in vitro*<sup>695</sup>. Cela peut se traduire sur la régulation du flux sanguin *in vivo*. En effet, les souris *Thbs1*<sup>-/-</sup> ou *Cd47*<sup>-/-</sup> exposées au NO voient leur flux sanguin doubler en comparaison aux souris sauvages<sup>709</sup>. La traduction physiologique de cette démonstration est que la TSP-1 endogène via le CD47 limite en permanence la réponse dynamique du flux sanguin au NO dans les tissus sains.

## 2.5. Biomarqueurs dans les pathologies cardiovasculaires

### 2.5.1. Biomarqueurs dans l'insuffisance cardiaque

De nombreux biomarqueurs, en rapport avec la pathogenèse de l'IC, ont été étudiés et testés en clinique:

- les biomarqueurs reflétant le stress du cardiomyocyte : l'adrénomedulline, les peptides natriurétiques (BNP, ANP), le ST2 (un membre de la famille des récepteurs à l'interleukine-1, existant sous une isoforme transmembranaire et une isoforme soluble <sup>710</sup>),
- les neurohormones : copeptine, endothéline, urocortine, urotensine II,
- les biomarqueurs en relation avec l'inflammation et le stress oxydatif : cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 et IL-18) et CRP, galectine-3, myéloperoxydase, neoptérine,
- les biomarqueurs en relation avec le remodelage de la MEC : MMP2, PIINP (« *Type III aminoterminal propeptide of procollagen* »), TIMP-1 (« *tissue inhibitor of metalloproteinase 1* »), ostéopontine, ostéoprotégérine,
- biomarqueur reflétant la lésion du cardiomyocyte : troponine
- autres biomarqueurs émergents : adiponectine, chromogranine-A, myostatine, GDF-15 (« *Growth Differentiation Factor-15* ») (pour revue, cf <sup>711</sup>).

Ces divers biomarqueurs utilisés individuellement apporteraient une aide au diagnostic et à l'évaluation du pronostic. Cependant, des stratégies à biomarqueurs multiples ont été développées et évaluées cliniquement. Ainsi, Sabatine *et al* ont sélectionné un marqueur de lésion du tissu cardiaque (troponine I, TnI), un marqueur d'étirement du tissu cardiaque (BNP), et un marqueur de l'inflammation (CRP), et ont pu valider dans une cohorte de 1635 patients que le nombre de biomarqueurs élevés constituait un prédicteur significatif du pronostic : les patients avec 1, 2, ou 3 biomarqueurs élevés présentaient une multiplication par 2.1, 3.1 et 3.7 respectivement du risque de décès, d'IDM ou d'IC chronique à 6 mois <sup>712</sup>. Dans une autre étude chez 358 patients atteints de SCA sans élévation du segment ST, Tello-Montoliu *et al* ont analysé les taux de TnT, de CRP, de NT-proBNP et de D-Dimères. Ils ont observé en analyse multivariée que la TnT, la CRP, le NT-proBNP, mais pas les D-Dimères, étaient des prédicteurs significatifs d'événements indésirables ; en stratégie de biomarqueurs multiples, les patients avec 3 biomarqueurs élevés présentaient un risque augmenté d'événements indésirables à 6 mois <sup>713</sup>. Par ailleurs, Zairis *et al* ont étudié la valeur pronostique combinée des taux sériques de BNP, de TnI et de CRP ultra-sensible à l'admission chez 577 patients hospitalisés pour IC. Ils ont conclu que plus le nombre de biomarqueurs élevés était important, plus le risque de décès par cause cardiaque à 31 jours augmentait graduellement <sup>714</sup>.

Cette stratégie d'étude combinant plusieurs biomarqueurs semble prometteuse, mais la principale difficulté reste de réussir à sélectionner des biomarqueurs qui présentent de faibles corrélations entre eux, afin d'obtenir la meilleure valeur clinico-biologique pour le panel ainsi choisi.

Dans ce paragraphe vont être abordés les biomarqueurs sélectionnés dans les principales études de stratégies à biomarqueurs multiples, ainsi que les biomarqueurs ayant démontré un effet sur les propriétés des ECFC.

## Troponine

Les troponines sont des protéines impliquées dans la régulation de la contraction du muscle cardiaque et squelettique. Le complexe de troponines module l'interaction actine/myosine médiée par le calcium dans le muscle strié. Les isoformes squelettique et cardiaque de ces protéines sont codées par des gènes distincts et diffèrent dans leur structure. Le complexe de troponines cardiaques est composé de la troponine I (inhibitrice), la troponine C (liant le calcium), et la troponine T (liant la tropomyosine). La troponine T (TnT) est une protéine de 37 kDa, étroitement liée au complexe cardiaque myofibrillaire troponine/tropomyosine. La troponine I (TnI) est une protéine de 24 kDa, qui diminue l'affinité pour le calcium de la troponine C, les interactions troponine/tropomyosine étant ainsi inhibées. La troponine I cardiaque (cTnI), en particulier, n'est pas exprimée par les muscles squelettiques lésés ou en régénération, et par conséquent, présente une spécificité pour les lésions des cardiomyocytes<sup>715, 716</sup>.

Ishii *et al* ont mesuré les taux sériques troponine T cardiaque (cTnT), les taux plasmatiques de BNP et la fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG) à l'admission de patients pour aggravation de leur insuffisance cardiaque<sup>717</sup>. Ils ont montré qu'une augmentation du taux de cTnT était liée à la classification fonctionnelle de la NYHA (« *New York Heart Association* ») et que les taux augmentés de cTnT et de BNP étaient des facteurs prédictifs indépendants d'événements cardiaques. Parenti *et al* ont réalisé une étude prospective longitudinale observationnelle visant à vérifier et à analyser le rôle pronostique de la troponine I cardiaque (cTnI) chez les patients en IC aigue admis au service d'urgence<sup>718</sup>. Ils ont ainsi montré que la cTnI a été détectée chez 45,5% des patients insuffisants cardiaques et que les patients avec taux détectables de cTnI avaient une classification NYHA plus péjorative à la présentation initiale, et une hospitalisation plus longue que les patients avec des taux de cTnI indétectables. En outre, des taux détectables de cTnI ont été associés à un risque accru de mortalité après ajustement par rapport aux autres facteurs pronostiques défavorables. Ces observations ont été vérifiées par Shah *et al*, qui ont observé que la cTnT est fortement associée à l'étendue des anomalies de relaxation du ventricule gauche et sa masse<sup>719</sup>. Par ailleurs, au vu des nouvelles méthodes de dosage de cTn de sensibilité accrue, actuellement en cours d'élaboration, un plus grand nombre de patients IC auront des taux de cTn détectables, ce qui pourrait améliorer la valeur pronostique de ce biomarqueur<sup>720</sup>.

## BNP

Le BNP est un peptide natriurétique. Il notamment synthétisé par les ventricules cardiaques sous forme d'une prohormone de 108 acides aminés, subissant un clivage protéolytique et générant un peptide C-terminal actif de 32 amino-acides, le BNP, et un fragment N-terminal inactif, le NT-proBNP. La synthèse et le relargage du BNP sont essentiellement stimulés par l'élongation du ventricule suite à l'augmentation de pression physiologique ou à une surcharge volumétrique<sup>721</sup>.

En 1994, Davis *et al* ont montré que des taux plasmatiques élevés de BNP à l'admission reflétaient précisément le diagnostic final d'IC. De plus ils ont observé une forte corrélation négative entre la FEVG et le taux de BNP<sup>722</sup>. Le BNP a également été démontré comme étant en relation avec le degré de sévérité de la maladie déterminé avec la classification NYHA<sup>723</sup>. Le NT-proBNP est également un marqueur fiable d'IC aigue. En 1995, Hunt *et al* furent les premiers à établir que les concentrations plasmatiques de NT-proBNP étaient

considérablement élevées chez les patients IC par rapport aux sujets sains, jusqu'à 9 fois plus élevées que les taux de BNP <sup>724</sup>. Le NT-proBNP est également fortement associé à la sévérité de la maladie évaluée selon la classification NYHA <sup>725</sup>. En 2003, Lainchbury *et al* ont démontré que les dosages de NT-proBNP et de BNP présentaient des performances comparables pour la gestion des patients atteints de dyspnée aiguë <sup>726</sup>. Diverses méthodes de dosage rapides et sensibles ont depuis été développées, et la mesure du taux de BNP ou NT-proBNP constitue le marqueur biologique complémentaire aux examens cliniques pour le diagnostic d'IC selon les recommandations de l'ESC (« *European Society of Cardiology* »).

### *Protéine C-réactive (CRP)*

Une étude publiée en 1956 a rapporté que la protéine C-réactive a été détectée chez 30 patients sur 40 atteints d'insuffisance cardiaque chronique, et que l'insuffisance cardiaque était plus sévère chez ceux avec des taux élevés de CRP <sup>727</sup>. Par la suite, la CRP a été décrite comme une protéine réactive de phase aiguë, synthétisée par les hépatocytes en réponse à la cytokine pro-inflammatoire interleukine-6 <sup>728</sup>. En outre, la CRP a été démontrée comme exerçant des effets nocifs directs sur l'endothélium vasculaire en réduisant la libération d'oxyde nitrique et en augmentant la production d'endothéline-1, de même qu'en induisant l'expression de molécules d'adhésion endothéliales <sup>729</sup>. Ces résultats suggèrent que la CRP pourrait également jouer un rôle causal dans la maladie vasculaire et pourrait donc être une cible thérapeutique potentielle. Une étude plus récente a démontré que des taux élevés d'IL-6 et de CRP permettent de distinguer chez les patients en IC aiguë décompensée, ceux ayant une dysfonction systolique ventriculaire gauche de ceux ayant une fonction ventriculaire gauche préservée <sup>730</sup>.

Cependant, les taux élevés de CRP manquent de spécificité : une infection aiguë ou chronique, le tabagisme, les syndromes coronariens aigus, et les états inflammatoires actifs sont souvent associés à des niveaux élevés de CRP.

### *Ostéoprotégérine*

L'ostéoprotégérine (OPG) est un récepteur de cytokine et un membre de la superfamille des récepteurs du TNF. L'OPG et son ligand, l'activateur du récepteur du facteur  $\kappa$ B nucléaire (RANKL), régulent le remodelage osseux <sup>731</sup>. Chez les patients de l'essai CORONA (« *Controlled Rosuvastatin Multinational Trial in Heart Failure* »), qui ont été randomisés pour recevoir 10 mg de rosuvastatine ou du placebo, les taux d'OPG ont apporté des informations prédictives indépendantes sur l'aggravation de l'IC chez les patients les plus âgés ayant une IC chronique <sup>732</sup>. Les taux plasmatiques d'OPG ont également été évalués chez 1229 patients atteints d'IC, recrutés dans 51 centres et inclus dans l'essai GISSI-HF (« *Gruppo Italiano per lo studio della nell'Infarto Sopravvivenza Miocardico-Heart Failure* »). Après ajustement par rapport aux marqueurs de risque cardiovasculaires classiques, l'OPG restait un important biomarqueur prédictif de la mortalité <sup>733</sup>.

De façon intéressante, notre équipe a démontré que les ECFC expriment l'OPG et le RANK, et que l'expression de l'ARNm de l'OPG est stimulée par le VEGF et le SDF-1 ; par ailleurs l'OPG améliore les propriétés de vasculogénèse des ECFC, en rapport avec la surexpression de SDF-1 observée 4 heures après stimulation des ECFC par l'OPG <sup>734</sup>. Dans le contexte d'IC chronique, les taux augmentés d'OPG pourraient illustrer, soit une tentative de

compensation inefficace par les ECFC, soit à l'opposé un effet néfaste dans ce contexte physiopathologique précis.

### 2.5.2. Biomarqueurs dans les syndromes coronariens aigus

La présentation clinique la plus péjorative d'un SCA est l'infarctus aigu du myocarde, où le pronostic vital sera engagé si la prise en charge est trop tardive. Un certain nombre de biomarqueurs ont donc été étudiés pour permettre une prise en charge de l'IDM la plus précoce possible, afin d'améliorer le pronostic des patients coronariens. De même que pour l'IC, ces divers biomarqueurs apportent une aide au diagnostic et à l'évaluation du pronostic. De nombreux marqueurs biochimiques ont montré une utilité clinique dans la détection précoce de l'ischémie et de la nécrose myocardique: la LDH (lactate déshydrogénase), la CK-MB (créatine kinase isoforme MB)<sup>735-737</sup>, la troponine cardiaque<sup>738-740</sup>, la myoglobine<sup>741, 742</sup>, l'albumine modifiée par l'ischémie<sup>743, 744</sup>, la fraction d'acides gras libre non liée à l'albumine (« *serum unbound free fatty acid fraction* », FFA<sub>u</sub>)<sup>745</sup> et la protéine de liaison aux acides gras de type cardiaque (« *heart-type fatty acid-binding protein* », H-FABP)<sup>746-748</sup>. D'autres biomarqueurs comme le BNP<sup>749-752</sup> et la CRP<sup>753, 754</sup> sont utilisés pour la stratification du risque chez les patients présentant un SCA.

Le processus inflammatoire concerne un aspect à part de la physiopathologie des SCA. Les biomarqueurs de l'inflammation pourraient donc fournir des informations indépendantes de celles fournies par les biomarqueurs de la nécrose des cardiomyocytes et par ceux du stress hémodynamique. Les médiateurs inflammatoires concernés sont représentatifs aussi bien des phases précoces que tardives de la rupture de la plaque d'athérome. Les biomarqueurs inflammatoires qui estimeraient le mieux l'inflammation cardiovasculaire spécifique sont les cytokines inflammatoires, les marqueurs du stress oxydatif, les marqueurs de la dégradation de la MEC et les marqueurs d'activation plaquettaire. Ainsi, les nouveaux biomarqueurs de l'inflammation qui ont été évalués dans les SCA sont l'interleukine-6 (IL-6)<sup>755</sup>, la myéloperoxydase (MPO)<sup>756, 757</sup>, la MMP-2 et la MMP-9<sup>758</sup>, le CD40 et le CD40L<sup>759, 760</sup> notamment.

Comme pour l'IC, des stratégies à biomarqueurs multiples pour l'évaluation du risque et pour le diagnostic d'un SCA ont été testées. Notamment, Sabatine *et al* ont montré qu'une approche combinant le BNP, la CRP et la cTnI, permettait de distinguer une augmentation du risque de mortalité variant de 6 à 13 fois, entre les patients dont aucun de ces 3 biomarqueurs étaient élevés et ceux qui présentaient une élévation simultanée des taux de ces 3 biomarqueurs<sup>712</sup>. Plus récemment, Apple *et al* ont étudié chez 457 patients hospitalisés pour une symptomatologie de SCA, un panel de 7 biomarqueurs : MPO, sCD40L, PIGF, MMP-9, hsCRP, cTnI, et NT-proBNP. Ils ont également estimé le débit de filtration glomérulaire (DFGe) par la formule « MDRD » (*Modification of Diet in Renal Disease*). Le critère clinique primaire d'évaluation était la survenue d'évènements cardiaques (IDM, intervention coronaire percutanée, pontage coronarien, ou décès de cause cardiaque) ou toutes autres causes de décès. Ils ont ainsi observé que les patients ayant simultanément des taux élevés de PIGF, de NT-proBNP, de hsCRP, de cTnI, ou une diminution du DFGe, présentaient une augmentation significative du taux de mortalité de toutes causes. Ce taux de mortalité n'était pas augmenté chez les patients avec des taux élevés de MPO, sCD40L et MMP-9, par rapport aux patients avec des taux normaux. En outre, des taux élevés de NT-

proBNP ou de cTnl se sont révélés être des biomarqueurs prédictifs indépendants d'évènements cardiaques<sup>761</sup>.

### 2.5.3. Focus sur le *Placental Growth Factor* (PIGF)

#### *Le récepteur VEGFR1 ou FLT1*

La famille VEGFR comprend 3 récepteurs: FLT1, FLK1 et FLT4 (également connu sous le nom de VEGFR1, VEGFR2 et VEGFR3, respectivement)<sup>762</sup>. FLK1 lie le VEGF-A et le VEGF-C (et lie aussi le VEGF-D chez certaines espèces); c'est le récepteur primaire qui entraîne l'angiogenèse, que ce soit dans des conditions physiologiques ou pathologiques. FLT4 lie le VEGF-C et le VEGF-D. En revanche, FLT1 lie le VEGF-A, le VEGF-B et le PIGF. FLK1 et FLT1 sont constitués de sept domaines extracellulaires « immunoglobuline (Ig)-like », d'une région transmembranaire et d'un domaine tyrosine-kinase intracellulaire<sup>763</sup>. La poche de liaison au ligand est située dans les second et troisième domaines « Ig » de ces deux récepteurs<sup>764</sup>. Le VEGF-A se lie au FLT1 avec une affinité (constante de dissociation  $K_d \approx 2-10$  pM) qui est beaucoup plus élevée que pour FLK1<sup>765</sup>. Cependant, le VEGF-A induit une plus faible activité tyrosine kinase avec FLT1<sup>766, 767</sup>, probablement en raison d'une séquence inhibitrice dans le domaine juxtamembranaire qui réprime l'activité de FLT1<sup>768</sup>. Cette faible activité tyrosine kinase de FLT1 et sa forte affinité pour le VEGF-A ont conduit à l'élaboration d'un modèle dans lequel FLT1 agit comme un récepteur leurre et module l'angiogenèse par sa capacité à séquestrer le VEGF-A, réduisant ainsi la signalisation par FLK1<sup>769</sup>. Conformément à ce modèle, la perte de FLT1 provoque une létalité embryonnaire par une prolifération vasculaire excessive et désorganisée, alors que la délétion du gène *Flt1* dans les vaisseaux dérivés de cellules souches embryonnaires (ESC) induit prolifération excessive des CE et une dysmorphogenèse des vaisseaux<sup>770, 771</sup>. En revanche, les souris qui expriment un variant *Flt1* ancrée dans la membrane, dépourvu d'un domaine tyrosine-kinase (*Flt1<sup>TK-/-</sup>*), mais encore capable de piéger les ligands de *Flt1*, sont viables et ne présentent pas de défauts vasculaires<sup>183</sup>. Ces constatations renforcent le concept selon lequel FLT1 régule le développement vasculaire en séquestrant le VEGF-A en excès, et empêche donc la suractivation de la signalisation FLK1<sup>183</sup>.

D'autres éléments de preuve indiquent que FLT1 régule l'angiogenèse par la transmission de signaux intracellulaires. En effet, les souris *Flt1<sup>TK-/-</sup>* ont une inflammation et une angiogenèse diminuées dans divers modèles de maladies, y compris l'arthrite, l'athérosclérose, la néovascularisation choroïdienne et les métastases pulmonaires<sup>184, 772-774</sup>. En outre, les tumeurs qui surexpriment le PIGF se développent moins rapidement chez les souris *Flt1<sup>TK-/-</sup>*<sup>184, 775</sup>. Les ligands naturels du FLT1, comme le VEGF-A et le PIGF, induisent la signalisation FLT1 et la phosphorylation de tyrosines spécifiques<sup>776</sup>. De plus, FLT1 phosphorylé contribue à la survie des cellules tumorales lors de la transition épithéliale-mésenchymateuse<sup>777</sup>. Par ailleurs, le récepteur chimérique « *break point cluster region protein* » (BCR)-FLT1, dans lequel la séquence ABL1 de l'oncoprotéine de fusion de la leucémie myéloïde chronique humaine BCR-ABL1 est remplacée par le domaine tyrosine-kinase constitutivement actif de FLT1, a un potentiel de transformation (fibroblastes transformés de rat qui acquièrent la capacité de former des structures tubulaires dans la matrice de la membrane basale)<sup>778</sup>. L'activation médiée par FLT1 de la MAPK induit la croissance clonale de cellules du cancer du côlon, ainsi que la prolifération, la motilité et l'invasion dans diverses lignées de cellules

cancéreuses<sup>779, 780</sup>. FLT1 a également été décrit comme impliqué dans l'activation et le recrutement de progéniteurs médullaires, de cellules inflammatoires, de CML et de cellules dendritiques. Comme dans plusieurs de ces types cellulaires, y compris les cellules tumorales, qui n'expriment pas ou expriment des niveaux minimaux de FLK1<sup>781, 782</sup>, FLT1 ne se contente pas d'affiner les processus axés sur la signalisation VEGF-FLK1, mais semble plutôt induire une cascade de signaux de transduction. Néanmoins, le potentiel de signalisation de FLT1 reste controversé. Par exemple, des mutants VEGF-A conçu pour se lier sélectivement à FLT1 mais pas à FLK1 ne génèrent pas de signaux mitogéniques dans les CE<sup>783</sup>.

#### *PIGF : mécanismes moléculaires et cellulaires.*

Le PIGF a été découvert peu après l'identification du VEGF-A<sup>235</sup>. Le gène humain code quatre isoformes (PIGF1 à 4), alors que le gène *Plgf* murin code une unique isoforme (Plgf2). Contrairement au VEGF-A, qui se lie à la fois à FLT1 et FLK1, le PIGF se lie à FLT1 mais pas à FLK1, et il se lie également à la neuropiline 1 et 2<sup>784, 785</sup>. Le PIGF induit divers effets biologiques *in vitro* et *in vivo* en affectant un large éventail de types cellulaires différents. Le PIGF peut stimuler la croissance et la maturation des vaisseaux, directement en affectant les CE et murales, aussi bien qu'indirectement, par le recrutement de cellules pro-angiogènes. En effet, le PIGF stimule la croissance, la migration et la survie des CE<sup>185, 786-788</sup>, augmente la prolifération des fibroblastes et des CML, induit une vasodilatation et stimule la croissance des vaisseaux collatéraux<sup>782, 789</sup>. Il favorise également le recrutement et la maturation des progéniteurs myéloïdes compétents pour l'angiogenèse vers les sites de bourgeonnement vasculaire et au niveau des vaisseaux collatéraux<sup>790-794</sup>. Le PIGF active et attire également les macrophages qui libèrent des molécules angiogènes et lymphangiogènes<sup>795</sup>, et inhibe la différenciation des cellules dendritiques.

Plusieurs études ont analysé les mécanismes moléculaires de fonctionnement du PIGF. Ce facteur de croissance stimule l'angiogenèse, en partie par stimulation de la signalisation VEGF. Il déplace le VEGF-A du FLT1, qui libère le VEGFA et lui permet d'activer FLK1, et stimule l'angiogenèse médiée par le VEGF<sup>769</sup>. Le PIGF régule aussi l'expression du VEGF-A, du « *fibroblast growth factor 2* » (FGF2), du « *platelet derived growth factor β* » (PDGFβ), des « *matrix metalloproteinases* » (MMP) et d'autres facteurs angiogènes<sup>796, 797</sup>. En outre, la liaison de PIGF à FLT1 conduit à un « *cross-talk* » intermoléculaire entre FLT1 et FLK1, qui amplifie la signalisation FLK1, et par conséquent améliore les réponses médiées par le VEGF<sup>776</sup>. Ces effets du PIGF suggèrent que les CE améliorent leur réactivité propre au VEGF-A en produisant du PIGF<sup>776</sup>. Toutefois, le PIGF est également capable d'induire ses propres signaux via FLT1 indépendamment du VEGF-A. En effet, le profil d'expression génique des CE a révélé que le PIGF induit une signalisation directement via FLT1 et bascule sur un certain nombre de gènes pro-angiogènes<sup>776, 798</sup>. C'est également le cas pour les macrophages, qui expriment à l'origine FLT1 et non FLK1, comme l'atteste de nombreuses études<sup>765, 781</sup>. En outre, des études de spectrométrie de masse ont montré que le PIGF et le VEGF-A induisent la phosphorylation de résidus tyrosine cibles de FLT1<sup>776</sup>, ce qui renforce l'hypothèse que le PIGF et le VEGF-A transmettent des signaux angiogènes distincts via le récepteur FLT1. Comme indiqué précédemment, le « *cross-talk* » intermoléculaire entre FLT1 et FLK1 repose également sur la signalisation via FLT1<sup>776</sup>.

Les actions pléiotropiques du PIGF expliquent aussi pourquoi ce facteur de croissance induit plusieurs effets biologiques distincts *in vivo*. Par exemple, l'expression d'un transgène *PIGF*

ou d'un gène viral *PIGF*, ou l'administration de PIGF recombinant *in vivo*, stimule l'angiogenèse au niveau de l'épiderme<sup>185, 799</sup>, la revascularisation du cœur et des membres ischémiques<sup>790, 792, 800, 801</sup> et la cicatrisation des plaies chez les souris diabétiques<sup>802</sup>. Le PIGF stimule également la microcirculation dans les muscles dystrophiques âgés<sup>803</sup>, et il favorise également l'angiogenèse, la perméabilité et l'inflammation dans l'athérosclérose, l'arthrite et d'autres maladies inflammatoires<sup>790, 791, 804, 805</sup>. De plus, le PIGF endogène est essentiel pour le rétablissement du flux sanguin dans les membres ischémiés, médié par le FGF2<sup>806</sup>, stimule la migration des kératinocytes au cours de la cicatrisation cutanée<sup>807</sup>, et fonctionne comme un facteur chimiotactique pour les progéniteurs mésenchymateux pendant l'ossification<sup>808</sup>. Le fait que le PIGF ait été démontré comme affectant l'angiogenèse (et la lymphangiogenèse indirectement), l'inflammation, les cellules stromales, la niche métastatique<sup>809</sup>, la croissance, la survie et la migration des cellules tumorales métastatiques<sup>786, 790, 810</sup>, et la maturation des cellules dendritiques et les réponses immunitaires anti-tumorales<sup>811</sup>, explique pourquoi il a une telle diversité d'effets<sup>32, 787, 796</sup>.

Cependant, d'autres études sur le PIGF ne soutiennent pas les données présentées ci-dessus. Par exemple, le PIGF ne parviendrait pas à stimuler la croissance et la migration des CE *in vitro*, et induirait seulement un faible signal « tyrosine kinase » via FLT1<sup>769</sup>. Ce manque de réactivité endothéliale vis-à-vis du PIGF exogène pourrait être dû, au moins en partie, à l'abondante production endogène de PIGF par les CE en culture, ce qui pourrait saturer FLT1 et empêcher une réponse au PIGF exogène. Cette hypothèse est étayée par l'observation que les CE déficientes en PIGF répondent facilement au PIGF exogène<sup>185</sup>. Il a également été proposé que PIGF inhibe l'angiogenèse lorsque le PIGF est surexprimé à un niveau supra-physiologique dans les tumeurs. Lorsque le PIGF est surexprimé dans des cellules qui produisent aussi du VEGF-A, des hétérodimères « VEGF-A / PIGF » sont formés, ce qui réduit le pool intracellulaire de VEGF-A, et donc la formation d'homodimères angiogènes « VEGF-A / VEGF-A »<sup>812-814</sup>. Conformément à ces données, un variant de PIGF qui est retenu dans le réticulum endoplasmique favorise la formation d'hétérodimères intracellulaires « VEGF-A / PIGF » ; cela réduit la formation d'homodimères « VEGF-A / VEGF-A », inhibant ainsi l'angiogenèse tumorale<sup>815</sup>. Toutefois, le rôle précis des hétérodimères « VEGF-A / PIGF » reste controversé, car ils ont également été suggérés comme étant pro-angiogènes<sup>816</sup>. Il existe également actuellement quelques preuves selon lesquelles la formation naturelle d'hétérodimères « VEGF-A / PIGF » induirait des effets anti-angiogènes dans des conditions physiologiques. Une autre question en suspens est de savoir si ce mécanisme anti-angiogène du PIGF n'est observé que lorsque le PIGF est surexprimé à des taux supra-physiologiques. En effet, d'autres études ont montré que la surexpression à un taux plus modeste de PIGF stimule, mais n'inhibe pas l'angiogenèse et la croissance tumorales<sup>32, 184, 775, 787</sup>. La surexpression transgénique de PIGF dans la peau augmente également la croissance, l'angiogenèse et la métastase des mélanomes<sup>796</sup>, alors que la neutralisation pharmacologique du PIGF inhibe l'angiogenèse et la croissance tumorales (Tableau 9). De prochaines études seront nécessaires pour résoudre ces questions.

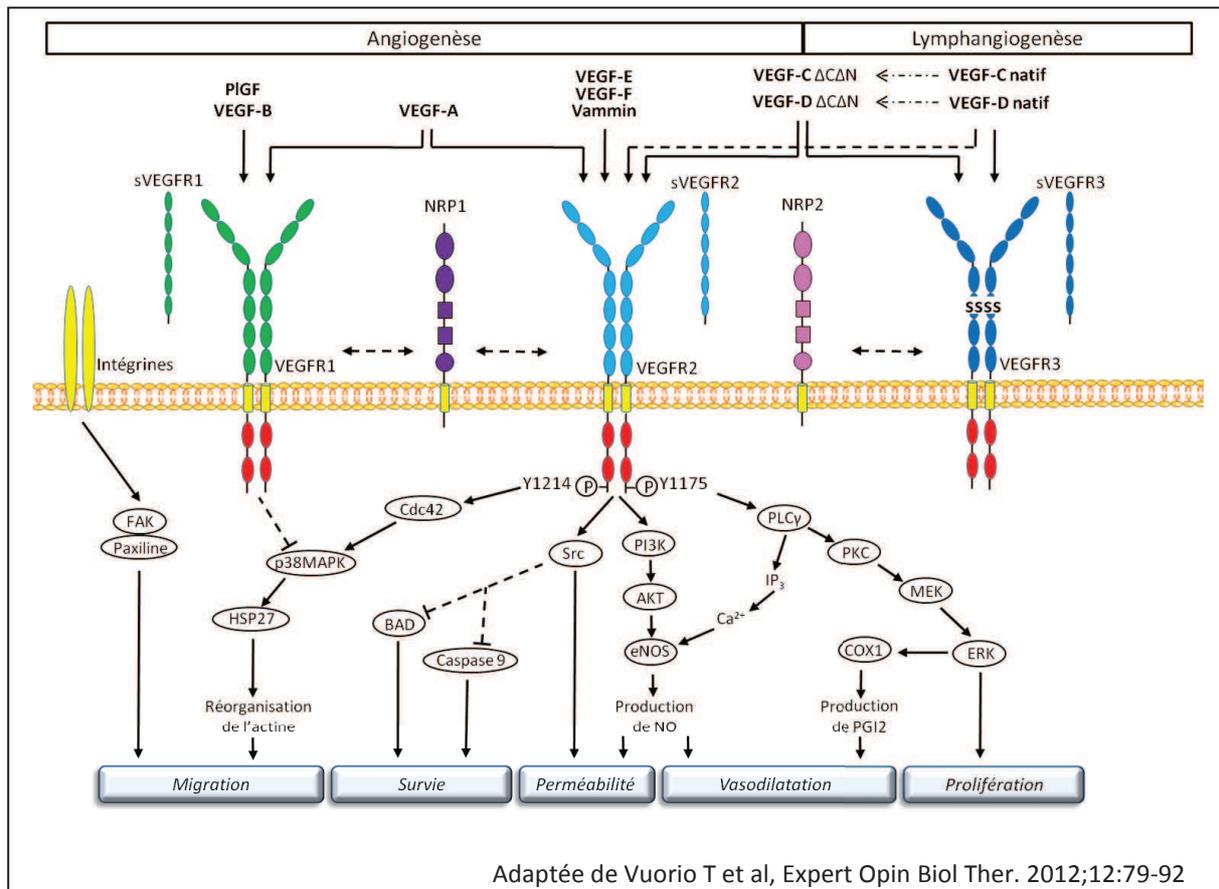


Figure 8 : Signalisation des récepteurs VEGFR et de leurs co-récepteurs NRP, après activation par leurs différents ligands, au niveau des CE, des macrophages et des CML notamment. Le VEGF-A se lie au VEGFR2 et au VEGFR1, ce dernier agissant comme un régulateur négatif vis-à-vis du VEGFR2 et du VEGF-A ; le PIGF et le VEGF-B sont des ligands spécifiques du VEGFR1 ; le VEGF-E et le VEGF-F activent spécifiquement le VEGFR2 ; le VEGF-C et le VEGF-D dans leur forme native ont une forte affinité pour le VEGFR3 et une affinité moindre pour le VEGFR2 ; après protéolyse par la plasmine, les VEGF-C & -D perdent leurs extrémités N-ter et C-ter et leur affinité pour le VEGFR2 est augmentée ; NRP1 et NRP2 sont des co-récepteurs pour les VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, et amplifient les effets des VEGF ; la NRP1 peut lier directement le PIGF et les VEGF-B, -C, -D, et -E ; la NRP2 peut lier directement les VEGF-C et -D ; les formes solubles des VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 agissent comme des inhibiteurs compétitifs de la liaison des VEGF à leurs récepteurs de surface cellulaire, et régulent donc les effets des VEGF.

Tissu	Gain de fonction PIGF	Perte de fonction PIGF
Général	Non déterminé	« Knockout » : viable et fertile sans défauts vasculaires
Placenta	Non déterminé	« Knockout » : angiogenèse diminuée dans les ovaires ; différenciation des cellules NK altérée dans l'endomètre
Cœur	Revascularisation du myocarde ischémié & l'élargissement des vaisseaux dans le myocarde distal préserve la performance cardiaque en cas d'infarctus	« Knockout » : angiogenèse diminuée et inflammation dans la zone infarctée ; exercice physique normal induit l'angiogenèse
Muscle squelettique	Le PIGF recombinant ou l'administration du gène <i>PIGF</i> améliore l'angiogenèse, la croissance de vaisseaux collatéraux et le flux sanguin dans le membre ischémié, et restaure la microcirculation dans le muscle dystrophique âgé	« Knockout » : croissance vasculaire collatérale diminuée dans le membre ischémié ; exercice physique normal induit l'angiogenèse
Œil	Le PIGF prévient l'oblitération vasculaire en cas d'hypoxie sans impliquer la néovascularisation ; l'injection intra-vitreuse de PIGF provoque la rupture de la barrière rétinienne et l'œdème	« Knockout » : néovascularisation choroïdale diminuée ; l'absence de PIGF ou l'administration d'Ac anti-PIGF ne diminue pas la vascularisation rétinienne pendant le développement
Système vasculaire	l'administration du gène <i>PIGF</i> augmente l'athérosclérose, l'accumulation de macrophage et la néovascularisation, et induit l'angiogenèse chez les souris saines	« Knockout » : diminue la taille et le contenu des macrophages des lésions athérosclérotiques précoces chez les souris ApoE <sup>-/-</sup>
Peau	l'administration du gène <i>PIGF</i> accélère la cicatrisation ; la surexpression du PIGF augmente la vascularisation de la peau sans affecter le réseau lymphatique et stimule la réponse cutanée allergique retardée	« Knockout » : développement lymphatique et sanguin normal ; cicatrisation cutanée diminuée, et diminution de la réponse cutanée allergique retardée
Os & tissu adipeux	Non déterminé	« Knockout » : métabolisme osseux et cartilagineux diminué pendant la réparation d'une fracture, angiogenèse et obésité diminuées
Tumeur	la surexpression du PIGF dans l'épiderme ou les cellules tumorales augmente la croissance tumorale, l'angiogenèse et la métastase, et redirige la niche pré-métastatique ; elle inhibe également l'angiogenèse et la croissance tumorale via la formation d'hétérodimères « VEGFA-PIGF »	« Knockout » : angiogenèse et croissance tumorale diminuées ; l'Ac anti-PIGF bloque la croissance tumorale, la métastase, la lymphangiogenèse et l'angiogenèse ; le peptide antagoniste du système PIGF-FLT1 bloque la croissance des xénogreffes de tumeurs humaines
Moelle osseuse	Le PIGF reconstitue l'hématopoïèse par la stimulation de la différenciation et la mobilisation de cellules souches, et recrute les progéniteurs médullaires angiogènes et les macrophages vers les néovaisseaux	L'absence de PIGF ou l'administration d'Ac anti-PIGF diminue le recrutement de progéniteurs médullaires et des macrophages vers les néovaisseaux

Tableau 9 : Phénotypes pour une mutation « perte de fonction » ou « gain de fonction » du gène PIGF selon le tissu cible. Adapté de Fischer C et al, Nature Reviews Cancer 2008;8:942-956

## **2.6. Conclusion : Intérêts clinico-biologiques des biomarqueurs plasmatiques en pathologies humaines**

Dans cette seconde partie de ma thèse, les différents biomarqueurs passés en revue (de manière non exhaustive) aussi bien dans la fibrose pulmonaire idiopathique, l'artériopathie des membres inférieurs, que dans les pathologies cardiovasculaires, illustrent bien que la notion de biomarqueur idéal (cf § 2.2.) est utopique. Cependant, les biomarqueurs les plus performants utilisés en pratique clinique courante (par exemple : troponine et BNP entre autres) présentent de nombreux avantages : méthode peu invasive (prélèvement sanguin) pour obtenir l'analyte ; méthode de dosage automatisable et rapide ; précision de la mesure élevée ; bonnes reproductibilité, répétabilité, sensibilité et spécificité notamment.

Par ailleurs, mais non nécessairement, le biomarqueur peut être informatif sur la pathogenèse de la maladie en question. En effet, l'analyte peut être un marqueur biologique d'une cause, ou refléter une conséquence du phénomène pathologique, même si ce point peut rester spéculatif alors que le biomarqueur a déjà une utilité prouvée en clinique.

Dans l'idéal, un biomarqueur devrait contribuer fortement à établir le diagnostic, permettre d'évaluer le pronostic, et permettre de suivre l'évolution de la maladie et/ou l'efficacité du traitement. Mais encore une fois, peu de (voire aucune) protéines plasmatiques sont capables de respecter toutes ces caractéristiques à un niveau élevé, et cela souvent du fait de critères épidémiologiques limitant. Du point de vue du développement d'un traitement (notamment en phase 3 voire 4), un biomarqueur plasmatique performant peut avoir un intérêt remarquable.

Les travaux présentés dans cette thèse n'avaient pas pour but principal d'identifier un biomarqueur « idéal » pour la pathologie concernée, mais plutôt de déterminer si une protéine ayant un rôle physiopathologique probable pourrait être un potentiel biomarqueur, en dans ce cas de décrire ses effets sur les propriétés angiogènes des ECFC (ayant également un rôle physiopathologique probable). Les modèles pathologiques d'étude choisis étant caractérisés par une dysfonction vasculaire, la stratégie de sélection de potentiels biomarqueurs plasmatiques s'est naturellement orientée vers des protéines ayant une action sur l'angiogenèse. Ainsi, il nous a été possible de décrire si l'environnement de protéines plasmatiques dans la pathologie concernée constituait un contexte qui freinerait la réparation vasculaire, ou au contraire qui optimiserait l'efficacité d'un produit de thérapie cellulaire, notamment si ce dernier était composé au moins en partie d'ECFC.



# OBJECTIFS DU TRAVAIL



Les termes « progéniteurs endothéliaux circulants » ou « cellules progénitrices endothéliales » tendent à devenir obsolètes car ils ne définissent pas une entité cellulaire unique. Depuis la première description des PEC en 1997, il est maintenant reconnu que le recrutement des PEC dérivés de la moelle osseuse est un mécanisme primaire de réparation des sites de lésion vasculaire. Les nombreuses études cliniques qui ont été menées chez les sujets humains atteints de diverses pathologies cardiovasculaires, métaboliques, malignes, auto-immunes, inflammatoires ou encore d'autres pathologies caractérisées par des anomalies de remodelage vasculaire, ont rapporté des changements de concentrations et/ou de fonctionnalité des PEC, en corrélation avec la sévérité ou le risque d'évolution défavorable pour l'état pathologique concerné. Ces données sur les PEC dans ces contextes pathologiques, combinées à la capacité des PEC humains à rétablir un flux sanguin artificiellement diminué dans les modèles précliniques animaux, ont fourni le rationnel afin d'initier des essais cliniques pour injecter des PEC ou des cellules issues de la moelle osseuse chez des patients atteints de désordres vasculaires systémiques ou cardiaques. Les résultats de ces études ont largement prouvé la faisabilité et la sécurité de l'injection de ces populations cellulaires, ainsi que ses effets bénéfiques, même s'ils semblent moins robustes chez l'humain que chez les rongeurs. Cependant, au sein de ces populations cellulaires hétérogènes testées, le type cellulaire majoritairement responsable de ces effets bénéfiques reste mal défini. Les cellules humaines ayant les caractéristiques les plus proches d'une cellule progénitrice endothéliale sont les ECFC<sup>817</sup>. Afin de participer à une meilleure définition des précurseurs vasculaires impliqués dans le phénomène de vasculogénèse post-natale, nous avons décidé de focaliser mon travail de thèse sur les ECFC.

### *Hypothèse de travail*

Le comportement des ECFC dans une pathologie vasculaire donnée est susceptible d'être soumis à l'influence d'une (ou plusieurs) protéine(s) en rapport direct ou indirect avec la maladie. Le fait que les variations de concentration plasmatique de cette protéine présentent une certaine spécificité vis-à-vis de la pathologie étudiée, lui confère un potentiel rôle de biomarqueur. En supposant que les ECFC puissent être impliquées dans la pathogénèse ou la compensation de la maladie vasculaire étudiée, la caractérisation des effets du biomarqueur sur la fonctionnalité des ECFC pourrait nous permettre de mieux comprendre leur rôle dans l'homéostasie vasculaire ainsi que de préciser leur définition.

### *Buts de l'étude*

A partir de modèles de pathologies vasculaires définis, nous avons cherché à mettre en évidence un potentiel biomarqueur plasmatique parmi des protéines modulant l'angiogénèse et/ou des marqueurs de l'endothélium vasculaire. Nous avons ensuite évalué le rôle de ce biomarqueur dans des modèles précliniques de vascularisation et de revascularisation post-ischémique ; l'effet du biomarqueur a ensuite été testé *in vitro* sur les propriétés angiogènes des ECFC, soit directement, soit via une stratégie d'inhibition. Les résultats de ces expérimentations nous ont permis d'apporter des éléments de réponses par rapport à notre hypothèse de travail.

### *Critères de choix des modèles pathologiques d'étude*

Les anomalies vasculaires à l'origine d'un phénomène ischémique ou résultant d'un remodelage vasculaire pathologique sont des situations où pourraient être recrutés les PEC et donc plus particulièrement les ECFC. Le rôle des ECFC serait soit de limiter les effets délétères de ces situations ischémiques, soit au contraire de participer à un phénomène de vascularisation anormale. Ces différents contextes pathologiques permettent de définir le rôle des PEC en physiologie humaine, et sont à l'origine de la notion de vasculogénèse post-natale.

La FPI est une pathologie où l'on observe des anomalies vasculaires associées à la fibrose dues à une angiogenèse excessive et/ou un remodelage vasculaire aberrant. Notre hypothèse est que les ECFC pourraient jouer un rôle causal dans la pathogenèse de la FPI, où ils seraient dans un environnement qui stimulerait leurs propriétés angiogènes, l'ensemble aboutissant à une vascularisation excessive inadéquate et non efficiente.

Dans l'AOMI, pathologie artérielle périphérique, l'ischémie chronique s'installe suite à une obstruction vasculaire d'origine athérosclérotique, déclenchant ainsi une angiogenèse réactionnelle, avec développement physiologique de vaisseaux collatéraux où pourrait intervenir les ECFC. Dans ce contexte, les ECFC seraient recrutés afin de limiter voire de récupérer de cette situation d'ischémie chronique.

Les SCA comprennent plusieurs affections cardiaques, où comme dans l'AOMI a lieu une obstruction vasculaire d'origine athérosclérotique, mais qui touche les artères coronaires et abouti à une ischémie myocardique. Dans cette situation d'ischémie aiguë les ECFC pourraient également être recrutés afin de limiter l'étendue de cette ischémie pouvant engager le pronostic vital. L'IDM et l'IC peuvent nécessiter une intervention chirurgicale thérapeutique (pontage coronarien, remplacement de valve) au cours de laquelle sera mise en place une circulation extracorporelle, situation hypoxémique reconnue pour mobiliser les PEC issus de la moelle osseuse<sup>427</sup> et donc potentiellement les ECFC<sup>433</sup>.

Ces 3 modèles pathologiques permettent d'envisager que les ECFC participeraient au phénomène déclenchant/causal de la maladie (FPI), ou au contraire participeraient à une réaction physiologique pour limiter les effets délétères de l'ischémie périphérique (AOMI) ou myocardique (SCA).

### *Critères de choix pour le « screening » des biomarqueurs plasmatiques*

Dans ces 3 situations pathologiques choisies, définir l'environnement moléculaire dans lequel se retrouveraient les ECFC permettrait de mieux comprendre leurs fonctions biologiques. Dans ces 3 modèles pathologiques a lieu une atteinte et/ou un remaniement vasculaire. Le choix de protéines candidates à la fonction potentielle de biomarqueur plasmatique se porte donc naturellement vers des facteurs modulant l'angiogenèse et/ou des marqueurs de l'endothélium vasculaire, ayant de plus un rôle potentiel ou déjà défini dans la pathogenèse de la maladie concernée. De plus, le fait que les protéines candidates soient accessibles dans le milieu plasmatique reflète également leur capacité potentielle à moduler la mobilisation de cellules vasculogéniques, principalement à partir de la moelle osseuse.

Dans la FPI, nous avons donc choisi d'étudier si le TGF- $\beta$ 1 pouvait se présenter comme un potentiel biomarqueur plasmatique, ainsi que ses effets sur les propriétés biologiques des ECFC.

Dans l'AOMI, nous avons évalué dans le même cadre le VEGF, le PlGF et la TSP-1. Ce panel de protéines représente une balance angiogène qui pourrait basculer du côté pro-angiogène à l'initiation de la maladie (avec une participation du contexte inflammatoire), vers le côté anti-angiogène lorsque la maladie devient chronique.

Chez les patients atteints de pathologies coronaires ou subissant une chirurgie cardiaque, nous avons évalué le VEGF et le PlGF.

### *Méthodologie générale pour les expérimentations*

Dans chaque cohorte de patients, nous avons donc dans un premier temps mesuré les concentrations plasmatiques des protéines candidates définies.

Après avoir démontré que les taux plasmatiques de TGF- $\beta$ 1, de TSP-1 et de PlGF étaient significativement augmentés par rapport aux populations contrôles, respectivement dans la FPI, l'AOMI, et les SCA / la chirurgie cardiaque, nous avons étudié les effets de ces protéines sur des modèles précliniques de vascularisation (implants de Matrigel®) et/ou de revascularisation post-ischémique (modèle murin d'ischémie du membre inférieur). Le modèle de vascularisation du Matrigel®-plug acellulaire permet de déterminer si le biomarqueur testé présente un effet sur le modelage/remodelage vasculaire dans cette matrice. Le modèle d'ischémie du membre inférieur permet de déterminer le type d'influence du biomarqueur testé (ou de la voie de signalisation impliquée) sur le remodelage vasculaire réactionnel en situation post-ischémique.

Nous avons également évalué *in vitro* si ces protéines modulaient les propriétés angiogènes des ECFC, cellules supposées être impliquées dans ces phénomènes de remodelage vasculaire. Pour cette partie *in vitro*, nous avons vérifié que les ECFC expriment au moins un des récepteurs des protéines concernées, aussi bien au niveau des ARNm qu'au niveau protéique ; une fois cette étape validée, nous avons testé les effets directs des protéines candidates sur la prolifération/viabilité, la migration et la tubulogénèse des ECFC, puis nous avons évalué ces effets de façon indirecte en inhibant par ARN interférence, et/ou par un anticorps monoclonal bloquant, et/ou par un composé chimique inhibiteur, le/les récepteur(s) de la protéine candidate ou un récepteur d'une voie de signalisation impliquée dans l'effet direct observé de la protéine candidate. En ce qui concerne la TSP-1, nous avons de plus testé les propriétés angiogènes des ECFC en inhibant par ARN interférence l'expression de la TSP-1, aussi bien *in vitro* que dans le modèle d'ischémie du membre inférieur chez la souris Nude.



# TRAVAUX DE RECHERCHE



Liste des publications:

**Publication 1**

« The profibrotic cytokine Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 increases endothelial progenitor cell angiogenic properties »

Solène M. EVRARD, Clément d'AUDIGIER, Laetitia MAUGE, Dominique ISRAËL-BIET, Coralie L. GUERIN, Ivan BIECHE, Jason C. KOVACIC, Anne-Marie FISCHER, Pascale GAUSSEM, David M. SMADJA. *J Thromb Haemos.* 2012 Apr;10(4):670-679

Impact factor: 6.081

**Publication 2**

« Thrombospondin-1 is a plasmatic marker of peripheral arterial disease that modulates endothelial progenitor cell angiogenic properties »

David M. SMADJA, Clément d'AUDIGIER, Ivan BIÈCHE, Solène EVRARD, Laetitia MAUGE, Juliana-Vieira DIAS, Julien LABREUCHE, Ingrid LAURENDEAU, Bérengère MARSAC, Blandine DIZIER, Oriane WAGNER-BALLON, Catherine BOISSON-VIDAL, Verônica MORANDI, Jean-Paul DUONG-VAN-HUYEN, Patrick BRUNEVAL, Françoise DIGNAT-GEORGE, Joseph EMMERICH, Pascale GAUSSEM. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Mar;31(3):551-9

Impact factor: 6.368

**Publication 3**

« Targeting VEGFR1 on endothelial progenitors modulates their differentiation potential »

Clément d'AUDIGIER, Benoit GAUTIER, Alexis YON, Jean-Meidi ALILI, Solène EVRARD, Anne GODIER, Skerdi HAVIARI, Blandine DIZIER, Nicolas INGUIMBERT, Delphine BORGEL, Ivan BIÈCHE, Catherine BOISSON-VIDAL, Carmen RONCAL, Peter CARMELIET, Michel VIDAL, Pascale GAUSSEM, David M. SMADJA. *Manuscrit en révision dans la revue « Angiogenesis ».*

Impact factor: 3.972



## Publication 1 : La cytokine profibrotique « transforming growth factor- $\beta$ 1 » augmente les propriétés angiogènes des progéniteurs endothéliaux

Solène Evrard<sup>1,2,3\*</sup>, Clément d’Audigier<sup>1,2,3\*</sup>, Laetitia Mauge<sup>1,2,3</sup>, Dominique Israël-Biet<sup>1,4</sup>, Coralie L. Guerin<sup>1,2,5</sup>, Ivan Bieche<sup>1,6,7</sup>, Jason C. Kovacic<sup>8</sup>, Anne-Marie Fischer<sup>1,2,3</sup>, Pascale Gaussem<sup>1,2,3</sup>, and David M. Smadja<sup>1,2,3,9</sup>

<sup>1</sup> Université Paris Descartes, Paris, France

<sup>2</sup> INSERM UMRS 765, Paris, France

<sup>3</sup> AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service d’Hématologie Biologique, Paris, France

<sup>4</sup> AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Pneumologie, Paris, France

<sup>5</sup> INSERM UMRS 970, Paris Cardiovascular Research Center – PARCC

<sup>6</sup> INSERM UMRS 745, Paris, France

<sup>7</sup> Laboratoire d’Oncogénétique, Centre René Huguenin, Saint Cloud, France

<sup>8</sup> The Zena and Michael A Wiener Cardiovascular Institute, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY

<sup>9</sup> Vascular Biology Program and Surgery department, Children’s Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA

**\* Ces 2 auteurs ont contribué à parts égales à ce travail**

### Résumé

La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une forme spécifique de pneumonie interstitielle avec une fibrose progressive et chronique, de cause indéterminée, touchant préférentiellement les patients âgés, dans laquelle on observe un remodelage vasculaire aberrant constant. En l’absence de transplantation pulmonaire, le pronostic est très péjoratif puisque la FPI évolue vers une réduction progressive de la fonction pulmonaire jusqu’au décès dans les 2 ans qui suivent le diagnostic.

Le *transforming growth factor -  $\beta$ 1* (TGF- $\beta$ 1) est une des protéines de la superfamille TGF- $\beta$ , qui régulent la prolifération cellulaire, l’apoptose et la différenciation. Le rôle du TGF- $\beta$ 1 est controversé dans la littérature car il est décrit aussi bien pro-apoptotique, anti-apoptotique, que pro-angiogène selon le type cellulaire et le contexte physiopathologique<sup>818-820</sup>. Le TGF- $\beta$ 1 est une cytokine profibrotique qui joue donc un rôle majeur en biologie vasculaire, et notamment dans la pathogenèse de la FPI. En effet le TGF- $\beta$ 1 induit la prolifération fibroblastique, ainsi que l’accumulation et la dégradation de la matrice extracellulaire. Le remodelage vasculaire résultant peut alors aboutir à une résistance vasculaire pulmonaire puis à une hypertension pulmonaire irréversible, marqueur de mauvais pronostic dans la FPI. Les progéniteurs endothéliaux pouvant être impliqués dans ce processus de remodelage, vasculaire, nous avons donc étudié l’effet du TGF- $\beta$ 1 sur leurs propriétés angiogènes, et plus particulièrement sur celles des ECFC, type de progéniteurs ayant la capacité de former des néovaisseaux *in vivo*<sup>38, 41</sup>.

Nous avons d'abord déterminé les taux plasmatiques du TGF- $\beta$ 1 total ainsi que les concentrations plasmatiques de la fraction active du TGF- $\beta$ 1, dans une cohorte de 64 patients atteints de FPI, comparés à 13 individus sains d'âges comparables.

Notre hypothèse étant que le TGF- $\beta$ 1 pourrait moduler les propriétés biologiques des ECFC, notamment leur capacité à former des néovaisseaux *in vivo*, nous avons ensuite étudié l'effet du TGF- $\beta$ 1 *in vivo* via le modèle acellulaire d'implants de Matrigel<sup>®</sup>, en supposant que les néovaisseaux potentiellement formés dans les implants incluent au moins en partie des ECFC murins.

Les effets du TGF- $\beta$ 1 à 3 doses différentes (1, 2 et 5 ng/mL) ont ensuite été testés *in vitro* sur la viabilité ainsi que les capacités migratoire et tubulogénique des ECFC. Dans des conditions de stimulation à 5 ng/mL en comparaison à des ECFC non stimulés, nous avons évalué l'expression des ARN messagers du VEGF et du SDF-1 ainsi que de leurs récepteurs afin de déterminer si les effets éventuels du TGF- $\beta$ 1 impliquaient ces voies de signalisation pro-angiogènes. Nous avons également contrôlé au niveau transcriptomique que les ECFC, issus aussi bien de sang de cordon que de sang périphérique adulte, exprimaient les récepteurs ALK-1, ALK-5 et TGF- $\beta$ RII au TGF- $\beta$ 1. Cela afin de tester les propriétés angiogènes *in vitro* après stimulation par le TGF- $\beta$ 1, des ECFC dont les récepteurs au TGF- $\beta$ 1 auront été inhibés par ARN interférence, et de déterminer quels récepteurs seraient impliqués dans les effets éventuels du TGF- $\beta$ 1.

Le taux plasmatique de TGF- $\beta$ 1 total est significativement augmenté chez les patients atteints de FPI par rapport à la population contrôle, tandis que la forme active n'est détectée dans aucune des 2 populations.

La présence de TGF- $\beta$ 1 dans les implants de Matrigel<sup>®</sup> augmente leur vascularisation, comme l'attestent les concentrations d'hémoglobine 2 fois plus élevées dans les implants contenant le TGF- $\beta$ 1 que dans les implants avec PBS ou bFGF seul. Par ailleurs, des sections de ces implants de Matrigel<sup>®</sup> inclus en paraffine ont été colorées en hématoxyline et éosine, afin de quantifier le nombre de néovaisseaux fonctionnels : les implants contenant le TGF- $\beta$ 1 présentent significativement plus de vaisseaux que les implants avec PBS ou bFGF seul, sans effet dose significatif, corroborant ainsi les résultats du dosage d'hémoglobine.

*In vitro*, le TGF- $\beta$ 1 améliore la viabilité (évaluée par le test au pNPP) et la migration (évaluée par le « *wound healing assay* » et en chambre de Boyden) des ECFC, mais n'a pas d'effet sur leur différenciation en pseudotubes dans le Matrigel<sup>®</sup>. Ces effets ne passent pas par les voies de signalisation du VEGF ou du SDF-1 (pas d'augmentation de l'expression des ARN messagers du VEGF, du SDF-1 ou de leurs récepteurs après stimulation des ECFC par le TGF- $\beta$ 1), mais via les récepteurs ALK-1, ALK-5 et TGF- $\beta$ RII, comme le démontre l'annulation de l'augmentation de la viabilité et de la capacité migratoire des ECFC après inhibition par ARN interférence de ces 3 récepteurs.

Ces résultats suggèrent que le TGF- $\beta$ 1 pourrait avoir un rôle dans l'angiogenèse excessive et/ou le remodelage vasculaire pathologique via le recrutement et l'expansion des ECFC. Le TGF- $\beta$ 1 pourrait donc être un biomarqueur potentiel dans la FPI.

### **Discussion et perspectives**

Comme passées en revue dans le paragraphe 2.3. de cette thèse, de nombreuses protéines (ainsi que certains types cellulaires) ont été évaluées en clinique en tant que biomarqueur

potentiel dans la FPI. Parmi les différentes isoformes du TGF- $\beta$ , le TGF- $\beta$ 1 est la forme la plus largement impliquée dans les pathologies fibrotiques, dont la FPI. Les taux de TGF- $\beta$  ont été évalués dans les BALF mais s'avèrent très variables selon les études. Concernant les taux plasmatiques de TGF- $\beta$ 1, ils ont également été mesurés dans des cohortes (de faible taille) de patients atteints de FPI mais comparés à des populations contrôles non appariées pour l'âge. A notre connaissance, l'article présenté dans cette thèse constitue la première étude comparant les taux plasmatiques de TGF- $\beta$ 1 de patients FPI à ceux d'une population contrôle d'âges comparables. Cela constitue un point notable vu les variations des taux d'endogline (CD105, récepteur de type III au TGF- $\beta$ 1) avec les pathologies vasculaires liées à l'âge. A noter également que la forme active du TGF- $\beta$ 1 n'a pas été retrouvée chez ces patients FPI, probablement à cause de taux inférieurs à la limite de détection de notre méthode ELISA. Les mécanismes d'activation physiologique du TGF- $\beta$ 1 impliquent des interactions avec les intégrines, les forces de cisaillement et/ou la TSP-1 ; ces mécanismes pourraient avoir lieu principalement dans les tissus. De façon intéressante, nous avons retrouvé des taux plasmatiques significativement augmentés de TSP-1 chez ces mêmes patients FPI comparativement à la population contrôle (résultats préliminaires). Au vu des effets de la TSP-1 sur les ECFC que nous avons décrits dans le cadre de l'étude chez les patients artéritiques, nous pourrions supposer que la TSP-1 est produite au niveau des sites de lésions fibrotiques et permet le recrutement des ECFC (augmentation de l'adhésion de ECFC), mais que parallèlement l'augmentation des taux plasmatiques de TSP-1 serait une conséquence de la vascularisation excessive et anormale dans la FPI, afin de limiter cette néoangiogenèse pathologique.

La littérature révèle un rôle contrasté du TGF- $\beta$ 1. En effet, selon le type cellulaire, il pourrait avoir un effet pro-apoptotique (CE aortiques, HUVEC) ou anti-apoptotique (CMLV)<sup>818</sup> ; le TGF- $\beta$ 1 pourrait également promouvoir l'angiogenèse via l'augmentation de l'expression du VEGF dans des lignées de cellules de carcinome cholangiocellulaire<sup>819</sup> et dans des CE aortiques<sup>820</sup>. Nous avons montré que le TGF- $\beta$ 1 augmentait la vascularisation des implants de Matrigel® et que cet effet pouvait impliquer les ECFC puisque nous avons également montré que le TGF- $\beta$ 1 améliorait *in vitro* leur viabilité et leur capacité migratoire. Par ailleurs, dans nos conditions expérimentales, le TGF- $\beta$ 1 ne stimule pas l'expression du VEGF, du SDF-1 ou de leurs récepteurs dans les ECFC. Ces voies de signalisation pro-angiogènes démontrées dans les ECFC ne sont donc pas celles sollicitées lors de l'action pro-angiogène du TGF- $\beta$ 1. Ces données sont en accord avec d'autres études montrant que les ECFC ne secrètent pas de VEGF<sup>49</sup>, et qu'ils participeraient donc à la vasculogenèse post-natale en fournissant un nombre suffisant de CE plutôt que par des effets paracrines<sup>49</sup>. Nous avons donc exploré si les voies engageant les 3 principaux récepteurs au TGF- $\beta$  pouvaient être impliquées dans les effets observés du TGF- $\beta$ 1. A cette fin, l'expression des ARN messagers des récepteurs ALK-1, ALK-5 (récepteurs de type I) et TGF- $\beta$  RII a été évaluée par PCR quantitative en temps réel dans les ECFC issus de sang de cordons et de sang périphérique adulte, dans les HUVEC, les HPAEC (« *Human Pulmonary Artery Endothelial Cells* »), et les cellules souches mésenchymateuses (MSC, « *Mesenchymal Stem Cells* »), ces types cellulaires exprimant les ARNm de ces 3 récepteurs. Les CFU-EC, les monocytes, les CML ainsi que les cellules de sang total expriment quant à eux les ARNm d'ALK-5 et du TGF- $\beta$  RII, mais pas ceux d'ALK-1. Nous avons ensuite réévalué l'effet du TGF- $\beta$ 1 à 5 ng/mL (concentration la plus efficace dans nos conditions) sur la viabilité et la migration des ECFC en inhibant l'expression d'ALK-1, d'ALK-5 et du TGF- $\beta$  RII par des siRNA spécifiques effectifs pendant au moins 4 jours suivant la transfection. Lorsque l'expression de l'un de ces 3 récepteurs est

inhibée dans les ECFC, le TGF- $\beta$ 1 n'est plus capable d'améliorer leur viabilité et leur capacité migratoire, démontrant ainsi que ces 3 principaux récepteurs au TGF- $\beta$  sont impliqués dans l'effet pro-angiogène du TGF- $\beta$ 1 sur les ECFC.

Le TGF- $\beta$ 1 induit ses effets cellulaires en se liant au TGF- $\beta$  RII, provoquant ainsi le recrutement de l'un de ses 2 récepteurs de type I, ALK-1 ou ALK-5, pour former un complexe hétéromérique actif<sup>537</sup>. Le TGF- $\beta$  RII est essentiel pour la formation d'un complexe de récepteurs effectif, ce qui explique que l'inhibition de son expression annule les effets pro-angiogènes du TGF- $\beta$ 1 sur les ECFC. ALK-1 et ALK-5 quant à eux induisent des effets hétérogènes sur de nombreux types de CE *in vitro*, indiquant que leurs effets sont probablement contexte-dépendants voire dépendants du type cellulaire<sup>820-822</sup>. En effet, les Smads sollicités en aval d'ALK-5 (Smad2/3) induiraient les effets inhibiteurs du TGF- $\beta$ 1 sur la prolifération et la migration des CE, alors que les Smads sollicités en aval d'ALK-1 (Smad1/5) stimuleraient la prolifération et la migration des CE<sup>821</sup>. Cependant, concernant les ECFC nous avons montré que l'inhibition isolée de l'un de ces 3 récepteurs ALK-1, ALK-5 ou TGF- $\beta$  RII produisait les mêmes effets. Nous pourrions donc supposer que dans les ECFC, les effets du TGF- $\beta$ 1 sont médiés par un complexe de récepteur hétérotrimérique, composé des 2 récepteurs de type I ALK-1 et ALK-5 et du récepteur de type II TGF- $\beta$  RII. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par une expérience de co-immunoprécipitation utilisant un anticorps spécifique anti-ALK-1 ou anti-ALK-5. Il serait également intéressant d'étudier les voies de signalisation Smad et/ou « non Smad » (comme Erk, JNK ou p38 MAPK) pour déterminer quel mécanisme engagé dans les ECFC déclenche les effets du TGF- $\beta$ 1. Notre équipe a également décrit que le BMP2 et le BMP4, 2 autres membres de la superfamille du TGF- $\beta$ , augmentent la prolifération, la migration et la tubulogenèse des ECFC *in vitro*, ainsi que leur potentiel de revascularisation post-ischémique dans le modèle murin d'ischémie du membre inférieur<sup>41</sup>. Il serait là aussi intéressant d'analyser les voies de signalisation déclenchées par BMP2/4 dans les ECFC et de les comparer avec celles empruntées par le TGF- $\beta$ 1. D'une manière générale, BMP2/4 se lient à leurs récepteurs de type I ALK-3 ou ALK-6 et BMPRII, et activent la voie des Smads 1/5/8, cette dernière pouvant également être activée par le TGF- $\beta$ 1 via ALK-1. Etant donné que seuls les BMP2/4 stimulent la tubulogenèse des ECFC comparativement au TGF- $\beta$ 1, la comparaison des voies de signalisation déclenchées par le TGF- $\beta$ 1 d'une part, et les BMP2/4 d'autre part, permettrait de déterminer au moins en partie les mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation des ECFC en pseudotubes.

L'endogline est un récepteur de type III au TGF- $\beta$  qui n'est pas directement impliqué dans la signalisation, mais qui module celle des autres membres de la famille du TGF- $\beta$ . L'endogline n'est pas capable d'activer la voie des Smads, principale voie impliquée dans les effets du TGF- $\beta$ 1 sur les CE. Pour cette raison nous n'avons pas évalué le rôle de ce corécepteur par rapport aux effets du TGF- $\beta$ 1 sur les ECFC.

Récemment, il a été décrit que les ECFC pouvaient subir une transition endothéliale-mésenchymateuse après une stimulation par le TGF- $\beta$ 1 sur 21 jours<sup>823</sup>, ou même après 48 heures de stimulation en milieu dépourvu de sérum<sup>824</sup>. Dans nos conditions de culture où les ECFC sont stimulés par le TGF- $\beta$ 1 pendant 48 heures en présence de 1 ou 5% de sérum, nous n'avons pas observé de changement de morphologie pouvant indiquer un éventuel engagement dans une telle transition. Par ailleurs, l'expression des ARNm des marqueurs endothéliaux (non spécifiques) MCAM et CDH5 n'a pas varié après 24 heures de stimulation en l'absence de sérum. Dans nos expériences *in vitro* il paraît donc peu probable que les effets pro-angiogènes du TGF- $\beta$ 1 soient dus à une transformation des ECFC en cellules mésenchymateuses. Cependant dans notre modèle *in vivo* du Matrigel®-plug acellulaire

contenant du TGF- $\beta$ 1 nous ne pouvons pas exclure l'éventualité d'un tel mécanisme puisque les implants de Matrigel® sont analysés 14 jours après injection et que ce délai pourrait être suffisant pour permettre une transition mésenchymateuse des CE et/ou des ECFC murins recrutés pour la vascularisation de l'implant. L'absence de marqueur spécifique pour les ECFC humaines et l'absence de données concernant le phénotype des ECFC murines ne nous permettent pas d'éclaircir le rôle de la transition endothéliale-mésenchymateuse dans l'augmentation des propriétés angiogènes des ECFC par le TGF- $\beta$ 1, à l'aide de ce modèle de Matrigel®-plug acellulaire simple, ni même avec une variante de ce modèle consistant à injecter des implants de Matrigel® contenant des ECFC humaines avec ou sans TGF-1 dans des souris Nude.

**Article publié :**



## ORIGINAL ARTICLE

# The profibrotic cytokine transforming growth factor- $\beta$ 1 increases endothelial progenitor cell angiogenic properties

S. M. EVRARD,\*†‡<sup>1</sup> C. D'AUDIGIER,\*†‡<sup>1</sup> L. MAUGE,\*†‡ D. ISRAËL-BIET,\*§ C. L. GUERIN,\*†¶ I. BIECHE,\* \*\*†† J. C. KOVACIC,‡‡ A.-M. FISCHER,\*†‡ P. GAUSSEM\*†‡ and D. M. SMADJA\*†‡§§  
 \*Université Paris Descartes, Paris; †INSERM UMRS 765, Paris; ‡AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service d'Hématologie Biologique, Paris; §AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Pneumologie, Paris; ¶INSERM UMRS 970, Paris Cardiovascular Research Center – PARCC, Paris; \*\*INSERM UMRS 745, Paris; ††Laboratoire d'Oncogénétique, Centre René Huguenin, Saint Cloud, France; ‡‡The Zena and Michael A Wiener Cardiovascular Institute, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY; and §§Vascular Biology Program and Surgery department, Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

**To cite this article:** Evrard SM, d'Audigier C, Mauge L, Israël-Biet D, Guerin CL, Bieche I, Kovacic JC, Fischer A-M, Gaussem P, Smadja DM. The profibrotic cytokine transforming growth factor- $\beta$ 1 increases endothelial progenitor cell angiogenic properties. *J Thromb Haemost* 2012; **10**: 670–9.

**Summary.** *Background:* Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) is a profibrotic cytokine that plays a major role in vascular biology, and is known to regulate the phenotype and activity of various vascular cell populations. Because most fibrotic diseases, such as idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), are associated with vascular remodeling, and as endothelial progenitor cells (EPCs) may be involved in this process, we investigated the impact of TGF- $\beta$ 1 modulation of EPC angiogenic properties. *Methods:* TGF- $\beta$ 1 plasma levels were determined in 64 patients with IPF and compared with those in controls. The effect of TGF- $\beta$ 1 on angiogenesis was studied *in vivo* in a Matrigel plug model and *in vitro* on endothelial colony-forming cells (ECFCs). We studied the effects of inhibiting the expression of the three main receptors of TGF- $\beta$ 1 in ECFCs by using short interfering RNA. *Results:* Total TGF- $\beta$ 1 plasma levels were significantly increased in patients with IPF as compared with controls ( $P < 0.0001$ ). TGF- $\beta$ 1 had proangiogenic effects *in vivo* by increasing hemoglobin content and blood vessel formation in Matrigel plugs implanted in C57/Bl6 mice, and *in vitro* by enhancing ECFC viability and migration. The effects were abolished by silencing the three main TGF- $\beta$ 1 receptors. *Conclusions:* TGF- $\beta$ 1 is proangiogenic *in vivo* and induces ECFC angiogenic properties *in vitro*, suggesting that TGF- $\beta$ 1 may play a role during vascular remodeling in fibrotic disease states via EPCs.

**Keywords:** endothelial colony-forming cells, endothelial progenitor cells, idiopathic pulmonary fibrosis, TGF- $\beta$ 1.

## Introduction

The transforming growth factor (TGF)- $\beta$  superfamily consists of TGF- $\beta$ s, activins, and bone morphogenic proteins (BMPs) [1]. These proteins all bind to their transmembrane receptors, and these activate Smad proteins, which are known to regulate cell proliferation, apoptosis, and differentiation [1]. TGF- $\beta$ 1 is a pleiotropic cytokine that has a major role in the development of fibrosis in various organs, including the kidneys, liver, lungs, and skin [2]. TGF- $\beta$ 1 is synthesized as a biologically inactive molecule that undergoes activation by cleavage of its latency-associated peptide in order to exert its biological effects [3]. Whereas BMPs, and in particular BMP4, stimulate angiogenesis and endothelial differentiation [4], TGF- $\beta$ 1 may either stimulate or inhibit angiogenesis in a context-dependent manner [5–8].

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a fibroproliferative disorder of unknown etiology characterized by fibroblast proliferation, extracellular matrix deposition, and a progressive loss of normal lung architecture. In the absence of lung transplantation, IPF typically leads to a progressive reduction in lung function and death within 3–5 years of diagnosis. TGF- $\beta$ 1 is strongly implicated in the pathogenesis of this disease by promoting fibroblastic proliferation, matrix accumulation, and matrix degradation [9]. In addition, the pathogenesis of IPF is characterized by a highly heterogeneous vascular remodeling process, with areas of marked vascular reduction contrasting with adjacent non-fibrotic and highly vascularized lung tissue [10]. This may culminate in increased pulmonary vascular resistance and irreversible pulmonary hypertension, now recognized as one of the most ominous prognostic markers in IPF.

Different cell populations that play a role in angiogenesis have been isolated, but in humans only one population, called

Correspondence: David Smadja, Hematology Department, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France.  
 Tel.: +33 1 56 09 39 33; fax: +33 1 56 09 33 93.  
 E-mails: david.smadja@egp.aphp.fr or david.smadja@childrens.harvard.edu

<sup>1</sup>These two authors contributed equally to this work.

Received 7 June 2011, accepted 15 January 2012

'endothelial colony-forming cells' (ECFCs), have been shown to possess all of the characteristics of true endothelial progenitors and to form neovessels *in vivo*. ECFCs develop after 2–3 weeks in culture, and are candidate cells that may be of importance during the vascular remodeling process.

Because of the strong involvement of TGF- $\beta$ 1 in IPF and also its potential angiogenic properties, we hypothesized that TGF- $\beta$ 1 may activate the functional activity of ECFCs *in vitro* and induce new blood vessel formation in a mouse model of extracellular matrix revascularization *in vivo*.

## Patients and methods

### Study population

Blood samples (citrate plasma obtained by centrifugation at  $2300 \times g$  for 10 min and immediately stored at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis) were collected in three pulmonology departments from university hospitals of the Ile de France area (Avicenne, Georges Pompidou and Bichat Hospitals). The control group consisted of 13 males aged 60–70 years without any prior cardiovascular, pulmonary or cancer history, and who were not receiving any medications. Sixty-four consecutive patients with IPF were enrolled from March 2008 to May 2010. The IPF population consisted of 45 males and 19 females with a median age of 71 years (range: 31–87 years). The patient and control groups were matched by age although controls were exclusively males. IPF patients belonged to a prospective, multicenter French cohort of incident cases of IPF with a diagnosis based on either surgical biopsy or a characteristic usual interstitial pneumonia computed tomography scan pattern according to the American Thoracic Society/European Respiratory Society consensus criteria [11]. The first imaging allowing the diagnosis of IPF was required to date back to a maximum of 9 months prior to inclusion. All demographic, comorbidity, clinical and functional data were prospectively and serially recorded. The study was approved by the institutional ethics committee of Ile de France II (registry number 2006-108), and all patients and controls provided signed informed consent (ClinicalTrials.gov NCT01038700).

### ELISAs

Plasma levels of TGF- $\beta$ 1 were measured with ELISA kits from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Samples were assayed before (to detect only the active forms) and after (to detect the active and latent forms) acidification, according to the manufacturer's instructions.

### *In vivo* Matrigel plug assay

Matrigel plugs (0.5 mL) were prepared on ice by mixing Matrigel (BD Matrigel Matrix, BD Biosciences, Le Pont de Clais, France) with phosphate-buffered saline (PBS) or recombinant basic fibroblast growth factor (bFGF) ( $750 \text{ ng mL}^{-1}$ ; Peprotech, Rocky EC, NJ, USA) in the

presence or absence of TGF- $\beta$ 1 (R&D systems). After 14 days, the Matrigel plugs were dissected, lysed, and disrupted for hemoglobin concentration measurement with Drabkin's reagent (Sigma, St Louis, MO, USA). For the histologic analysis, intact Matrigel plugs were carefully exposed, fixed, and embedded in paraffin. Blood vessel infiltration in Matrigel plugs was quantified by hematoxylin and eosin staining. Three different sections of each plug were analyzed.

### ECFC culture

Cord blood ECFCs obtained from consenting mothers with normal-birthweight children were cultured in 5% fetal bovine serum (FBS)-EGM2 (Lonza, Levallois-Perret, France), as previously described [4,12]. When an ECFC colony became microscopically visible, the cells were trypsinized and replated in six-well plates, and then in T75 flasks when confluent. Cells were characterized by flow cytometry by using a FACScalibur, as previously described [12,13].

### Cell viability assay

The effect of TGF- $\beta$ 1 on ECFC viability was examined by measuring cell phosphatase activity based on the release of paranitrophenol (Sigma, St Louis, MO, USA) measured at  $\text{OD}_{405 \text{ nm}}$  (Fluostar optima; BMG Labtech, Champigny-sur-Marne, France) after 48 h of incubation. ECFCs were activated in 5% FBS-EBM2 medium containing recombinant TGF- $\beta$ 1 (1, 2 or  $5 \text{ ng mL}^{-1}$ ).

### Wound healing assay

ECFCs were seeded on 0.2% gelatin-coated 12-well plastic culture dishes. A 'round' scratch was formed on confluent ECFCs with a micropipette tip, and the medium was replaced by EBM2 with or without TGF- $\beta$ 1. Cell migration over this wound scratch was monitored by photographing at 0, 4, 8, 18 and 24 h. Wound area was measured with VIDEOMET software version 5.4.0 (Microvision, Evry, France). Cell migration was expressed as a percentage relative to the initial wound area.

### Migration assays

Boyden Chambers (Costar, Avon, France) with  $8\text{-}\mu\text{m}$ -pore filters were used for migration assays. The lower compartment of the chamber was filled with EBM2 supplemented with  $5 \text{ ng mL}^{-1}$  recombinant TGF- $\beta$ 1 or  $50 \text{ ng mL}^{-1}$  recombinant vascular endothelial growth factor (VEGF) (R&D Systems). ECFCs were harvested, resuspended in EBM2, and placed in the upper compartment. After incubation at  $37^\circ\text{C}$  for 5 h, cells adhering to the lower surface were fixed, stained with Giemsa, and counted.

### *In vitro* Matrigel tube formation assay

After 16 h of serum and growth factor privation, ECFCs were treated with 1, 2 or  $5 \text{ ng mL}^{-1}$  TGF- $\beta$ 1. After 48 h,

ECFCs ( $3 \times 10^4$  cells per well) were seeded on growth factor-reduced Matrigel (200  $\mu$ L) (BD Biosciences, Le Pont de Clais, France) and cultured for 18 h at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. Capillary-like structures were identified with phase-contrast microscopy, and networks formed by ECFCs were quantified with VIDEOMET software version 5.4.0.

#### Real-time quantitative PCR (qPCR)

PCR was carried out in an ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), with TaqMan Gene Expression Master Mix containing the specific primers and the specific probe (Applied Biosystems), or with SybrGreen Mix with the specific primers. Expression levels of all genes were expressed relative to the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene or to *TBP*, which encodes the TATA box-binding protein.

#### Cells used for In vitro studies

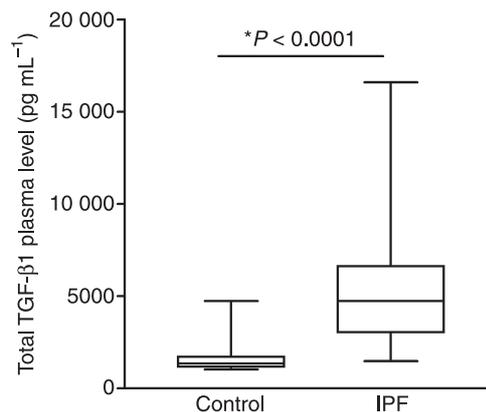
Control human arterial smooth muscle cells (SMCs) were kindly provided by S. Susen (Department of Hematology, Centre Hospitalier Universitaire, Lille, France) [14]. Control human pulmonary artery endothelial cells (HPAECs) were provided by Cambrex (CC-2530). Control human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), control human colony-forming unit endothelial cells (CFU-ECs) and mesenchymal stem cells (MSCs) were cultivated and isolated as previously described [12,15]. Control monocytes and whole blood mRNA were isolated from healthy male volunteers aged 18–35 years, as previously described [16].

#### ECFC transfection with TGF- $\beta$ receptor short interfering RNA (siRNA)

We used three different siRNAs to silence the gene expression of TGF- $\beta$  receptor type II (TGF- $\beta$  RII) (sc-36657; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), ALK-1, and ALK-5 (LQ-005302 and LQ-003929; Dharmacon RNAi technologies, Thermo Fisher Scientific, Lafayette, CO, USA). Each siRNA was mixed with the Primefect reagent (Lonza, Levallois-Perret, France) at 1  $\mu$ M to obtain transfection complexes, which were added to  $2 \times 10^5$  ECFCs in complete EGM2 medium in six-well plates. Control siRNA (Allstars negative control siRNA; Qiagen, Cambridge, MA, USA) was used in parallel.

#### Statistical analysis

Data are shown as mean  $\pm$  standard error of the mean. Comparisons between plasma levels of TGF- $\beta$ 1 were analyzed with the non-parametric Mann–Whitney *U*-test. Results for *in vitro* experiments were analyzed by ANOVA followed by Fisher's protected least-significant-difference test. All statistical tests were performed with the STAT VIEW software package (SAS, Cary, NC, USA). Differences with *P*-values of  $< 0.05$  were considered to be significant.

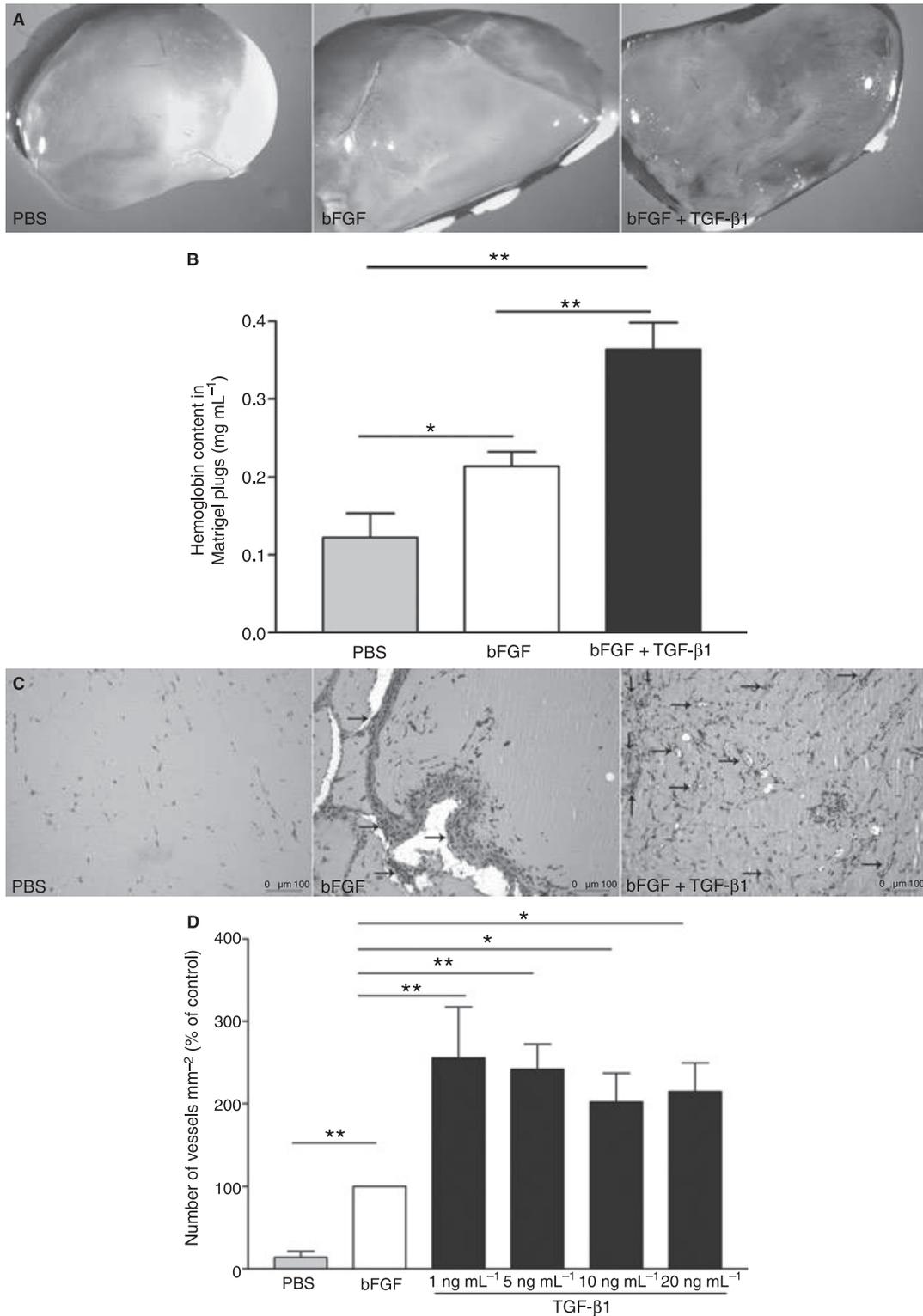


**Fig. 1.** Plasma levels of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) were increased in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) ( $P < 0.0001$  vs. controls).

## Results

### TGF- $\beta$ 1 is increased in patients with IPF and induces Matrigel plug angiogenesis

We evaluated plasma concentrations of active and total TGF- $\beta$ 1 in patients with IPF and in controls. Total TGF- $\beta$ 1 levels were significantly higher in patients with IPF than in controls ( $5288 \pm 419$  and  $1656 \pm 269$  pg mL<sup>-1</sup>, respectively,  $P < 0.0001$ ) (Fig. 1). No active form was detected in plasma from controls or patients with IPF. No correlation was found between TGF- $\beta$ 1 levels and any of the relevant functional respiratory parameters (total lung capacity, forced vital capacity, diffusing capacity of the lung for carbon monoxide, or arterial oxygen tension). We hypothesized that TGF- $\beta$ 1 may be implicated in the abnormal and heterogeneous vascular remodeling that occurs in IPF. To distinguish between the proangiogenic and antiangiogenic effects of TGF- $\beta$ 1, we used the well-described Matrigel plug assay model. Plugs with PBS or bFGF in the absence or presence of TGF- $\beta$ 1 were implanted subcutaneously in C57/Bl6 mice. The plugs were recovered after 14 days, and their blood vessel content was analyzed. Figure 2A shows that the presence of 20 ng mL<sup>-1</sup> TGF- $\beta$ 1 was associated with increased blood vessel formation. This effect was further quantified by measuring the hemoglobin content of the plugs, which was much higher in the presence of TGF- $\beta$ 1 than the hemoglobin content of plugs with PBS or bFGF ( $P = 0.0001$  and  $P = 0.0028$ , respectively) (Fig. 2B). To confirm that TGF- $\beta$ 1 induces the formation of blood vessels, we quantified blood vessel ingrowth into the Matrigel plugs (Fig. 2C,D). As shown in Fig. 2D, Matrigel plugs with increasing TGF- $\beta$ 1 concentrations (1, 5, 10 and 20 ng mL<sup>-1</sup>) contained significantly more blood vessels than the Matrigel plugs with PBS or bFGF alone (median: 18.6, 16.04, 13.5 or 12.7 vessels mm<sup>-2</sup> and 0 or 6.8 vessels mm<sup>-2</sup>, respectively). Even though the plugs with the lower doses of



**Fig. 2.** Transforming growth factor-β1 (TGF-β1) is proangiogenic in vivo. TGF-β1 increased Matrigel plug vascularization in C57/Bl6/J wild-type mice. (A) Matrigel plugs containing phosphate-buffered saline (PBS) (left panel), basic fibroblast growth factor (bFGF) (middle panel) or bFGF with TGF-β1 (20 ng mL<sup>-1</sup>) (right panel) were implanted in C57/Bl6/J wild-type mice. (B) Hemoglobin was quantified by the Drabkin method in each plug. Values are expressed as mean ± standard error of the mean; n = 5 per group (\*P < 0.05; \*\*P < 0.005). (C) Representative hematoxylin and eosin staining of section of Matrigel plugs with PBS (left panel), bFGF (middle panel), and bFGF with TGF-β1 (20 ng mL<sup>-1</sup>) (right panel). (D) Quantification of blood vessels in Matrigel plugs with PBS, bFGF alone, or bFGF with 1, 5, 10 or 20 ng mL<sup>-1</sup> TGF-β1. Values are expressed as percentage of blood vessel number per square millimeter as compared with the Matrigel plug with bFGF alone. Bars represent the mean ± standard deviation of three or four mice (\*P < 0.05; \*\*P < 0.01).

TGF- $\beta$ 1 appeared to contain more blood vessels, we did not observe any significant differences between the different doses of TGF- $\beta$ 1 tested. Given this TGF- $\beta$ 1 proangiogenic *in vivo* effect, we tested the effect of TGF- $\beta$ 1 on ECFCs.

#### TGF- $\beta$ 1 enhances ECFC viability and migration *in vitro*

ECFCs have the cobblestone appearance typical of the endothelial lineage, and express only endothelial markers, as previously described [12,13,15,17] (Fig. 3A). We studied the angiogenic effects of TGF- $\beta$ 1 on ECFCs. To study cell viability, ECFCs were treated with three different concentrations of recombinant TGF- $\beta$ 1 for 48 h. As shown in Fig. 3B, TGF- $\beta$ 1 enhanced ECFC viability in a dose-responsive manner ( $P = 0.091$ ,  $P = 0.019$  and  $P = 0.016$  for 1, 2 and 5 ng mL<sup>-1</sup> TGF- $\beta$ 1, respectively).

We then performed a wound healing assay to study the effect of TGF- $\beta$ 1 on ECFC migration. After the round scratch was carried out, 1, 2 or 5 ng mL<sup>-1</sup> TGF- $\beta$ 1 was added to the medium, and wound area, reflecting cell migration, was measured. We observed a significant increase in ECFC migration in the presence of 1, 2 or 5 ng mL<sup>-1</sup> TGF- $\beta$ 1 at 24 h as compared with control ( $P = 0.0006$ ,  $P = 0.0005$ , and  $P = 0.001$ , respectively) (Fig. 3C). This finding was confirmed with a Boyden Chamber assay. As compared with control, ECFCs in Boyden Chambers showed increased migration towards TGF- $\beta$ 1 over a 5-h period ( $P < 0.0001$ ), which was similar to the migration observed in response to VEGF (Fig. 3D). Finally, we examined the effects of TGF- $\beta$ 1 on ECFC tube formation with an *in vitro* Matrigel model. Treatment with three different concentrations of TGF- $\beta$ 1 did not modify the capacity of ECFCs to form branched structures and pseudotubes with enclosed areas as compared with control (EBM2 medium without any growth factors) (Fig. 4).

To determine whether TGF- $\beta$ 1 induced ECFC viability and migration by stimulating commonly implicated proangiogenic or promigratory pathways, we determined the mRNA expression of VEGF and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), as well as their receptors, in ECFCs after stimulation by TGF- $\beta$ 1. As shown in Table 1, TGF- $\beta$ 1 failed to stimulate gene expression of VEGF, SDF-1 or their receptors – FLT-1 (fms-like tyrosine kinase, or VEGFR-1), KDR (kinase-insert domain containing receptor, or VEGFR-2) and CXCR4 – in ECFCs. In addition, ECFC stimulation by TGF- $\beta$ 1 did not modify the mRNA expression of the endothelial markers CDH5 or MCAM. The mRNA expression of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), Id1, and COX2, used as positive controls, increased in ECFCs after TGF- $\beta$ 1 stimulation [18].

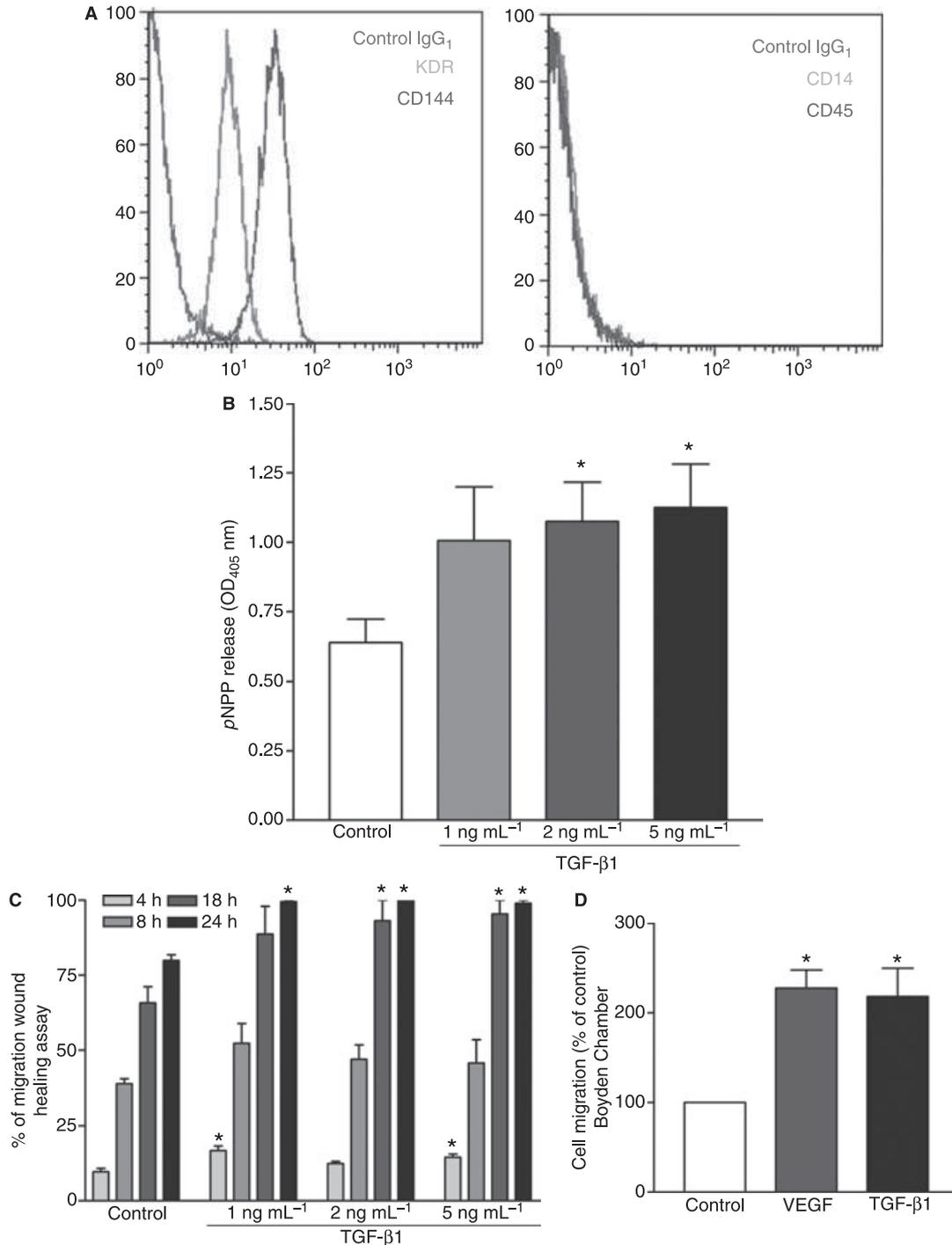
Overall, TGF- $\beta$ 1 enhanced ECFC viability and migration, but did not modify the capacity of these progenitor cells to form capillary-like structures. Furthermore, these effects were not mediated by alterations in either the VEGF or SDF-1 signaling pathways.

#### Role of TGF- $\beta$ receptors in TGF- $\beta$ 1-induced ECFC viability and migration

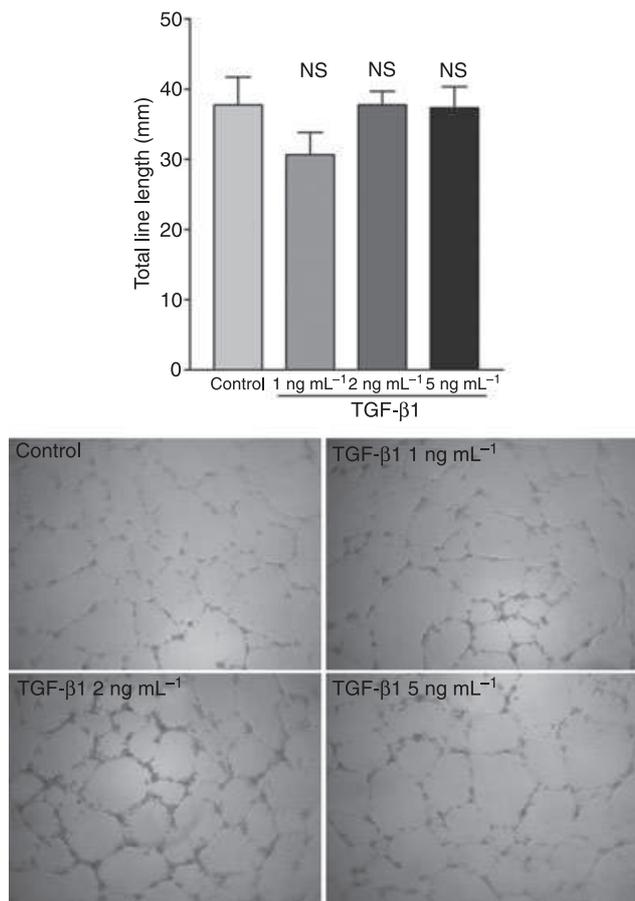
Real time qPCR showed that mRNAs of the three main receptors of TGF- $\beta$  (ALK-1, ALK-5, and TGF- $\beta$  RII) were expressed by cord blood-derived ECFCs and adult blood-derived ECFCs, as well as by HUVECs, HPAECs, and MSCs (Fig. 5A). CFU-ECs, monocytes, total blood cells and SMCs expressed ALK-5 and TGF- $\beta$  RII mRNA, but not ALK-1 mRNA. In order to determine the effects of the different TGF- $\beta$  receptors on ECFC viability and migration, we inhibited the gene expression of ALK-1, ALK-5 and TGF- $\beta$  RII in ECFCs by using siRNAs. Figure 5B shows that ALK-1, ALK-5 and TGF- $\beta$  RII mRNA expression remained strongly inhibited in ECFCs for 4 days following siRNA transfection. Transfected ECFCs were stimulated with 5 ng mL<sup>-1</sup> TGF- $\beta$ 1, which we had previously identified as the most effective concentration for inducing ECFC viability and migration (Fig. 3). When ALK-1, ALK-5 or TGF- $\beta$  RII expression was inhibited, TGF- $\beta$ 1 was no longer able to promote ECFC viability (Fig. 5C) or ECFC migration (Fig. 5D). Therefore, the three main TGF- $\beta$ 1 receptors, ALK-1, ALK-5, and TGF- $\beta$  RII, are implicated in TGF- $\beta$ 1-induced ECFC viability and migration.

#### Discussion

Of the TGF superfamily, TGF- $\beta$ 1 is the isoform most commonly implicated in fibrotic diseases, such as IPF [2]. As TGF- $\beta$ 1 is involved in the development of IPF [9], we elected to assess TGF- $\beta$ 1 levels in plasma from a large group of IPF patients. We found that plasma levels of total TGF- $\beta$ 1 are significantly increased in IPF patients as compared with controls. It has previously been reported that IPF patients have high plasma levels of TGF- $\beta$ 1 as compared with a non-age-matched control group [19,20]. To the best of our knowledge, this is the first time that plasma levels of TGF- $\beta$ 1 in IPF patients have been compared with those in an age-matched control group. This is particularly important, as levels of the TGF- $\beta$ 1 coreceptor endoglin have been found to be influenced by aging [21]. One of the limitations of our cohort is the chronic treatment received from the time of diagnosis and at the blood draw (immunosuppressive treatment, statins, vitamin K antagonists, antiplatelet agents, and angiotensin-converting enzyme inhibitors). However, none of these agents is associated with alterations in TGF- $\beta$ 1 plasma levels. Moreover, we have not been able to detect the active form of TGF- $\beta$ 1 in plasma from IPF patients, probably because levels of the active form are below the detection limits of the ELISA. The mechanisms leading to *in vivo* TGF- $\beta$ 1 activation remain complex, involving interactions with integrins, shear forces, and/or thrombospondin-1. These mechanisms might occur mostly in tissue. As it was reported that high levels of the active form of TGF- $\beta$ 1 were found in bronchoalveolar lavage fluid from IPF patients [22], we hypothesize that the latent form of TGF- $\beta$ 1 found in plasma from IPF patients is activated in tissue and, more particularly, in fibrotic lungs. IPF is also



**Fig. 3.** Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) effects on endothelial colony-forming cell (ECFC) viability and migration. (A) Characterization of ECFCs by flow cytometric analysis. The left panel represents surface expression of KDR (green line graph) and CD144 (blue line graph). The right panel represents surface expression of CD14 (green line graph) and CD45 (blue line graph). The red line graph represents the control (IgG<sub>1</sub>). (B) Cell viability assays were performed in 24-well plates with or without TGF- $\beta$ 1 at 1, 2 or 5 ng mL<sup>-1</sup>. After 48 h, non-adherent cells were washed off, and the number of adherent cells was determined by measuring paranitrophenol ( $\rho$ NPP) release (OD<sub>405</sub> nm). Each data point is the average of three wells, and each experiment was performed at least three times ( $*P < 0.05$ ). (C, D) ECFC migration was measured by wound healing and Boyden Chamber assays. (C) A round wound scratch was made in a confluent cell monolayer, and 1, 2 or 5 ng mL<sup>-1</sup> TGF- $\beta$ 1 was added to the medium. Cell migration over this wound scratch was monitored by photographing at 4, 8, 18 and 24 h, and wound area was measured at each time point. Cell migration was expressed as a percentage relative to the initial wound area ( $*P < 0.05$ ). (D) In a Boyden Chamber assay, ECFCs were placed in the upper compartment and allowed to migrate towards TGF- $\beta$ 1 (5 ng mL<sup>-1</sup>) or vascular endothelial growth factor (VEGF) (50 ng mL<sup>-1</sup>) placed in the lower compartment. TGF- $\beta$ 1 and VEGF increased ECFC migration ( $*P < 0.0001$ ). Data represent the percentage of migrating cells by comparison with control (EBM2 without growth factors in the lower chamber). Bars represent the mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments.



**Fig. 4.** Transforming growth factor-β1 (TGF-β1) effect on endothelial colony-forming cell (ECFC) tube formation. ECFCs were subjected to a Matrigel tube formation assay for 18 h, with or without TGF-β1 at 1, 2 or 5 ng mL<sup>-1</sup>. Quantitative analysis of network length was determined with VIDEOMET software (Microvision). The mean ± standard error of the mean of three experiments are shown.

characterized by a highly heterogeneous vascular remodeling process that might involve endothelial progenitor cells (EPCs) from bone marrow. Two different populations of EPCs have been described [17], but ECFCs exhibit features that are most typical of a true endothelial progenitor population. These cells are able to form neovessels *in vivo* in preclinical models [4,23]. The fact that ECFCs from bone marrow may be responsible for the vascular remodeling seen in IPF led us to investigate the role of TGF-β1 in the context of these cells.

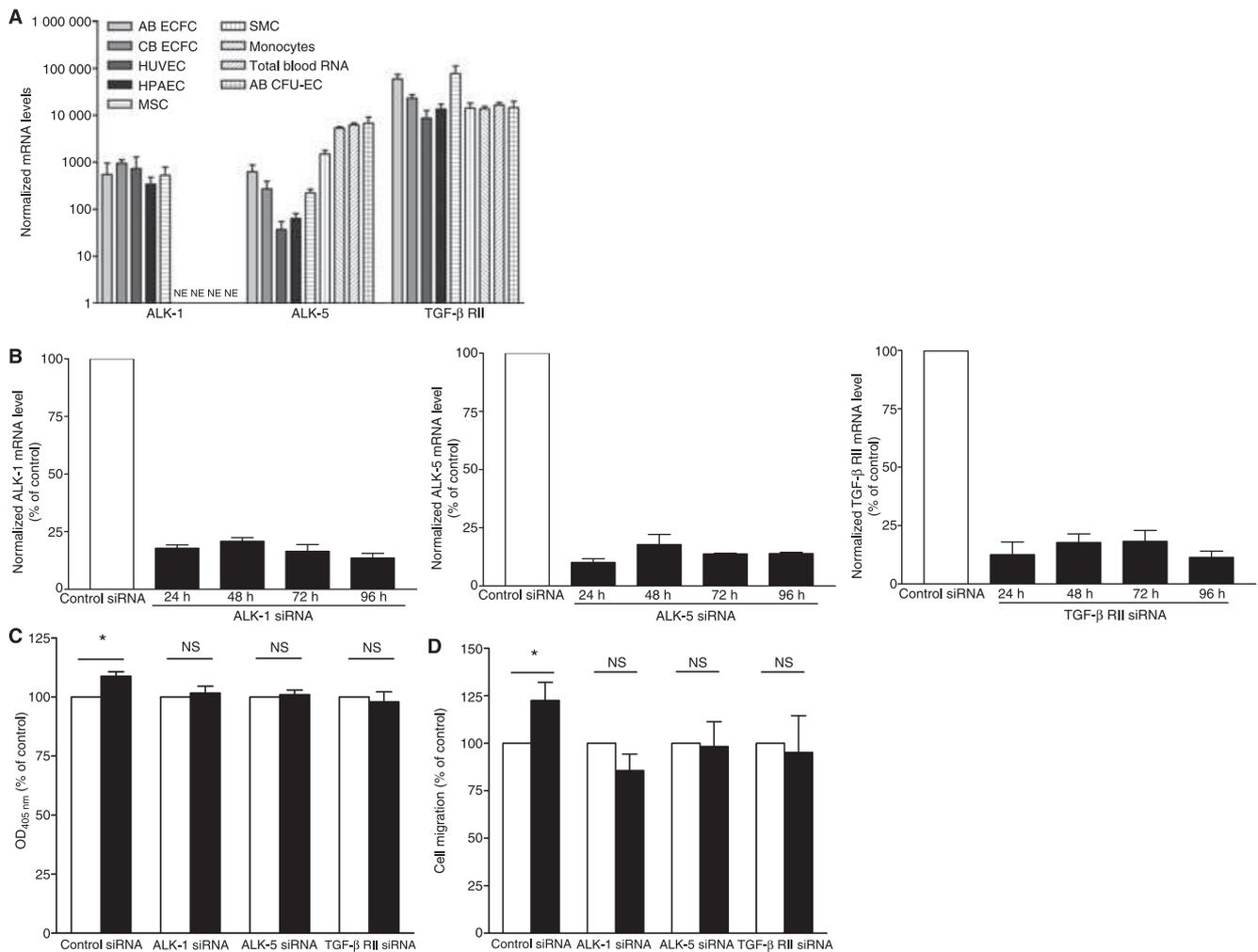
Here, we show that TGF-β1 has proangiogenic properties, enhancing ECFC viability and migration *in vitro* and blood vessel formation in a Matrigel plug assay *in vivo*. Previously, several *in vitro* and *in vivo* studies have provided strong evidence for the important role of TGF-β and BMP signaling in vasculogenesis and angiogenesis [4,24], but contrasting effects of TGF-β1 on angiogenesis have also been reported. Some studies have shown that TGF-β1 inhibits proliferation and migration of endothelial cells [5]; on the other hand, TGF-β1 may promote angiogenesis via the stimulation of VEGF expression in certain endothelial and tumor cell lines [7,8].

**Table 1** Effect of transforming growth factor-β1 (TGF-β1) on the mRNA levels of angiogenic factors, endothelial markers and specific gene target

	Fold increase after ECFC activation with TGF-β1		
	1 h	4 h	24 h
SDF-1	1.5 ± 0.3	0.8 ± 0.2	0.9 ± 0.2
CXCR4	1.2 ± 0.3	0.9 ± 0.4	1.0 ± 0.2
VEGF-A	0.9 ± 0.3	1.1 ± 0.7	1.0 ± 0.2
KDR	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.2
FLT-1	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.2 ± 0.2
CDH5	1.2 ± 0.4	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2
MCAM	1.2 ± 0.2	0.9 ± 0.02	1.0 ± 0.4
Id1	5.7 ± 4.4	1.6 ± 0.8	1.4 ± 0.3*
PAI-1	1.4 ± 0.3*	1.1 ± 0.3	2.5 ± 1.1
COX2	1.6 ± 0.1*	1.3 ± 0.6	0.9 ± 0.6

ECFC, endothelial colony-forming cell; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1. ECFCs were stimulated with TGF-β1 (5 ng mL<sup>-1</sup>) for 1, 4 or 24 h after 16 h of serum and growth-factor deprivation. The mRNA levels of SDF-1, CXCR4, KDR, FLT-1, CDH5 and MCAM were measured by real-time qPCR (Taqman) and normalized to the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA levels; the mRNA levels of VEGF, PAI-1, Id1 and COX2 were measured by real-time qPCR (SybrGreen) and normalized to the TBP mRNA level (mean ± standard error of the mean, *n* = 3). Normalized mRNA levels of stimulated cells were then compared with those of unstimulated cells. \**P* < 0.05.

However, in our experimental conditions, TGF-β1 failed to stimulate the gene expression of VEGF and SDF-1 or their receptors in ECFCs. This is consistent with other reports that ECFCs do not secrete VEGF [17], and we have not identified any situation able to stimulate ECFCs to secrete detectable amounts of VEGF. Therefore, it is likely that ECFCs contribute mostly to neovasculation *in vivo* by supplying a sufficient number of endothelial cells rather than via paracrine effects [17]. Recently, it has been shown that ECFCs are able to undergo an endothelial-to-mesenchymal transition after stimulation by TGF-β1 for 21 days [25]. Our experimental conditions, that is, 48 h of TGF-β1 stimulation, were not designed to induce endothelial-to-mesenchymal transition, and we did not observe any change in cell morphology. Furthermore, ECFC stimulation by TGF-β1 did not modify the mRNA expression of CDH5 or MCAM, which are endothelial markers (Table 1). In this study, we also demonstrated that TGF-β RII and the two TGF-β1 type I receptors (ALK-5 and ALK-1) are all necessary for TGF-β1-induced ECFC viability and migration. TGF-β1 induces its cellular effects by binding to TGF-β RII, leading to the recruitment of one of its two type I receptors, ALK-5 or ALK-1, in order to form an active heteromeric complex [1]. TGF-β RII is essential for the formation of an effective receptor, explaining why inhibition of TGF-β RII with siRNA abolished the effect of TGF-β1 on ECFC viability and migration. Both ALK-1 and ALK-5 induce different effects on various endothelial cells *in vitro*, suggesting that the effect of TGF-β1 is context-dependent and probably cell-dependent [8,26,27]. Mice deficient for *Tgfr2*, *Tgfr1* or *Alk1* exhibit vascular abnormalities and fragile blood



**Fig. 5.** Inhibition of ALK-1, ALK-5 or transforming growth factor- $\beta$  receptor type II (TGF- $\beta$  RII) in endothelial colony-forming cells (ECFCs) inhibits transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)-induced ECFC viability and migration. (A) ALK-1, ALK-5 or TGF- $\beta$  RII gene expression in ECFCs from adult blood (AB) or cord blood (CB), human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), human pulmonary artery endothelial cells (HPAECs), mesenchymal stem cells (MSCs), smooth muscle cells (SMCs), monocytes, whole blood cells, and colony-forming unit endothelial cells (CFU-ECs). NE, not expressed. (B) Quantitative analysis of ALK-1, ALK-5 or TGF- $\beta$  RII mRNA by real time qPCR, after 24, 48, 72 and 96 h of ECFC transfection with control short interfering (siRNA), ALK-1 siRNA, ALK-5 siRNA, or TGF- $\beta$  RII siRNA. The mean  $\pm$  standard error of the mean of three experiments are shown. (C) Inhibition of ALK-1, ALK-5 or TGF- $\beta$  RII in ECFCs abolished the effect of TGF- $\beta$ 1 (5 ng mL<sup>-1</sup>) on ECFC viability, as measured by parantrophol release. Each data point is the average of three wells, and each experiment was performed at least three times (\* $P$  < 0.05). (D) Inhibition of ALK-1, ALK-5 or TGF- $\beta$  RII in ECFCs decreased TGF- $\beta$ 1-induced ECFC migration (5 ng mL<sup>-1</sup>) in a Boyden Chamber assay. Each data point is the average of three wells, and each experiment was performed at least three times (\* $P$  < 0.05).

vessels, leading to embryonic death. This consistent phenotype across these differing murine models supports our finding that all three TGF- $\beta$  receptors are involved in vascular morphogenesis and endothelial cell function [24]. Endoglin is a TGF- $\beta$  type III auxiliary receptor that is not directly involved in signaling, but that modulates signaling responses of multiple members of the TGF- $\beta$  family [28]. Because of its lack of an enzymatic motif in its intracellular domain, endoglin is not able to activate the Smad pathway, which is the pathway that is most strongly implicated in mediating the actions of TGF- $\beta$ 1 on endothelial cells. As we wanted to investigate the direct effects of the different TGF- $\beta$ 1 receptors, we did not evaluate the role of this coreceptor. However, we note that previous

reports have indicated that endoglin may also influence endothelial cells.

ECFCs have been described as the progenitor cell type that is most capable of leading to blood vessel formation [29], and are responsible for newly formed vessels after human cell injections in mice and humans [4]. Recently, vessels derived from ECFCs were shown to be able to reconnect to the host vasculature, confirming their true angiogenic potential [30]. In addition, another recent study showed a strong correlation between ECFC properties *in vitro* and their angiogenic capacity in a Matrigel plug model [31]. Of relevance to our study, the ECFC phenotype has not been described in mice, making it difficult to perform this work with murine cells. For this reason, ECFCs

have been less extensively evaluated in the literature over the past decade, and comparisons between murine and human ECFCs can only be made on the basis of vessel quantification, and not by directly evaluating ECFC numbers. Finally, no specific ECFC marker has been identified, making it challenging to distinguish ECFC-derived vessels from vessels that may have formed by other means. The Matrigel plug model has been largely used as a matrix for the bioengineered vascular network formation that occurs *in vivo* [29]. In the present work, we showed that TGF- $\beta$ 1 enhances Matrigel plug angiogenesis by increasing both the hemoglobin content and new blood vessel formation. We did not observe any significant differences between the doses of TGF- $\beta$ 1 tested, even though the plugs with the lower doses of TGF- $\beta$ 1 appeared to contain marginally more blood vessels. It has been observed that lower concentrations of TGF- $\beta$ 1 might be proangiogenic, whereas high concentrations might be antiangiogenic. However, in our *in vitro* experiments, 5 ng mL<sup>-1</sup> TGF- $\beta$ 1 was more efficient than 1 ng mL<sup>-1</sup>, indicating that the effect of TGF- $\beta$ 1 on angiogenesis may involve various factors. Moreover, TGF- $\beta$ 1-induced angiogenesis has been shown to be modulated by possible cooperation with additional factors, such as BMP9 [32]. As we described a high level of BMP expression in ECFCs [4], we cannot exclude the possibility that additional effects could interfere with the angiogenic response to TGF- $\beta$ 1.

IPF patients are characterized by restrictive lung physiology, reduced gas exchange, and an inexorable clinical demise [33]. The etiology of this devastating fibrotic disease is unknown, and therapeutic options are limited. Nevertheless, across a spectrum of diseases, fibrosis is most commonly attributed to the TGF- $\beta$ 1 isoform, which contributes to the formation of myofibroblasts, the main source of matrix proteins, through the activation of resident fibroblasts and by inducing epithelial-to-mesenchymal and endothelial-to-mesenchymal transitions [34,35]. Although TGF- $\beta$ 1 is known to be of importance in fibrosis, our data suggest an additional EPC-modulatory action of TGF- $\beta$ 1. A pathobiological role for EPCs in lung disease has previously been proposed [36], but the mechanisms have remained elusive. As a key novel finding, our results suggest that TGF- $\beta$ 1 may recruit progenitor cells from bone marrow or lung and increase their proliferation, thereby facilitating aberrant pulmonary vascular remodeling.

In conclusion, our data suggest that the profibrotic cytokine TGF- $\beta$ 1 has a proangiogenic function, inducing the formation of new blood vessels in a Matrigel plug assay and enhancing the viability and migration of ECFCs. Together, these findings suggest that TGF- $\beta$ 1 may play an important role in excessive angiogenesis and/or pathologic vascular remodeling in fibrotic diseases via the recruitment and expansion of EPCs.

## Addendum

S.M. Evrard: study design, acquisition of data, analysis and interpretation of data and results, statistical analysis, and manuscript drafting; C. D'Audigier: acquisition of data,

and analysis and interpretation of data; L. Mauge: acquisition of data, and analysis and interpretation of data; I. Bieche: acquisition of data, and analysis of data; C. Guerin: acquisition of data, and analysis of data, D. Israël-Biet, J. C. Kovacic, A.-M. Fischer, and P. Gaussem: critical revision of the manuscript for important intellectual content; and D. M. Smadja: study concept and design, analysis and interpretation of data and results, statistical analysis, manuscript drafting, critical revision of the manuscript for important intellectual content, and final approval.

## Acknowledgements

We thank H. Nunes, B. Crestani and D. Valeyre from the pulmonology department of Avicenne and Bichat hospital for recruiting patients with IPF. We thank A. Blanchard from Centre d'investigation clinique Inserm Centre 9201 in the European Georges Pompidou hospital for recruiting healthy controls. We thank B. Dizier for assistance with the Matrigel plug assay. We thank C. Martin and all technicians from the animal facility of IMTCE. We are grateful to the nursing services of Hôpital des Diaconesses (Paris) and Begin (Saint Mandé) for providing umbilical cord blood samples. We thank the team from INSERM UMRS 765 (I. Galy-Fauroux, A. Lokajczyk and B. Marsac) for their excellent technical assistance in the preparation of ECFCs from umbilical cord blood.

## Disclosure of Conflict of Interests

C. d'Audigier was supported by FRM. This work was supported by research grants from the Leg Poix (Chancelleries des universités), Fondation de France, Inserm, and Leducq TransAtlantic Network of Excellence.

## References

- Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; **113**: 685–700.
- Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 2000; **342**: 1350–8.
- Ahamed J, Burg N, Yoshinaga K, Janczak CA, Rifkin DB, Collier BS. *In vitro* and *in vivo* evidence for shear-induced activation of latent transforming growth factor-beta1. *Blood* 2008; **112**: 3650–60.
- Smadja DM, Bieche I, Silvestre JS, Germain S, Cornet A, Laurendeau I, Duong-van-Huyen JP, 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* 2008; **28**: 2137–43.
- Pollman MJ, Naumovski L, Gibbons GH. Vascular cell apoptosis: cell type-specific modulation by transforming growth factor-beta1 in endothelial cells versus smooth muscle cells. *Circulation* 1999; **99**: 2019–26.
- Ferrari G, Pintucci G, Seghezzi G, Hyman K, Galloway AC, Mignatti P. VEGF, a pro-survival factor, acts in concert with TGF-beta1 to induce endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 17260–5.
- Benckert C, Jonas S, Cramer T, von Marschall Z, Schafer G, Peters M, Wagner K, Radke C, Wiedenmann B, Neuhaus P, Hocker M, Rose-

- wicz S. Transforming growth factor beta 1 stimulates vascular endothelial growth factor gene transcription in human cholangiocellular carcinoma cells. *Cancer Res* 2003; **63**: 1083–92.
- 8 Shao ES, Lin L, Yao Y, Bostrom KI. Expression of vascular endothelial growth factor is coordinately regulated by the activin-like kinase receptors 1 and 5 in endothelial cells. *Blood* 2009; **114**: 2197–206.
  - 9 Bonniaud P, Kolb M, Galt T, Robertson J, Robbins C, Stampfli M, Lavery C, Margetts PJ, Roberts AB, Gauldie J. Smad3 null mice develop airspace enlargement and are resistant to TGF-beta-mediated pulmonary fibrosis. *J Immunol* 2004; **173**: 2099–108.
  - 10 Ebina M, Shimizukawa M, Shibata N, Kimura Y, Suzuki T, Endo M, Sasano H, Kondo T, Nukiwa T. Heterogeneous increase in CD34-positive alveolar capillaries in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; **169**: 1203–8.
  - 11 Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, Colby TV, Cordier JF, Flaherty KR, Lasky JA, Lynch DA, Ryu JH, Swigris JJ, Wells AU, Ancochea J, Bouros D, Carvalho C, Costabel U, Ebina M, Hansell DM, *et al.* An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; **183**: 788–824.
  - 12 Smadja DM, Bieche 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. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25**: 2321–7.
  - 13 Smadja DM, 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* 2006; **4**: 2051–8.
  - 14 Dupont A, Corseaux D, Dekeyser O, Drobecq H, Guihot AL, Susen S, Vincentelli A, Amouyel P, Jude B, Pinet F. The proteome and secretome of human arterial smooth muscle cells. *Proteomics* 2005; **5**: 585–96.
  - 15 Smadja DM, d'Audigier C, Weiswald LB, Badoual C, Dangles-Marie V, Mauge L, Evrard S, Laurendeau I, Lallemand F, Germain S, Grelac F, Dizier B, Vidaud M, Bieche I, Gaussem P. The Wnt antagonist Dickkopf-1 increases endothelial progenitor cell angiogenic potential. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; **30**: 2544–52.
  - 16 Dupont A, Fontana P, Bachelot-Loza C, Reny JL, Bieche I, Desvard F, Aiach M, Gaussem P. An intronic polymorphism in the PAR-1 gene is associated with platelet receptor density and the response to SFLLRN. *Blood* 2003; **101**: 1833–40.
  - 17 Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, Oh BH, Lee MM, Park YB. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; **24**: 288–93.
  - 18 Cellier E, Midaoui AE, Robitaille GA, Richard DE, Lariviere R, Lebel M. Effects of TGF-beta1 on endothelial factors. *Arch Physiol Biochem* 2010; **116**: 50–5.
  - 19 Yong SJ, Adlakha A, Limper AH. Circulating transforming growth factor-beta(1): a potential marker of disease activity during idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2001; **120**: 68S–70S.
  - 20 Molina-Molina M, Lario S, Luburich P, Ramirez J, Carrion MT, Xaubet A. Quantifying plasma levels of transforming growth factor beta1 in idiopathic pulmonary fibrosis. *Arch Bronconeumol* 2006; **42**: 380–3.
  - 21 Blanco FJ, Grande MT, Langa C, Oujou B, Velasco S, Rodriguez-Barbero A, Perez-Gomez E, Quintanilla M, Lopez-Novoa JM, Bernabeu C. S-endoglin expression is induced in senescent endothelial cells and contributes to vascular pathology. *Circ Res* 2008; **103**: 1383–92.
  - 22 Khalil N, Parekh TV, O'Connor R, Antman N, Kepron W, Yehaulaeshet T, Xu YD, Gold LI. Regulation of the effects of TGF-beta 1 by activation of latent TGF-beta 1 and differential expression of TGF-beta receptors (T beta R-I and T beta R-II) in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 2001; **56**: 907–15.
  - 23 Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, Krasich R, Temm CJ, Prchal JT, Ingram DA. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* 2007; **109**: 1801–9.
  - 24 Pardali E, Goumans MJ, ten Dijke P. Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease. *Trends Cell Biol* 2010; **20**: 556–67.
  - 25 Moonen JR, Krenning G, Brinker MG, Koerts JA, van Luyn MJ, Harmsen MC. Endothelial progenitor cells give rise to pro-angiogenic smooth muscle-like progeny. *Cardiovasc Res* 2010; **86**: 506–15.
  - 26 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**: 1743–53.
  - 27 Lamouille S, Mallet C, Feige JJ, Bailly S. Activin receptor-like kinase 1 is implicated in the maturation phase of angiogenesis. *Blood* 2002; **100**: 4495–501.
  - 28 ten Dijke P, Goumans MJ, Pardali E. Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis* 2008; **11**: 79–89.
  - 29 Melero-Martin JM, De Obaldia ME, Kang SY, Khan ZA, Yuan L, Oettgen P, Bischoff J. Engineering robust and functional vascular networks *in vivo* with human adult and cord blood-derived progenitor cells. *Circ Res* 2008; **103**: 194–202.
  - 30 Kang KT, Allen P, Bischoff J. Bioengineered human vascular networks transplanted into secondary mice reconnect with the host vasculature and re-establish perfusion. *Blood* 2011; **118**: 6718–21.
  - 31 Benslimane-Ahmim Z, Heymann D, Dizier B, Lokajczyk A, Brion R, Laurendeau I, Bieche I, Smadja DM, Galy-Fauroux I, Collic-Jouault S, Fischer AM, Boisson-Vidal C. Osteoprotegerin, a new actor in vasculogenesis, stimulates endothelial colony-forming cell properties. *J Thromb Haemost* 2011; **9**: 834–43.
  - 32 Cunha SI, Pardali E, Thorikay M, Anderberg C, Hawinkels L, Goumans MJ, Sehra J, Heldin CH, ten Dijke P, Pietras K. Genetic and pharmacological targeting of activin receptor-like kinase 1 impairs tumor growth and angiogenesis. *J Exp Med* 2010; **207**: 85–100.
  - 33 American Thoracic Society. ATS statement on idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; **165**: 277–304.
  - 34 Zavadil J, Bottinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 2005; **24**: 5764–74.
  - 35 Willis BC, duBois RM, Borok Z. Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung. *Proc Am Thorac Soc* 2006; **3**: 377–82.
  - 36 Fadini GP, Schiavon M, Cantini M, Baesso I, Facco M, Miorin M, Tassinato M, de Kreutzenberg SV, Avogaro A, Agostini C. Circulating progenitor cells are reduced in patients with severe lung disease. *Stem Cells* 2006; **24**: 1806–13.

## Publication 2: La thrombospondine-1 est un biomarqueur plasmatique dans l'artériopathie des membres inférieurs qui module les propriétés angiogènes des progéniteurs endothéliaux

David M. Smadja <sup>1,2,3</sup>, Clément d'Audigier <sup>1,2,3</sup>, Ivan Bièche <sup>1,4</sup>, Solène Evrard <sup>1,2,3</sup>, Laetitia Mauge <sup>1,2,3</sup>, Juliana-Vieira Dias <sup>2,5</sup>, Julien Labreuche <sup>6</sup>, Ingrid Laurendeau <sup>1,4</sup>, Bérengère Marsac <sup>1,2</sup>, Blandine Dizier <sup>2</sup>, Oriane Wagner-Ballon <sup>7</sup>, Catherine Boisson-Vidal <sup>2</sup>, Véronica Morandi <sup>5</sup>, Jean-Paul Duong-Van-Huyen <sup>1,3,8</sup>, Patrick Bruneval <sup>1,3,8</sup>, Françoise Dignat-George <sup>9</sup>, Joseph Emmerich <sup>1,2,3</sup> and Pascale Gaussem <sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Université Paris Descartes, Paris, France

<sup>2</sup> INSERM UMRS765

<sup>3</sup> AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou

<sup>4</sup> INSERM UMRS745

<sup>5</sup> UERJ, Departamento de Biologia Celular, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>6</sup> INSERM UMRS698

<sup>7</sup> INSERM UMRS1009

<sup>8</sup> INSERM UMRS872

<sup>9</sup> INSERM UMRS608

### Résumé

L'artériopathie des membres inférieurs (AMI) est une pathologie athéromateuse dont le stade ultime est l'ischémie critique. Dans ce contexte, l'athérosclérose induit une occlusion de l'arbre artériel et une hypoxie tissulaire, déclenchant ainsi une angiogenèse réactionnelle, avec développement physiologique de vaisseaux collatéraux chez les patients atteints d'ischémie critique. Les progéniteurs endothéliaux pourraient jouer un rôle dans cette vascularisation post-ischémique. En effet, notre équipe a déjà montré qu'ils avaient une capacité de vasculogenèse post-natale *in vivo* puisque les néovaisseaux formés après injection de cellules mononucléées de moelle osseuse (BM-MNC), chez des patients atteints d'ischémie critique, avaient le phénotype d'ECFC <sup>41</sup>. Ces ECFC, pourraient constituer un produit de thérapie cellulaire autologue intéressant dans ces pathologies.

Notre but était de déterminer si un ou plusieurs facteurs modulant l'angiogenèse pouvaient se distinguer en tant que biomarqueur chez les patients artéritiques, et si ce potentiel biomarqueur modifierait la vasculogenèse post-natale induite par les progéniteurs endothéliaux. En effet, élucider ces questions permettrait de mieux comprendre le rôle des progéniteurs endothéliaux dans la physiopathologie de l'AMI, dans ce contexte de revascularisation post-ischémique.

Dans un premier temps, nous avons donc mesuré les taux plasmatiques de facteurs modulant l'angiogenèse [*Vascular endothelial Growth Factor* (VEGF), *Placental Growth Factor* (PlGF), *Thrombospondin-1* (TSP-1)] dans les plasmas de 184 patients artéritiques et de 330 contrôles sains appariés pour l'âge (essai clinique PALLAS). En effet, des taux élevés de VEGF ont été décrits chez des patients artéritiques dans une précédente étude portant sur 46 patients <sup>629</sup>. Le PlGF quant à lui, pourrait également jouer un rôle déterminant dans

l'angiogenèse pathologique<sup>185, 825</sup>. Par ailleurs, la TSP-1 anti-angiogène a été observée surexprimée dans des coupes histologiques de tissus ischémiques humains et murins<sup>658, 659</sup>.

Nous avons également analysé par immunohistochimie l'expression de la TSP-1 dans des coupes de tissus issues de pièces d'amputation de patients atteints d'ischémie critique, traités ou non par injection de BM-MNC, dans le cadre de l'essai clinique OPTIPEC. En effet, une néoangiogenèse en distalité a été observée dans ces pièces d'amputation<sup>41, 258</sup>.

Afin d'étudier le rôle fonctionnel de la TSP-1 dans des contextes de néoangiogenèse, nous avons utilisé 2 modèles *in vivo*. Le modèle d'implants de Matrigel®, sans ou avec 10 µg/mL de TSP-1 recombinante, a été réalisé chez la souris sauvage C57Black6/J vs chez la souris TSP-1<sup>-/-</sup>; la protéine TSP-1 recombinante a été testée en injections intramusculaires quotidiennes de 10 µg (5 jours au total) dans le modèle murin d'ischémie du membre inférieur (IMI) chez la souris C57Black6/J, ce modèle d'ischémie ayant déjà été étudié chez la souris TSP-1<sup>-/-</sup><sup>658</sup>, rapportant que ces souris étaient cliniquement et histologiquement protégées contre la nécrose.

Après avoir vérifié que les ECFC exprimaient au moins un des récepteurs à la TSP-1, le rôle fonctionnel de la TSP-1 dans la vasculogenèse post-natale médiée par les ECFC a ensuite été étudié.

Pour cela nous avons procédé en évaluant l'effet de l'inhibition de la TSP-1 par ARN interférence (siRNA-TSP-1) dans les ECFC, *in vitro* (tests de prolifération, de formation de pseudotubes dans le Matrigel®, évaluation transcriptomique du VEGF, du SDF-1, de l'Ang-2 et de leurs récepteurs, ainsi que de l'eNOS et de la TSP-2) et *in vivo* (injection d'ECFC transfectées avec le siRNA-TSP-1 dans le modèle d'IMI chez la souris Nude).

Nous avons ensuite testé l'effet de la TSP-1 recombinante sur les propriétés angiogènes et adhésives des ECFC. La partie N-terminale de la TSP-1 ayant été décrite comme étant responsable des propriétés pro-angiogènes de la TSP-1, nous avons testé en parallèle le peptide A1 dérivé de la partie N-terminale de la TSP-1<sup>826, 827</sup>.

Enfin nous avons évalué l'effet *in vitro* de l'inhibition par ARN interférence du CD47 des ECFC (tests d'adhésion, de prolifération, de tubulogenèse), un des récepteurs de la TSP-1, puisque le CD36, récepteur de la partie N-terminale de la TSP-1, a été décrit comme absent des HUVEC<sup>828</sup>, mais également des ECFC comme démontré dans ce travail.

Il n'y a pas de différence significative pour les taux de VEGF et de PlGF entre le groupe de patients artéritiques et le groupe contrôle, alors que des taux significativement plus importants de TSP-1 sont retrouvés chez les artéritiques, corrélés de façon linéaire (après catégorisation en tertiles) avec le nombre de cas. Par ailleurs, les néovaisseaux formés en distalité chez les patients artéritiques contrôles de l'essai OPTIPEC, mais également chez ceux ayant été traités par injection locale de BM-MNC, expriment la TSP-1.

La vascularisation des implants de Matrigel® est plus importante chez les souris TSP-1<sup>-/-</sup> que chez les souris sauvages C57Bl6/J. Cependant, en présence de 10 µg/mL de TSP-1 recombinante par implant de Matrigel®, cette vascularisation est significativement diminuée aussi bien chez les souris sauvages que chez les souris TSP-1<sup>-/-</sup>, par rapport aux implants contrôles.

Dans le modèle d'ischémie du membre inférieur chez la souris C57Bl6/J, les injections intramusculaires répétées de TSP-1 recombinante dans le membre ischémié diminuent sa revascularisation.

L'analyse par cytométrie en flux des ECFC confirme leur phénotype partiel « CD14<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD146<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup> », ainsi que la présence du récepteur CD47 mais l'absence du récepteur CD36.

Lorsque la TSP-1 des ECFC est inhibé par un siRNA spécifique, leurs potentiels de prolifération et de formation de pseudotubes dans le Matrigel® sont augmentés. Cette inhibition par le siRNA-TSP-1 augmente l'expression dans les ECFC des ARN messagers du SDF-1 et de son récepteur le CXCR4, ainsi que l'expression protéique du CXCR4 évaluée par cytométrie en flux. L'augmentation du potentiel tubulogénique des ECFC transfectées avec le siRNA-TSP-1 est annulée en présence de l'anticorps monoclonal 12G5 anti-CXCR4.

Dans le modèle d'ischémie du membre inférieur chez la souris Nude, l'injection en IV d'ECFC transfectées avec le siRNA-TSP-1 augmente significativement la revascularisation du membre ischémié par rapport aux ECFC contrôles.

L'exposition à la TSP-1 recombinante ou au peptide A1 augmente significativement le potentiel d'adhésion des ECFC, suggérant un mécanisme N-ter-dépendant.

Contrairement à la TSP-1 recombinante, le peptide A1 n'a pas d'effet sur la prolifération et augmente significativement le potentiel tubulogénique des ECFC. L'effet anti-prolifératif de la TSP-1 pourrait être expliqué au moins en partie par un mécanisme pro-apoptotique, en accord avec l'augmentation de l'expression dans les ECFC des ARN messagers du Fas-L et de la p53 après stimulation par la TSP-1 recombinante. L'effet anti-tubulogénique de la TSP-1 quant à lui, pourrait être expliqué par la diminution de l'expression dans les ECFC des ARN messagers du SDF-1 et du CXCR4 après stimulation par la TSP-1 recombinante.

Les ECFC dont le CD47 est inhibé par le siRNA spécifique, ont le même phénotype au niveau prolifération et tubulogénèse que lors de l'inhibition de la TSP-1.

Nos résultats suggèrent que la TSP-1 pourrait être un biomarqueur potentiel dans l'artériopathie des membres inférieurs ainsi que de la vasculogénèse induite par les ECFC. La modulation de la concentration de TSP-1 pourrait favoriser l'ischémie tissulaire locale dans ce contexte.

## **Discussion et perspectives**

Le processus athérosclérotique à l'origine de l'AOMI est d'installation progressive et d'évolution relativement lente, ce qui aboutit à un état d'ischémie chronique pour les tissus périphériques à proximité du/des vaisseau(x) touché(s). L'hypoxie et l'inflammation résultantes notamment, constituent des signaux qui vont moduler l'angiogénèse locale et permettre la formation de vaisseaux collatéraux pouvant impliquer les ECFC. Comme évoqué dans le paragraphe 2.4., les médiateurs de l'inflammation qui ont été testés en clinique en tant que potentiel biomarqueur de l'AMI ne sont pas spécifiques de cette pathologie périphérique. Les protéines que nous avons choisies d'évaluer en tant que potentiel biomarqueur de l'AMI sont probablement impliquées dans le processus de néovascularisation post-ischémique dans l'AMI, et connues pour, ou susceptibles de moduler les propriétés angiogènes des ECFC. Elles ne seraient donc pas plus spécifiques de la pathologie, mais du processus de néoangiogénèse réactionnelle.

Parmi les facteurs angiogènes que nous avons étudiés, seuls les taux plasmatiques de TSP-1 sont significativement augmentés chez les patients artéritiques. Il existe de plus une relation linéaire entre les taux de TSP-1 et le nombre de cas d'AMI, alors qu'avec le VEGF ou le PIGF, seuls les 2 tertiles extrêmes sont associés avec un nombre de cas augmenté par rapport au

tertile médian. Après ajustement en fonction des facteurs de risque cardiovasculaires classiques, des traitements hypolipémiants et des taux de CRP, nous retrouvons la même corrélation entre les taux de TSP-1 et le nombre de cas d'AMI. Nous avons également évalué si certains paramètres cliniques constituant des facteurs de risque d'AMI influençaient les concentrations de VEGF, de PlGF et de TSP-1. Il existe une corrélation significative entre le taux de CRP et les taux de VEGF et de PlGF. De plus le taux de PlGF est corrélé avec l'âge, l'absence d'hypertension et l'absence de thérapeutique antiagrégante plaquettaire. De façon intéressante nous n'avons pas retrouvé de corrélation entre les paramètres cliniques évalués et les taux plasmatiques de TSP-1. Par ailleurs, il n'y a pas non plus de différence entre les taux plasmatiques de VEGF, de PlGF et de TSP-1 en fonction du degré de sévérité de la maladie.

Ces taux plasmatiques augmentés de TSP-1, constituant donc le seul facteur corrélé de façon linéaire avec le nombre de cas d'AMI, pourraient être le résultat d'une surexpression par les tissus ischémiques<sup>829</sup>. En effet, des coupes de tissus ischémiques montrent un marquage important en immunohistochimie pour la TSP-1 par rapport au muscle contrôle<sup>659</sup>. Par ailleurs, l'augmentation des taux plasmatiques de TSP-1 chez les patients artéritiques pourrait être due à l'activation des plaquettes dans un contexte inflammatoire. En effet, les plaquettes constituent une source importante de TSP-1 qui y est stockée dans les granules  $\alpha$ . Cette augmentation de TSP-1 circulante pourrait être corrélée à une aggravation de l'état clinique de ces patients artéritiques, étant donné l'efficacité des agents antiagrégants plaquettaires.

En parallèle à l'analyse des taux plasmatiques, l'expression de la TSP-1 et du CD68 (afin de localiser les macrophages) a été explorée dans des pièces d'amputation de patients atteints d'ischémie critique, traités ou non par injection de BM-MNC dans le cadre de l'essai clinique OPTIPEC. A noter qu'une néoangiogenèse en distalité était observée chez les patients traités<sup>41, 258</sup>. L'expression de la TSP-1 a alors été retrouvée prédominante au niveau des CE et des macrophages, quelque soit le groupe de patients (traités ou non). Au vu de cette topographie similaire d'expression de la TSP-1 entre ces 2 groupes de patients, nous pouvons supposer un mécanisme autocrine *in situ* durant cette néoangiogenèse réactionnelle, plutôt qu'une augmentation d'expression de TSP-1 *in situ* due à l'apport de BM-MNC.

La TSP-1 représenterait donc un potentiel biomarqueur dans l'AOMI, modulant l'angiogenèse, détectable dans le plasma des patients, et ayant un rôle possible dans la néoangiogenèse réactionnelle des patients atteints d'ischémie critique.

Afin d'étudier le rôle de la TSP-1 dans les processus de néoangiogenèse, nous avons utilisé les modèles murins de Matrigel®-plugs et d'ischémie de la patte postérieure. Nous avons alors observé que la vascularisation des implants de Matrigel® à 14 jours de l'injection est plus importante chez les souris TSP-1<sup>-/-</sup> que chez les souris sauvages C57Bl6/J, comme attesté par le dosage d'hémoglobine dans les implants. Parallèlement, en présence de 10  $\mu$ g/mL de TSP-1 recombinante par implant de Matrigel®, cette vascularisation est significativement diminuée aussi bien chez les souris sauvages que chez les souris TSP-1<sup>-/-</sup>, par rapport aux implants contrôles. Dans le modèle d'ischémie du membre inférieur chez la souris C57Bl6/J, des injections intramusculaires quotidiennes répétées de TSP-1 recombinante (sur 5 jours au total, 10  $\mu$ g dans 20  $\mu$ L par injection) après ischémie par double ligature/excision de l'artère et de la veine fémorales, induisent une diminution significative de la reperfusion du membre ischémié. Ces données traduisent que la TSP-1 exerce un effet inhibiteur sur l'angiogenèse dans ces 2 modèles *in vivo*.

Trois arguments majeurs nous ont ensuite conduits à étudier le rôle de la TSP-1 au niveau des propriétés angiogènes des ECFC : i) la vasculogenèse post-natale est médiée par les PEC<sup>49</sup> ; ii) les néovaisseaux formés expriment la TSP-1<sup>658, 659</sup> ; iii) les cellules retrouvées dans les néovaisseaux formés ont le phénotype d'ECFC<sup>38, 41</sup>. Nous avons d'abord vérifié que les ECFC expriment des marqueurs endothéliaux comme le CD146, mais pas de marqueurs monocytiques comme le CD14 et le CD45. Par ailleurs, ces ECFC présentent une densité importante à leur surface du CD47, mais pas du CD36, deux récepteurs à la TSP-1. Au vu de nos résultats *in vivo* dans le modèle de Matrigel®-plugs chez la souris TSP-1<sup>-/-</sup>, et dans l'optique d'améliorer les propriétés angiogènes des ECFC, nous avons étudié dans un premier temps l'effet de l'inhibition de l'expression de la TSP-1 dans les ECFC. A cette fin, nous avons sélectionné un siRNA spécifique et vérifié qu'il inhibait au niveau transcriptomique et protéomique l'expression de la TSP-1, aussi bien dans les ECFC issues de sang de cordons que dans celles issues de sang périphérique adulte, mais aussi au niveau transcriptomique dans les HUVEC, pendant au moins 72 heures. Nous avons donc évalué les ECFC transfectées par ce siRNA-TSP-1, et observé qu'elles avaient une capacité proliférative augmentée (test au pNPP, et expression des ARNm du marqueur Ki67), ainsi qu'un potentiel de différenciation en pseudotubes dans le Matrigel® amélioré.

Au vu de ces résultats *in vitro* sur les ECFC, nous avons décidé d'explorer un éventuel effet transcriptionnel de l'inhibition de l'expression de la TSP-1, afin d'identifier un mécanisme cellulaire à l'origine de l'effet pro-angiogène de cette inhibition. Nous avons donc quantifié l'expression des ARNm de différents facteurs angiogènes et de leurs récepteurs, comme le VEGFA, l'Ang-2, le SDF-1 et la eNOS, mais également de la TSP-2, dans les ECFC transfectées par le siRNA-TSP1. En effet, la TSP-1 et la TSP-2 sont très proches au niveau structure et fonction, quoique des effets contradictoires ont été rapportés dans un contexte post-ischémique pour la TSP-2<sup>706</sup>. Quarante-huit heures après la transfection par le siRNA-TSP-1, l'expression de la TSP-2 n'est pas modifiée. Les effets pro-angiogènes de cette inhibition sont donc attribuables à la modulation spécifique de l'expression de la TSP-1, sans effet « croisé » avec l'expression de la TSP-2. L'inhibition de la TSP-1 augmente de façon significative uniquement les taux d'ARNm du SDF-1 et du CXCR4, dans les ECFC issues de sang de cordons et de sang périphérique adulte, mais pas dans les HUVEC. En parallèle, nous observons une augmentation de l'expression protéique du CXCR4 en surface des ECFC issues de sang de cordons (CMF). Afin de démontrer que l'effet de l'inhibition de la TSP-1 était attribuable à la voie de signalisation SDF-1/CXCR4, nous avons utilisé l'anticorps monoclonal « 12G5 » reconnaissant un épitope dans la seconde boucle extracellulaire du CXCR4, cet anticorps ayant déjà révélé un effet anti-angiogène sur les ECFC<sup>217</sup>. L'augmentation du potentiel tubulogénique des ECFC en Matrigel® par l'inhibition de la TSP-1 s'avère abolie en présence de l'anticorps 12G5. Ce résultat permet donc d'impliquer au moins cette voie SDF-1/CXCR4 dans la modulation du potentiel de différenciation des ECFC lors de l'inhibition de la TSP-1.

Du fait de l'augmentation du potentiel pro-angiogène *in vitro* due à l'inhibition de la TSP-1 dans les ECFC, nous avons évalué ces ECFC transfectées dans le modèle d'ischémie du membre inférieur chez la souris Nude, 6 heures après la ligature. Sept jours après l'ischémie, les ECFC transfectées avec le siRNA-TSP-1 présentent un potentiel de revascularisation du membre ischémié augmenté.

Après cet axe de travail où nous avons exploré l'effet de l'inhibition de l'expression de la TSP-1 dans les ECFC, nous avons testé l'effet direct de la TSP-1 recombinante, ainsi que celui du peptide A1 dérivant de la partie N-terminale de la TSP-1, sur les propriétés *in vitro* des ECFC. En effet, les propriétés pro-angiogènes de la TSP-1 ont été attribuées à sa partie N-

terminale, mais le récepteur CD36 capable de lier la TSP-1 via sa partie N-terminale est absent des ECFC. Nos résultats *in vivo* décrivent un effet direct anti-angiogène de la TSP-1 sur la revascularisation post-ischémique, qui pourrait donc s'exercer via le récepteur CD47 qui est lui présent sur les ECFC. Il est donc apparu intéressant de comparer l'effet *in vitro* direct sur les ECFC de la TSP-1 recombinante à un éventuel effet du peptide A1 (absence d'effet attendu ou effet passant par une autre voie que le CD36). De façon intéressante, nous avons observé une importante augmentation de l'adhésion des ECFC, aussi bien avec la TSP-1 recombinante qu'avec le peptide A1, laissant supposer un mécanisme N-ter dépendant mais passant par une autre voie que celle du CD36. En effet, notre équipe a par la suite montré que la stimulation par le peptide A1 des propriétés adhésives des ECFC vis-à-vis des HUVEC, implique le syndecan-4 exprimé à la surface des ECFC<sup>830</sup>. Par contre, le peptide A1 n'est pas capable de réduire les capacités proliférative et tubulogénique des ECFC contrairement à la TSP-1 recombinante, laissant supposer un mécanisme indépendant de la partie N-terminale de la TSP-1. Au contraire, le peptide A1 augmente la formation de pseudotubes dans le Matrigel® par les ECFC. L'inhibition des capacités prolifératives des ECFC par la TSP-1 pourrait être en rapport avec une augmentation des mécanismes apoptotiques, comme le montre l'augmentation des taux d'ARNm de Fas L et de p53 lorsque les ECFC sont exposées à la TSP-1 recombinante (1 et 10 µg/mL). La stimulation de ces 2 voies de signalisation ayant déjà été proposée pour expliquer les propriétés anti-angiogènes et/ou anti-métastatiques de la TSP-1<sup>831-833</sup>. L'inhibition de la tubulogénèse des ECFC par la TSP-1 quant à elle, pourrait être en rapport avec l'inhibition du système SDF-1/CXCR4, comme le montre la diminution des taux d'ARNm du SDF-1 et du CXCR4 lorsque les ECFC sont exposées à la TSP-1 recombinante (1 et 10 µg/mL). L'effet bimodal de la TSP-1 sur l'angiogénèse semble dépendre de la disponibilité de ses produits solubles de protéolyse (dont potentiellement le peptide A1), et du fait qu'ils soient sous forme libre dans le plasma ou liés aux protéines de la MEC et/ou aux protéoglycanes de type héparane sulfate<sup>830</sup>. Pour confirmer que les effets de la TSP-1 sur les ECFC sont au moins en partie dus à la voie du CD47, nous avons évalué les propriétés angiogènes *in vitro* des ECFC après inhibition du CD47 par un siRNA spécifique. Nous avons d'abord vérifié par CMF que ce siRNA-CD47 diminuait bien l'expression en surface du CD47 des ECFC. L'augmentation de l'adhésion des ECFC induite par la TSP-1 recombinante n'est pas modifiée par le siRNA-CD47. Par contre, nous avons observé la même augmentation de prolifération et de formation de pseudotubes en Matrigel® avec le siRNA-CD47 qu'avec le siRNA-TSP-1. Au total, la TSP-1 est donc capable d'augmenter les propriétés adhésives des ECFC, par sa partie N-terminale mais indépendamment du CD36, tout en diminuant leurs propriétés proliférative et tubulogénique, probablement par sa partie C-terminale liant le CD47 (effet bimodal de la TSP-1 sur l'angiogénèse). Ces 2 effets pourraient contribuer au phénotype vasculaire observé chez les patients artéritiques traités par injections de BM-MNC. Cependant, les propriétés adhésives de la TSP-1 ne sont pas suffisantes pour permettre aux ECFC de former des vaisseaux fonctionnels. En effet, chez les patients artéritiques recevant des BM-MNC, les structures vasculaires nouvellement formées sont désorganisées. Dans ce contexte, la TSP-1 contribuerait donc à aboutir à une néovascularisation inadéquate. L'amélioration des propriétés adhésives des ECFC par la TSP-1 pourrait être due à la TSP-1 elle-même, agissant en tant que molécule adhésive, ou via la stimulation de l'expression de molécules d'adhésion (« *Cell Adhesion Molecules* », CAM) à la surface des ECFC, de façon analogue à l'endothélium inflammatoire<sup>834</sup>. En effet, l'inflammation joue un rôle important en modulant l'expression et la redistribution des ces « CAM » au niveau de l'endothélium

lésé, permettant ainsi le recrutement et l'adhésion des monocytes, phénomène clé dans le processus athérogénique, notamment dans l'AMI.

De façon intéressante, chez nos 184 patients artéritiques de l'étude PALLAS, les taux plasmatiques du CD146 (MCAM, « *Melanoma Cell Adhesion Molecules* ») soluble (sCD146) sont significativement plus bas que chez les individus contrôles (données préliminaires) ; cela pourrait être la conséquence d'un engagement plus important du CD146 dans les jonctions intercellulaires, devenant alors moins accessible à la protéolyse. En effet, le CD146 est une molécule de jonction interendothéliale, impliquée dans la cohésion intercellulaire et la perméabilité. Nous avons également observé une plus forte expression du CD146 au niveau périvasculaire sur les biopsies de patients artéritiques ayant reçus des BM-MNC par rapport aux patients artéritiques témoins (données préliminaires), ce qui pourrait corroborer cette hypothèse. Cependant nous n'avons pas observé de corrélation statistique entre la diminution du taux plasmatique de sCD146 et l'augmentation du taux de TSP-1 chez les patients artéritiques, ni même entre les taux de sCD146 et ceux de VEGF ou PlGF (données préliminaires). Par contre il existe une corrélation inverse entre les taux de sCD146 et les taux de cholestérol HDL chez ces artéritiques. Nous avons également exploré l'expression du CD146 dans les ECFC transfectées avec le siRNA-TSP-1, sans retrouver de modifications significatives des taux d'ARNm de CD146, ni des taux de sCD146 dans les surnageants de culture de ces ECFC transfectées avec le siRNA-TSP-1 (données préliminaires). Cependant l'expression de la TSP-1 par les ECFC est significativement augmentée 3 jours après transfection par le siRNA-CD146 spécifique (données préliminaires). L'ensemble de ces données préliminaires laisse entrevoir un lien entre le CD146 et la TSP-1 au niveau des ECFC, une diminution du CD146 constituant un signal stimulant l'expression de la TSP-1 pour rétablir les propriétés adhésives des ECFC. Pour confirmer cette hypothèse il serait nécessaire d'analyser l'expression protéique de TSP-1 au niveau de lysats cellulaires d'ECFC transfectées avec le siRNA-CD146, ou le dosage de TSP-1 dans leur surnageant de culture.

**Article publié :**



# Thrombospondin-1 Is a Plasmatic Marker of Peripheral Arterial Disease That Modulates Endothelial Progenitor Cell Angiogenic Properties

David M. Smadja, Clément d'Audigier, Ivan Bièche, Solène Evrard, Laetitia Mauge, Juliana-Vieira Dias, Julien Labreuche, Ingrid Laurendeau, Bérengère Marsac, Blandine Dizier, Oriane Wagner-Ballon, Catherine Boisson-Vidal, Verônica Morandi, Jean-Paul Duong-Van-Huyen, Patrick Bruneval, Françoise Dignat-George, Joseph Emmerich, Pascale Gaussem

**Objective**—We examined whether plasma levels of angiogenic factors are altered in plasma of patients with peripheral arterial disease (PAD) and whether these factors affect endothelial progenitor cell-induced angiogenesis.

**Methods and Results**—Plasma was collected from 184 patients with PAD and 330 age-matched healthy controls. Vascular endothelial growth factor and placental growth factor concentrations did not differ between the groups, whereas we found a linear correlation between PAD disease and thrombospondin (TSP)-1 plasma level. TSP-1 was expressed in newly formed vessels in PAD patients having received local injections of bone marrow mononuclear cells. To analyze the functional role of TSP-1 during neoangiogenesis, we used a Matrigel-plug assay and showed that vascularization of implanted Matrigel-plugs was increased in *TSP-1*<sup>-/-</sup> mice. Moreover, injections of TSP-1 in C57Bl6/J mice after hindlimb ischemia induced a significant decrease of blood flow recovery. To investigate the effects of TSP-1 on human endothelial colony-forming cell (ECFC) angiogenic potential, recombinant human TSP-1 and a small interfering RNA were used. In vitro, TSP-1 N-terminal part significantly enhanced ECFC adhesion, whereas recombinant human TSP-1 had a negative effect on ECFC angiogenic potential. This effect, mediated by CD47 binding, modulated stromal cell-derived factor 1/CXC chemokine receptor 4 pathway.

**Conclusion**—TSP-1 is a potential biomarker of PAD and ECFC-induced angiogenesis, suggesting that TSP-1 modulation might improve local tissue ischemia in this setting. (Clinical trial registration: NCT00377897.) (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:551-559.)

**Key Words:** angiogenesis ■ arterial thrombosis ■ endothelial progenitor cells

Peripheral arterial disease (PAD), characterized by atherosclerosis of the lower extremities, affects up to 15% of people older than 55 years.<sup>1</sup> The main clinical manifestations of PAD are intermittent claudication and critical limb ischemia (CLI). Intermittent claudication is characterized by reproducible pain on exertion that is relieved by rest. CLI is the most severe form of PAD and is characterized by the inability of arterial blood flow to meet the metabolic demands of resting muscle or tissue, resulting in rest pain and/or tissue necrosis and frequently necessitating amputation. Currently, PAD diagnosis is based on the ankle-brachial systolic pressure index (ABI), but the ABI is a poor marker of PAD severity. There are no other reliable diagnostic tests for PAD, and new biomarkers would therefore be useful.

Atherosclerosis induces occlusion of the arterial tree and tissue hypoxia, which is a strong stimulus for angiogenesis. Collateral vessels develop physiologically in patients with CLI, mainly driven by an enhanced angiogenic response.<sup>2</sup> However, the capacity of this compensatory mechanism is rapidly exceeded, and normal flow is not restored. Autologous endothelial progenitor cells (EPCs) are candidates for angiogenic therapy. Because of their scarcity in human samples, EPCs have been characterized by culture methods. At least 2 populations of EPCs have been described.<sup>3</sup> “Early” EPCs appear within 4 to 7 days of culture, whereas “late” EPCs, also called endothelial colony-forming cells (ECFCs),<sup>4,5</sup> develop after 2 to 3 weeks and have the characteristics of precursor cells committed to the endothelial lineage. We have

Received on: February 26, 2010; final version accepted on: November 29, 2010.

From the Université Paris Descartes (D.M.S., C.d'A., I.B., S.E., L.M., I.L., B.M., J.-P.D.-V.-H., P.B., J.E., P.G.), Paris, France; INSERM UMRS 765 (D.M.S., C.d'A., S.E., L.M., J.-V.D., B.M., B.D., C.B.-V., J.E., P.G.), Paris, France; AP-HP (D.M.S., C.d'A., S.E., L.M., J.-P.D.-V.-H., P.B., J.E., P.G.), Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France; INSERM UMRS 745 (I.B., I.L.), Paris, France; Departamento de Biologia Celular (J.-V.D., V.M.), Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brazil; INSERM UMRS 698 (J.L.), Paris, France; INSERM UMRS 1009 (O.W.-B.), Paris, France; INSERM UMRS 872 (J.-P.D.-V.-H., P.B.), Paris, France; and INSERM UMRS 608 (F.D.-G.), Paris, France.

This manuscript was sent to Jane E. Freedman, Consulting Editor, for review by expert referees, editorial decision, and final disposition.

Correspondence to Dr David Smadja, Faculté of Pharmacie, 4 Avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France. E-mail david.smadja@egp.aphp.fr

© 2011 American Heart Association, Inc.

*Arterioscler Thromb Vasc Biol* is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.220624

previously shown, in amputation specimens from patients with CLI who had received local therapeutic injections of bone marrow mononuclear cells (BM-MNCs), that endothelial cells from newly formed vessels have an ECFC phenotype.<sup>6</sup> This is in keeping with results obtained with preclinical models showing that ECFCs are the cell type responsible for blood vessel formation.<sup>5</sup>

A number of angiogenic growth factors may modulate vascular growth and EPC angiogenic potential during PAD. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is probably one of the most important proangiogenic factors.<sup>7,8</sup> Elevated VEGF plasma levels were found in a study of 46 PAD patients.<sup>9</sup> Placental growth factor (PIGF), which is not required for normal embryonic vascular development, could also play a critical role in pathological angiogenesis.<sup>10</sup> Anti-angiogenic factors could likewise be involved in PAD. Thrombospondin (TSP)-1 has been found to be overexpressed in histological sections of human and mouse ischemic leg tissues.<sup>11,12</sup> However, plasma TSP-1 levels have not yet been measured in PAD patients.

Here, we compared concentrations of the circulating angiogenesis-related factors VEGF, PIGF, and TSP-1 in 184 PAD patients enrolled in the PALLAS clinical study<sup>13–15</sup> and in 330 paired healthy controls. Because TSP-1 levels were higher in the patients than in the controls, we further investigated the effect of TSP-1 on the ECFC angiogenic properties.

## Methods

### Study Population for Plasma Concentrations of VEGF, PIGF, and TSP-1

PAD patients (n=184) were enrolled in our vascular medicine department over a 2-year period. Patients were eligible if they were white men younger than 70 years with symptomatic atherosclerotic disease of the lower limbs and an ankle-brachial systolic pressure index (ABI) <0.90, or a history of surgical or endovascular revascularization, as previously reported.<sup>13–15</sup> Age-matched control subjects (n=330) with no history of arterial disease were randomly selected as described previously.<sup>16</sup>

### Local Injection of BM-MNCs in PAD Patients With CLI

The OPTIPEC clinical trial was a phase I nonrandomized study. Briefly, patients were eligible for the protocol if they had CLI associated with limited gangrene or a nonhealing ischemic ulcer and if they were not eligible for surgical revascularization or percutaneous angioplasty, or if such a procedure had little chance of success. The cell therapy protocol was similar to that initially published by Tateishi-Yuyama et al.<sup>17</sup>

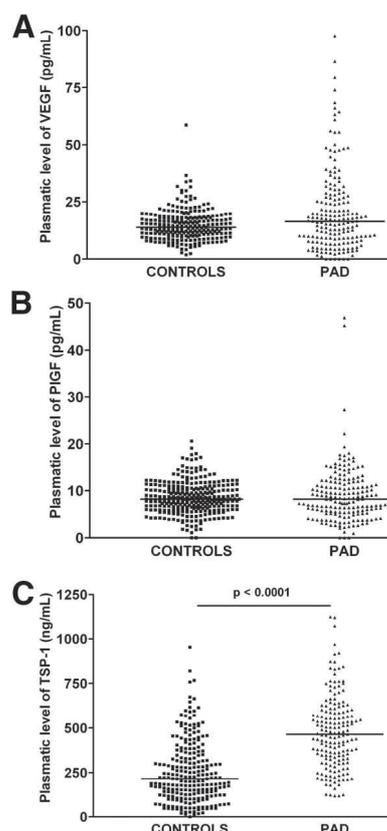
### ELISA Assays, ECFC Culture, In Vitro Angiogenesis Assays, In Vivo Matrigel-Plug Assay, and Hindlimb Ischemia Model

Experiments are described in detail in the online Data Supplement at <http://atvb.ahajournals.org>.

## Results

### Angiogenic-Related Factors in PAD

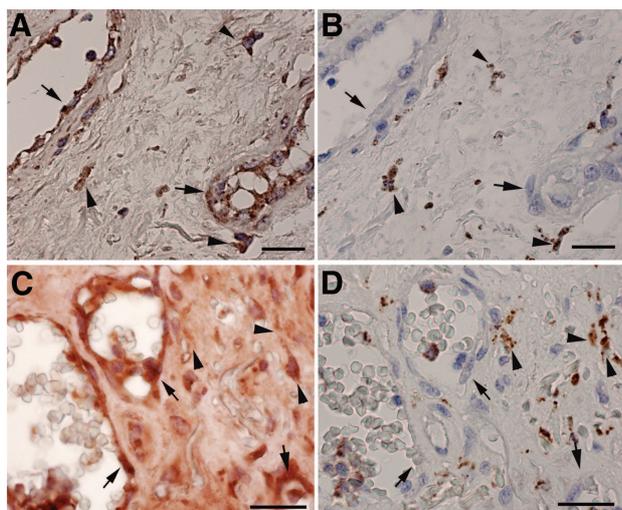
The baseline demographic and clinical characteristics of the study population are described elsewhere.<sup>13–15</sup> Briefly, smoking, hypertension, diabetes, serum lipids, lipid-lower therapy, and glucose level were significantly different between patients with



**Figure 1.** Plasmatic levels of TSP-1 are increased in patients with peripheral arterial disease. No significant difference in plasmatic levels of VEGF (A) or PIGF (B) was found between PAD patients and age-matched controls (n=330). PAD patients had higher TSP-1 levels (C) than controls.

PAD (n=184) and controls (n=330) (Table I in the online Data Supplement).

Plasma concentrations of VEGF, PIGF, and TSP-1 were determined in patients and controls. VEGF and PIGF levels did not significantly differ between cases and controls (Figure 1A and 1B), whereas TSP-1 levels were significantly higher in PAD patients (Figure 1C;  $P < 0.0001$ ). After categorization in tertiles of plasma levels of VEGF, PIGF, and TSP-1, we found a U-shaped relationship between PAD and VEGF or PIGF plasmatic levels (supplemental Table II). Indeed, we found that upper and lowest tertiles were associated with disease. Concerning TSP-1, we found a linear correlation between occurrence of PAD disease and TSP-1 plasma level. Similar results were found after adjustment for common PAD risk factors (hypertension, hypercholesterolemia, diabetes, and smoking status), lipid-lowering treatment, and C-reactive protein. We next assessed whether common PAD risk factors affected VEGF, PIGF, and TSP-1 concentration. VEGF and PIGF significantly correlated with C-reactive protein. In addition, PIGF correlated with age, hypertension, and antiplatelet therapy. TSP-1 plasmatic levels were not associated with clinical parameters (supplemental Table III). Whereas TSP-1 levels were associated with the occurrence of PAD, we found no significant difference in plasma levels of VEGF, PIGF, and TSP-1 according to disease severity (supplemental Table IV).



**Figure 2.** TSP-1 are expressed in newly formed vessels after cell therapy product in peripheral arterial disease. TSP-1 was expressed by endothelial cells (black arrows) and macrophages (black arrowheads) in amputation specimens from CLI patients treated (C) and untreated (A) with local injections of BM-MNCs. Scale bar=50  $\mu$ m. Macrophage CD68-positive cells are shown in serial sections of amputation specimens from CLI patients treated (D) and untreated (B) with local injections of BM-MNCs. Scale bar=50  $\mu$ m.

Taken together, these results suggest that TSP-1 plasma level is the only angiogenic factor among those tested that is linearly associated to PAD.

### TSP-1 Is Expressed by Endothelial Cells in Critical Leg Ischemia Patients and in Newly Formed Vessels After BM-MNC Therapy

TSP-1 expression was explored in distal tissues from amputated patients with CLI and also in patients treated with BM-MNCs for CLI in the OPTIPEC trial, in whom extensive neoangiogenesis was observed in distal tissues.<sup>2,6</sup> We performed serial sections of paraffin blocks prepared from patients who had amputation. Then, immunostaining for CD68 and TSP-1 was realized. TSP-1 was predominantly expressed in endothelial cells and macrophages regardless of the patient group, treated or not by the cell therapy product (Figure 2).

### TSP-1 Negatively Regulates Angiogenesis in Matrigel-Plug and Hindlimb Ischemia Models

To analyze the functional role of TSP-1 during neoangiogenesis, we used a Matrigel-plug assay in *TSP-1*<sup>-/-</sup> mice. Basic fibroblast growth factor-containing plugs were implanted subcutaneously in *TSP-1*<sup>-/-</sup> and C57Black6/J wild-type mice for 14 days. Plugs from *TSP-1*<sup>-/-</sup> animals (Figure 3A) had a higher blood vessel content than those from wild-type animals (Figure 3A). This was further confirmed by measuring the hemoglobin content of the plugs (Figure 3B; \**P*=0.01). We have also determined the effect of 10  $\mu$ g/mL TSP-1 added to the plugs implanted in wild-type and in *TSP-1*<sup>-/-</sup> mice. Figure 3C and 3D shows that TSP-1 induced a strong decrease in plug vascularization in both wild-type and *TSP-1*<sup>-/-</sup> mice (\**P*=0.017 and \**P*=0.016 respectively).

The hindlimb ischemia model in *TSP-1*<sup>-/-</sup> mice has been previously reported by Brechot et al,<sup>12</sup> who found that

*TSP-1*<sup>-/-</sup> mice were clinically and histologically protected from necrosis compared to wild-type controls. Tissue protection was associated with increased postischemic angiogenesis and muscle regeneration. In the present work, we have explored the effects of recombinant human TSP-1 in the model of hindlimb ischemia induced in C57Bl6/J mice by femoral artery and vein excision. As shown in Figure 3E and 3F, intramuscular injections of recombinant human TSP-1 induced a significant decrease in blood flow recovery 14 days after surgery (\**P*=0.04).

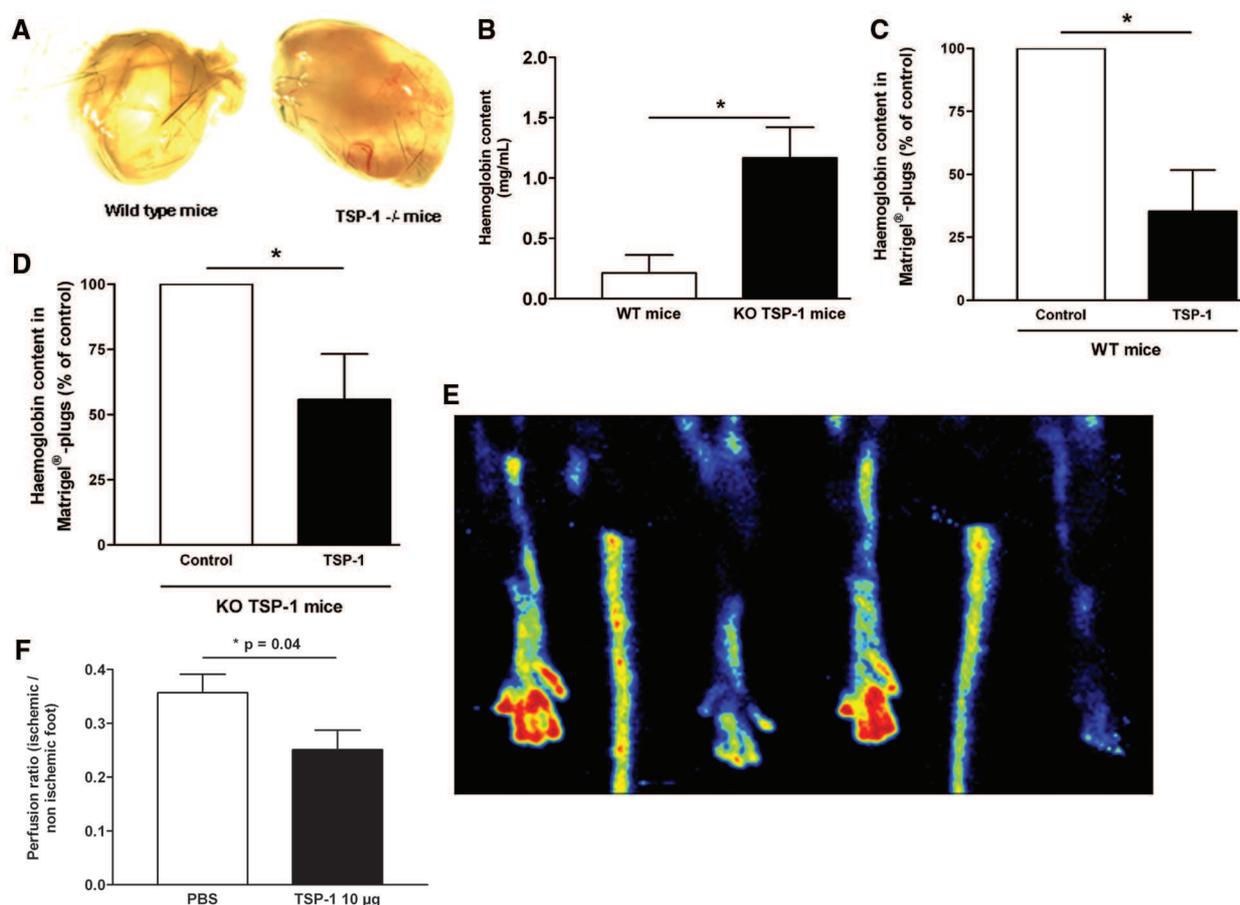
### TSP-1 Inhibition in ECFCs Induces a Proangiogenic Phenotype In Vitro and In Vivo

Because postnatal vasculogenesis is thought to involve EPCs,<sup>8</sup> and given the expression of TSP-1 found in newly formed vessels in human, we further explored whether TSP-1 inhibition was able to modulate ECFC angiogenic potential. We focused on ECFCs because this cell type is currently proposed as the cell type at the origin of newly formed vessels.<sup>5,6</sup> ECFCs express endothelial markers such as CD146, but they do not express leuko-monocytic markers such as CD14 and CD45. We found that ECFCs expressed a high surface density of the TSP receptor CD47, whereas no expression of CD36 was observed (supplemental Figure I).

We verified that TSP-1 mRNA and protein expression remained strongly inhibited by the specific small interfering (si)RNA during the days following transfection in cord and adult blood ECFCs (supplemental Figures II and IV). We then explored the effect of TSP-1 inhibition on the angiogenic properties of ECFCs in vitro. TSP-1 inhibition induced a strong increase in ECFC proliferation (Figure 4A; *P*<0.0001), associated with a 4-fold increase in the gene expression of the nuclear proliferation marker Ki67 (Figure 4B; *P*=0.03). TSP-1 inhibition also induced ECFCs to adopt a proangiogenic phenotype, as reflected by enhanced pseudotube formation in Matrigel (Figure 4C).

### TSP-1 Inhibition in ECFCs Upregulates Stromal Cell-Derived Factor 1/CXC Chemokine Receptor 4 Pathway

To examine the possible transcriptional effect of TSP-1 inhibition, we used real time-quantitative polymerase chain reaction to measure mRNA levels of several angiogenic factors and their receptors, including VEGFA, angiopoietin-2, stromal cell-derived factor (SDF)-1, and endothelial nitric oxide synthase. We also verified that TSP-1 inhibition did not modify TSP-2 expression. After 48 hours of transfection, TSP-1 inhibition resulted in a significant 2-fold increase in SDF-1 mRNA and a 4-fold increase in its receptor CXC chemokine receptor (CXCR)-4 mRNA (Figure 4D). Increased ECFC surface expression of CXCR4 was shown by flow cytometry (supplemental Figure III). This upregulation, first observed in cord blood-derived ECFCs, was also found in adult blood ECFCs, but not in human umbilical vein endothelial cells (supplemental Figure IVC). To explain the effect of TSP-1 inhibition on ECFC differentiation in pseudotubes and to explore the potential involvement of the SDF-1/CXCR4 pathway, we used 12G5, a monoclonal antibody recognizing an epitope located in the second extracellular loop of CXCR4 that we had previously used to reduce the angiogenic potential of ECFCs related to the



**Figure 3.** TSP-1 modifies Matrigel-plug vascularization in TSP-1 knockout mice and in wild-type mice. **A**, Matrigel-plugs containing basic fibroblast growth factor 750 ng/mL implanted in C57/Bl6/J wild-type mice and  $TSP-1^{-/-}$  mice. **B**, Hemoglobin quantification with the Drabkin method in Matrigel-plugs implanted in C57/Bl6/J wild-type and  $TSP-1^{-/-}$  mice. Values are expressed as means  $\pm$  SEM;  $n=10$  per group. **C**, Hemoglobin quantification in C57/Bl6/J wild-type mice, with and without additional recombinant TSP-1 at 10  $\mu$ g/mL in the plugs. Values are expressed as means  $\pm$  SEM;  $n=10$  per group. **D**, Hemoglobin quantification in Matrigel-plus implanted in C57/Bl6/J  $TSP-1^{-/-}$  mice, with and without additional recombinant TSP-1 at 10  $\mu$ g/mL in the plugs. Values are expressed as means  $\pm$  SEM;  $n=10$  per group. **E**, Laser Doppler perfusion imaging at day 14 in the C57Bl6/J mouse hindlimb ischemia model. Left, Mouse receiving 20  $\mu$ L of PBS per day by intramuscular injections during 5 days. Right, Mouse receiving 10  $\mu$ g of recombinant human TSP-1 per day, in 20- $\mu$ L intramuscular injections, during 5 days. **F**, Perfusion ratio means for the C57Bl6/J mouse hindlimb ischemia model.  $P=0.04$ ;  $n=10$  for each group.

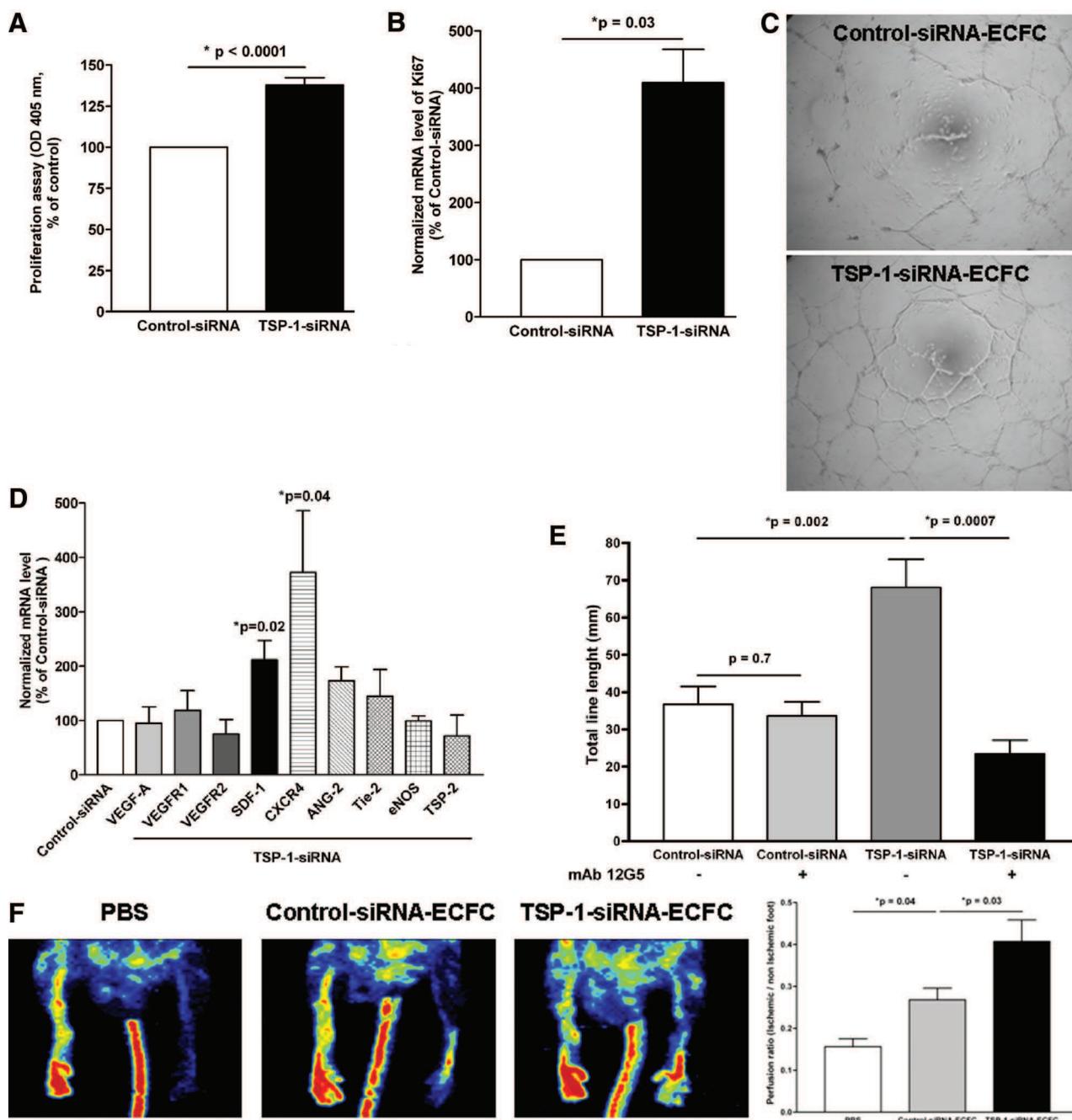
SDF-1/CXCR4 pathway.<sup>18</sup> The increase in Matrigel tube formation induced by TSP-1 inhibition was abrogated by monoclonal antibody 12G5 ( $P=0.0007$ ; Figure 4E). Finally, we tested TSP-1-inhibited ECFCs in a nude mouse model of hindlimb ischemia. ECFCs transfected with TSP-1 siRNA or control siRNA were intravenously injected into nude mice, 6 hours after femoral artery ligation. On day 7, foot perfusion was improved significantly more by TSP-1-inhibited ECFCs than by control ECFCs ( $P=0.03$ ; Figure 4F).

#### TSP-1 N-Terminus Mediates ECFC Adhesion

We chose to test the effect of recombinant human TSP-1 on ECFC angiogenic properties. In keeping with reports that TSP-1 acts as an adhesion molecule, ECFC adhesion was significantly enhanced by recombinant human TSP-1 (Figure 5A). TSP-1 N-terminus has been described to be responsible for proangiogenic function of TSP-1. We thus compared the effect of TSP-1 to that of A1 peptide (TSP Hep I), a short peptide derived from the N-terminal part of TSP-1.<sup>19,20</sup> A1 peptide induced a strong increase in ECFC adhesion, similar to that observed with TSP-1 (Figure 5A).

#### TSP-1 Decreases ECFC Proliferation and Pseudotube Formation by an N-Terminal-Independent Mechanism

To examine TSP-1-proliferative effect, ECFCs were plated in the presence or in the absence of precoated TSP-1 or A1 peptide. As shown in Figure 5B, TSP-1 significantly reduced ECFC proliferation, whereas no effect was observed with A1 peptide. TSP-1 inhibitory effect on proliferation could be explained in part by an increase of apoptotic protein p53 and FasL transcription after TSP-1 incubation (supplemental Figure V). The upregulation of these 2 pathways was previously proposed to explain antiangiogenic and/or antimetastatic properties of TSP-1.<sup>21–23</sup> In an in vitro Matrigel model, an increase in pseudotube formation was observed with A1 peptide (Figure 5C and supplemental Figure VII), whereas TSP-1 significantly inhibited ECFC organization into branched structures and pseudotubes. This effect was further attributed to a downregulation of SDF-1 and CXCR4 (supplemental Figure VI).

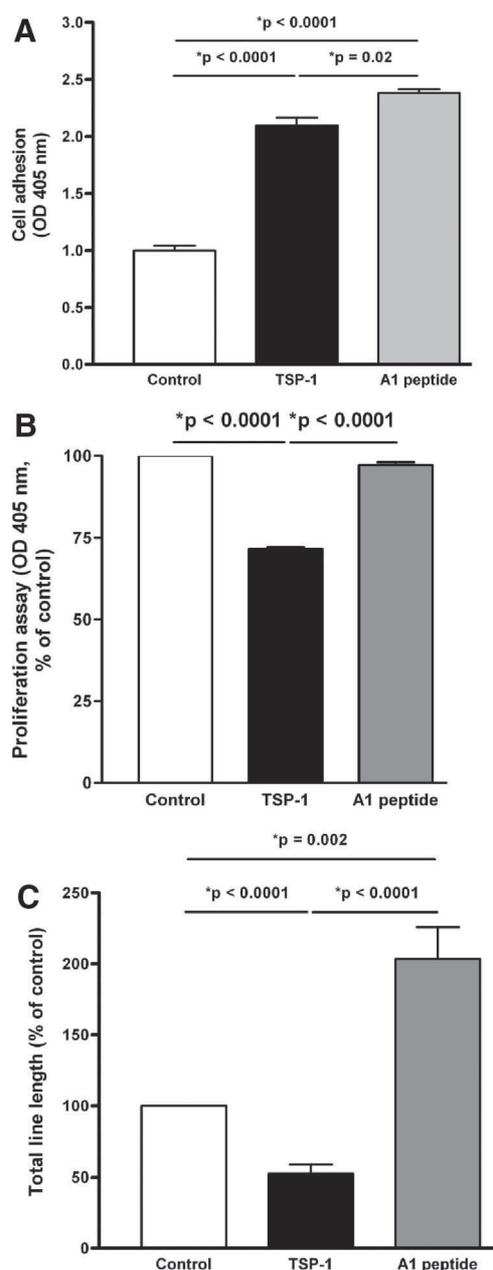


**Figure 4.** Inhibition of TSP-1 in ECFCs increases their angiogenic potential in vitro and in vivo. **A**, Inhibition of TSP-1 with siRNA promotes ECFC proliferation. The effect of TSP-1 siRNA on ECFC proliferation was evaluated by measuring the release of the paranitrophenol (pNP) (optical density [OD] at 405 nm) in EBM2 medium containing 5% FBS (mean  $\pm$  SEM) ( $P < 0.001$ ). **B**, Quantitative analysis of the proliferative nuclear antigen Ki67 mRNA by real time-quantitative polymerase chain reaction, after 72 hours of transfection with control siRNA (AllStars Negative Control; Qiagen) or TSP-1 siRNA (Santa Cruz Biotechnology). The mean and SEM of 3 experiments are shown ( $P = 0.03$ ). **C**, siRNA-transfected ECFCs ( $3 \times 10^4$ ) were seeded on Matrigel, and tube formation was measured by phase-contrast microscopy. **D**, Effect of TSP-1 inhibition with siRNA on the mRNA levels of VEGF, angiopoietin-2, and SDF-1 and their receptors. Values are expressed as means  $\pm$  SEM and are the result of 3 independent experiments. **E**, Inhibition of pseudotube formation in response to TSP-1 inhibition with siRNA in ECFCs by monoclonal antibody 12G5. The mean and SEM of 3 experiments are shown. Quantitative analysis of network length was determined with Videomet software (Microvision). Values are expressed as means  $\pm$  SEM and are the result of 3 independent experiments. **F**, Inhibition of TSP-1 in ECFCs increases their proangiogenic potential in hindlimb ischemia. Representative photomicrographs and quantitative evaluation of foot perfusion in mice injected with PBS or control siRNA- or TSP-1 siRNA-transfected ECFCs. Values are means  $\pm$  SEM;  $n = 10$  per group.

**CD47 Inhibition in ECFCs Induces the Same Proangiogenic Phenotype As TSP-1 Inhibition**

The differences observed between TSP-1 pro- and antiangiogenic properties are probably the result of an imbalance

between the proadhesive effect of the TSP-1 N-terminal part and another mechanism involving TSP-1 receptors. Because CD36 was not found on ECFCs, such as described previously in human umbilical vein endothelial cells (supplemental



**Figure 5.** Recombinant human TSP-1 increases ECFC adhesion by its N-terminal extremity. A, Adhesion assays were performed in 24-well polystyrene plates (Becton-Dickinson) with or without recombinant TSP-1 or A1 peptide at 10  $\mu$ g/mL. After incubation for 20 minutes, nonadherent cells were discarded, and the number of adherent cells was determined measuring the release of pNP (OD at 405 nm). Each data point is the average of 3 wells, and each experiment was performed at least 3 times. B, Proliferation assays were performed in 24-well plates with or without TSP-1 or A1 peptide at 10  $\mu$ g/mL. After 72 hours, nonadherent cells were washed off, and the number of adherent cells was determined by measuring the release of pNP (OD at 405 nm). Each data point is the average of 3 wells, and each experiment was performed at least 3 times. C, ECFCs are plated in an 18-hour Matrigel tubule-formation assay, with or without TSP-1 or A1 peptide at 10  $\mu$ g/mL. Quantitative analysis of network length was determined with Videomet software (Microvision). The mean and SEM of 3 experiments are shown.

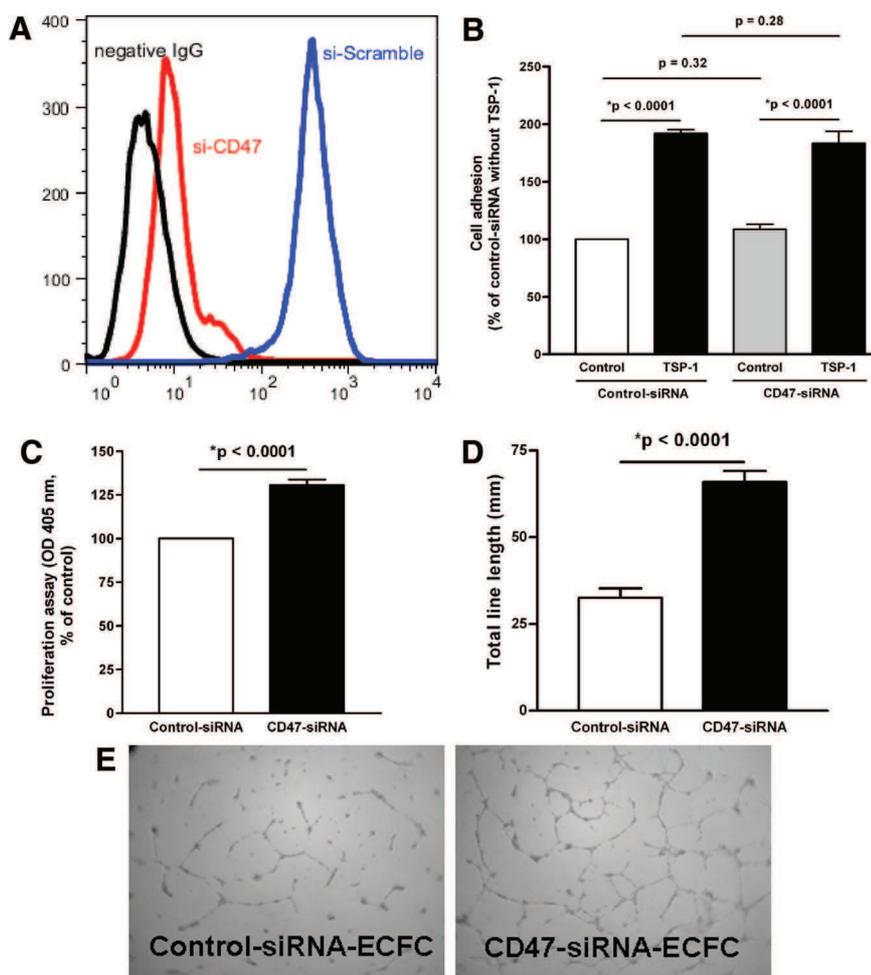
Figure I),<sup>24</sup> we inhibited CD47 gene expression in ECFCs. CD47 protein expression is strongly inhibited by the CD47 siRNA (Figure 6A). We explored the effect of CD47 inhibition on the angiogenic properties of ECFCs in vitro. ECFC adhesion was not modified by recombinant human TSP-1 between control siRNA- and CD47 siRNA-transfected ECFCs (Figure 6B). However, as for TSP-1 inhibition, CD47 siRNA induced a significant increase in ECFC proliferation (Figure 6C;  $P < 0.0001$ ) and pseudotube formation (Figure 6D and 6E;  $P < 0.0001$ ).

## Discussion

Our findings suggest that the balance between angiogenic and antiangiogenic factors are altered in peripheral artery disease and that TSP-1 is associated with a loss of EPC angiogenic potential.

Plasma concentrations of TSP-1 in 184 patients with PAD were significantly higher than in controls, and we found a linear correlation along the different tertiles between PAD and TSP-1 plasma level. The increased TSP-1 plasma concentrations observed here may reflect an overexpression by ischemic tissues, as previously reported for cultured endothelial cells subjected to hypoxia.<sup>25</sup> In line with this hypothesis, Favier et al previously showed by in situ hybridization an absence of TSP-1 labeling in control muscles by comparison to ischemic tissues of PAD patients and an intense TSP-1 labeling in the ischemic samples.<sup>11</sup> Moreover, we found that newly formed vessels in patients treated with BM-MNCs were positive for TSP-1, pointing to an autocrine in situ effect during neoangiogenesis. However, it would be overstated to give any further conclusion about the role of TSP-1 in vessel function. Our aim was to discover an angiogenic biomarker potentially detectable in PAD patient plasma and to correlate it with the neoangiogenesis process in patients treated with a cell therapy product. One explanation is that treated patients who had to receive amputations had a neoangiogenic process inefficient to allow the vessel salvage. In this case, TSP-1 expression could represent a signal to prevent neoangiogenesis.

TSP-1 and TSP-2 are very similar structurally and functionally; both have been implicated as inhibitors of angiogenesis, endothelial cell survival, and endothelial cell migration.<sup>26</sup> Loss of TSP-1 or TSP-2 during embryonic development is not lethal but results in increased vascular density.<sup>27,28</sup> Double knockout for TSP-1 and -2 were shown to modulate proangiogenic activity of thrombopoietic cells.<sup>29</sup> However, because of contradictive results about TSP-2 implication in ischemic injury response, we focused our work on TSP-1.<sup>30</sup> TSP-1 is a heterogeneous molecule in terms of its cellular origin and functions, different parts of the molecule showing either pro- or antiangiogenic properties. Platelets may be an important source of circulating TSP-1 in PAD patients. Indeed, TSP-1 is stored in  $\alpha$ -granules and is released during platelet activation, an important phenomenon in PAD underlined by the efficacy of antiplatelet agents in this setting. During various pathological situations, and according to thrombin concentration level, platelets have been shown to release either their  $\alpha$ -granule-containing angiogenic factors or those containing antiangiogenic molecules<sup>31</sup> or soluble CD40 ligand.<sup>32</sup> Moreover, activated platelets<sup>33,34</sup> or their



**Figure 6.** Inhibition of CD47 in ECFCs increases their angiogenic potential in vitro. **A**, Flow cytometry. CD47 siRNA decreased expression of CD47 on ECFCs. **B**, Adhesion assays were performed as described for Figure 5A, on control siRNA and CD47 siRNA, with or without recombinant TSP-1 at 10  $\mu$ g/mL. No difference was observed on TSP-1 condition, for control siRNA- and CD47 siRNA-transfected ECFCs. **C**, CD47 siRNA promoted ECFC proliferation. The effect of CD47 siRNA on ECFC proliferation was evaluated by measuring the release of pNP (OD at 405 nm) in EBM2 medium containing 5% FBS (mean  $\pm$  SEM) ( $P < 0.0001$ ). **D** and **E**, Transfected ECFCs ( $3 \times 10^4$ ) were seeded on Matrigel, and tube formation was measured by phase-contrast microscopy. Quantitative analysis of network length was determined with Videomet software (Microvision). The mean and SEM of 3 experiments are shown ( $P < 0.0001$ ).

derived microparticles<sup>35</sup> have been shown to promote recruitment, differentiation, and/or angiogenic potential of progenitor cells, including also transfer of membrane receptors such as CXCR4.<sup>35</sup> The role of TSP-1 in CLI has been explored in TSP-1 knockout mice, in which macrophages infiltrating ischemic tissues were found to have a less proinflammatory phenotype than those in wild-type mice. TSP-1 knockout led to enhanced tissue regeneration and prevented necrosis.<sup>12</sup>

We investigated in vitro and in vivo the effect of TSP-1 on the angiogenic properties of cultured ECFCs, cells known to be involved in neovascularization process. Interestingly, we found that TSP-1 had a double-edged effect on ECFCs, enhancing ECFC adhesion probably mediated by its N-terminal part, while reducing their proliferation and differentiation in pseudotubes, probably a consequence of TSP-1 binding to CD47. These 2 effects could contribute to the vessel phenotype in patients treated with BM-MNCs. TSP-1 is expressed in PAD ischemic tissues, to which it is thought to attract progenitor cells. Indeed, TSP-1 enhances the expression of adhesion molecules,<sup>36</sup> and can also act via proteoglycans. TSP-1 also binds to CD36 and/or CD47, that have important roles in cell migration, proliferation or apoptosis.<sup>37</sup> It has also been suggested that TSP-1 blocks the activation of matrix metalloproteinases such as matrix metalloproteinase 9, and thereby prevents the release of VEGF protein from extracellular stores.<sup>38</sup> ECFCs were negative for

CD36, whereas a strong expression of CD47 was observed. CD47 inhibition in ECFCs gave the same proangiogenic phenotype than TSP-1 inhibition. These results are in line with those from several studies that propose CD47 as a target to improve ischemia caused by aging or PAD.<sup>37</sup>

However, adhesive properties of TSP-1 did not allow EPCs to form viable and normal vessels in patients with CLI who had received BM-MNCs. Indeed, newly formed vessels showed disorganized structures. In diabetic mice, TSP-1 mRNA expression by EPCs is significantly upregulated, whereas EPC angiogenic properties are downregulated in vitro and in vivo.<sup>39</sup> We found that TSP-1 inhibition enhanced the ECFC angiogenic potential both in vitro and in vivo and that increased differentiation in pseudotubes could be attributed to SDF-1/CXCR4 pathway upregulation. In line with these observations, we show that vascularization of implanted Matrigel-plugs was significantly more efficient in *TSP-1*<sup>-/-</sup> mice than in their wild-type counterparts.

TSP-1 could potentially serve as a therapeutic target in PAD patients. The antiangiogenic effects of TSP-1 are classically attributed to the C-terminal domain, whereas its proangiogenic effects are attributed to its N-terminal domain.<sup>20</sup> Peptides mimicking different parts of the TSP-1 molecule<sup>20</sup> might modulate angiogenesis in PAD or be used to prime EPC or BM-MNC products, as reported with SDF-1.<sup>40</sup> Moreover, the SDF-1/CXCR4 pathway upregula-

tion observed here after TSP-1 inhibition suggests that *TSP-1* gene suppression could be used to produce an ECFC-based cell product effective in PAD. In addition, such an approach might be used to prevent restenosis after arterial interventions in diabetic patients. Alternately, pharmacological TSP-1 modulation in vivo might be beneficial in PAD.<sup>12</sup> TSP-1 has also been reported to modulate blood flow in elderly subjects and in patients with atherosclerosis, by modifying NO levels.<sup>41</sup> Drugs targeting TSP-1 might restore blood flow, enhance tissue healing, improve surgical outcomes, and reverse age-related vascular changes.<sup>41</sup>

In conclusion, the increased plasma levels of TSP-1 found in PAD patients might contribute to the inadequate neovascularization observed in this setting. TSP-1 targeting ex vivo or in vivo might have the potential to modulate angiogenesis.

### Acknowledgments

We thank Chantal Martin and all technicians from the animal facility of Institut Medicament-Toxicologie-Chimie-Environnement. We are indebted to the nursing services of Hôpital des Diaconesses (Paris) and Begin (Saint Mandé) for providing umbilical cord blood samples, and Dr Luiz Juliano for providing N-terminal domain of TSP-1. We thank Dr Jean-Luc Reny for patient inclusion in PALLAS study.

### Sources of Funding

C.d'A. was supported by Fondation pour la Recherche Médicale. J.-V.D. received grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil) and from Comissao de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Centre National de la Recherche Scientifique pays the salary of C.B.-V. This work was supported by research grants from the Leduq TransAtlantic Network of Excellence, AP-HP PHRC Optipex (03-034), INSERM, and CAPES (Ministry for Education, Brazil)/COFECUB (France) (629/09).

### Disclosures

None.

### References

- Hiatt WR. Medical treatment of peripheral arterial disease and claudication. *N Engl J Med*. 2001;344:1608–1621.
- Van Huyen JP, Smadja DM, Bruneval P, Gaussem P, Dal-Cortivo L, Julia P, Fiessinger JN, 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.
- Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, Oh BH, Lee MM, Park YB. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:288–293.
- Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, Pollok K, Ferkowicz MJ, Gilley D, Yoder MC. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*. 2004;104:2752–2760.
- Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, Krasich R, Temm CJ, Prchal JT, Ingram DA. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*. 2007;109:1801–1809.
- Smadja DM, Bieche I, Silvestre JS, Germain S, Cornet A, Laurendeau I, Duong-Van-Huyen JP, 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*. 2008;28:2137–2143.
- Smadja DM, Bieche 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*. 2007;11:1149–1161.
- Smadja DM, Cornet A, Emmerich J, Aiach M, Gaussem P. Endothelial progenitor cells: characterization, in vitro expansion, and prospects for autologous cell therapy. *Cell Biol Toxicol*. 2007;23:223–239.
- Findley CM, Mitchell RG, Duscha BD, Annex BH, Kontos CD. Plasma levels of soluble Tie2 and vascular endothelial growth factor distinguish critical limb ischemia from intermittent claudication in patients with peripheral arterial disease. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:387–393.
- Autiero M, Luttun A, Tjwa M, Carmeliet P. Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. *J Thromb Haemost*. 2003;1:1356–1370.
- Favier J, Germain S, Emmerich J, Corvol P, Gasc JM. Critical overexpression of thrombospondin 1 in chronic leg ischaemia. *J Pathol*. 2005;207:358–366.
- Brechot N, Gomez E, Bignon M, Khallou-Laschet J, Dussiot M, Cazes A, Alanio-Brechot C, Durand M, Philippe J, Silvestre JS, Van Rooijen N, Corvol P, Nicoletti A, Chazaud B, Germain S. Modulation of macrophage activation state protects tissue from necrosis during critical limb ischemia in thrombospondin-1-deficient mice. *PLoS One*. 2008;3:e3950.
- Reny JL, Alhenc-Gelas M, Fontana P, Bissery A, Julia PL, Fiessinger JN, Aiach M, Emmerich J. The factor II G20210A gene polymorphism, but not factor V Arg506Gln, is associated with peripheral arterial disease: results of a case-control study. *J Thromb Haemost*. 2004;2:1334–1340.
- Smadja DM, Lorient MA, Hindorff LA, Mellottee L, Gaussem P, Emmerich J. No clear link between VKORC1 genetic polymorphism and the risk of venous thrombosis or peripheral arterial disease. *Thromb Haemost*. 2008;99:970–972.
- Fontana P, Gaussem P, Aiach M, Fiessinger JN, Emmerich J, Reny JL. P2Y12 H2 haplotype is associated with peripheral arterial disease: a case-control study. *Circulation*. 2003;108:2971–2973.
- Arnaud E, Nicaud V, Poirier O, Rendu F, Alhenc-Gelas M, Fiessinger JN, Emmerich J, Aiach M. Protective effect of a thrombin receptor (protease-activated receptor 1) gene polymorphism toward venous thromboembolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:585–592.
- 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.
- Smadja DM, Bieche 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. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:2321–2327.
- Murphy-Ullrich JE, Gurusiddappa S, Frazier WA, Hook M. Heparin-binding peptides from thrombospondins 1 and 2 contain focal adhesion-labilizing activity. *J Biol Chem*. 1993;268:26784–26789.
- Nunes SS, Outeiro-Bernstein MA, Juliano L, Vardiero F, Nader HB, Woods A, Legrand C, Morandi V. Syndecan-4 contributes to endothelial tubulogenesis through interactions with two motifs inside the pro-angiogenic N-terminal domain of thrombospondin-1. *J Cell Physiol*. 2008;214:828–837.
- Volpert OV, Zaichuk T, Zhou W, Reiher F, Ferguson TA, Stuart PM, Amin M, Bouck NP. Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. *Nat Med*. 2002;8:349–357.
- Kang SY, Halvorsen OJ, Gravdal K, Bhattacharya N, Lee JM, Liu NW, Johnston BT, Johnston AB, Haukaas SA, Aamodt K, Yoo S, Akslen LA, Watnick RS. Prosaposin inhibits tumor metastasis via paracrine and endocrine stimulation of stromal p53 and Tsp-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:12115–12120.
- Zak S, Treven J, Nash N, Gutierrez LS. Lack of thrombospondin-1 increases angiogenesis in a model of chronic inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis*. 2008;23:297–304.
- Short SM, Derrien A, Narsimhan RP, Lawler J, Ingber DE, Zetter BR. Inhibition of endothelial cell migration by thrombospondin-1 type-1 repeats is mediated by beta1 integrins. *J Cell Biol*. 2005;168:643–653.
- Phelan MW, Forman LW, Perrine SP, Faller DV. Hypoxia increases thrombospondin-1 transcript and protein in cultured endothelial cells. *J Lab Clin Med*. 1998;132:519–529.
- Armstrong LC, Bornstein P. Thrombospondins 1 and 2 function as inhibitors of angiogenesis. *Matrix Biol*. 2003;22:63–71.
- Kyriakides TR, Zhu YH, Smith LT, Bain SD, Yang Z, Lin MT, Danielson KG, Iozzo RV, LaMarca M, McKinney CE, Ginns EI, Bornstein P. Mice

- that lack thrombospondin 2 display connective tissue abnormalities that are associated with disordered collagen fibrillogenesis, an increased vascular density, and a bleeding diathesis. *J Cell Biol.* 1998;140:419–430.
28. Wang S, Wu Z, Sorenson CM, Lawler J, Sheibani N. Thrombospondin-1-deficient mice exhibit increased vascular density during retinal vascular development and are less sensitive to hyperoxia-mediated vessel obliteration. *Dev Dyn.* 2003;228:630–642.
  29. Kopp HG, Hooper AT, Broekman MJ, Vecilla ST, Petit I, Luo M, Milde T, Ramos CA, Zhang F, Kopp T, Bornstein P, Jin DK, Marcus AJ, Rafii S. Thrombospondins deployed by thrombopoietic cells determine angiogenic switch and extent of revascularization. *J Clin Invest.* 2006;116:3277–3291.
  30. Isenberg JS, Annis DS, Pendrak ML, Ptaszynska M, Frazier WA, Mosher DF, Roberts DD. Differential interactions of thrombospondin-1, -2, and -4 with CD47 and effects on cGMP signaling and ischemic injury responses. *J Biol Chem.* 2009;284:1116–1125.
  31. Italiano JE Jr, Richardson JL, Patel-Hett S, Battinelli E, Zaslavsky A, Short S, Ryeom S, Folkman J, Klement GL. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood.* 2008;111:1227–1233.
  32. Hristov M, Gumbel D, Lutgens E, Zerneck A, Weber C. Soluble CD40 ligand impairs the function of peripheral blood angiogenic outgrowth cells and increases neointimal formation after arterial injury. *Circulation.* 2010;121:315–324.
  33. Massberg S, Konrad I, Schurzinger K, Lorenz M, Schneider S, Zohnhoefer D, Hoppe K, Schiemann M, Kennerknecht E, Sauer S, Schulz C, Kerstan S, Rudelius M, Seidl S, Sorge F, Langer H, Peluso M, Goyal P, Vestweber D, Emambokus NR, Busch DH, Frampton J, Gawaz M. Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *J Exp Med.* 2006;203:1221–1233.
  34. de Boer HC, Verseyden C, Ulfman LH, Zwaginga JJ, Bot I, Biessen EA, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ. Fibrin and activated platelets cooperatively guide stem cells to a vascular injury and promote differentiation towards an endothelial cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:1653–1659.
  35. Mause SF, Ritzel E, Liehn EA, Hristov M, Bidzhekov K, Muller-Newen G, Soehnlein O, Weber C. Platelet microparticles enhance the vasoregenerative potential of angiogenic early outgrowth cells after vascular injury. *Circulation.* 2010;122:495–506.
  36. Narizhneva NV, Razorenova OV, Podrez EA, Chen J, Chandrasekharan UM, DiCorleto PE, Plow EF, Topol EJ, Byzova TV. Thrombospondin-1 up-regulates expression of cell adhesion molecules and promotes monocyte binding to endothelium. *FASEB J.* 2005;19:1158–1160.
  37. Isenberg JS, Frazier WA, Krishna MC, Wink DA, Roberts DD. Enhancing cardiovascular dynamics by inhibition of thrombospondin-1/CD47 signaling. *Curr Drug Targets.* 2008;9:833–841.
  38. Rodriguez-Manzaneque JC, Lane TF, Ortega MA, Hynes RO, Lawler J, Iruela-Arispe ML. Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:12485–12490.
  39. Ii M, Takenaka H, Asai J, Ibusuki K, Mizukami Y, Maruyama K, Yoon YS, Wecker A, Luedemann C, Eaton E, Silver M, Thorne T, Losordo DW. Endothelial progenitor thrombospondin-1 mediates diabetes-induced delay in reendothelialization following arterial injury. *Circ Res.* 2006;98:697–704.
  40. Zemani F, Silvestre JS, Fauvel-Lafeve F, Bruel A, Vilar J, Bieche I, Laurendeau I, Galy-Fauroux I, Fischer AM, Boisson-Vidal C. Ex vivo priming of endothelial progenitor cells with SDF-1 before transplantation could increase their proangiogenic potential. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:644–650.
  41. Isenberg JS, Hyodo F, Pappan LK, Abu-Asab M, Tsokos M, Krishna MC, Frazier WA, Roberts DD. Blocking thrombospondin-1/CD47 signaling alleviates deleterious effects of aging on tissue responses to ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:2582–2588.

## **Thrombospondin-1 is a plasmatic marker of peripheral arterial disease that modulates endothelial progenitor cell angiogenic properties**

David M. Smadja et al. Supplementary data

---

### **Study population**

Consecutive PAD patients (n = 184) were enrolled in our vascular medicine department over a 2-years period. Patients were eligible if they were Caucasian men under 70 years of age with symptomatic atherosclerotic disease of the lower limbs and an ankle-brachial systolic pressure index (ABI) < 0.90, or a history of surgical or endovascular revascularization, as previously reported<sup>1-3</sup>. They were excluded if they had non-atherosclerotic causes of PAD (cardioembolic disease, thromboangiitis obliterans, vasculitis, or congenital or metabolic vascular disease). Critical leg ischemia (CLI) was defined by pain at rest or non healing ulceration (> 2 weeks) plus an ankle systolic blood pressure below 50 mm Hg. Walking distance was defined as the maximum walking distance reported by the patient before stopping because of claudication. Smoking, hypertension and diabetes were significantly more frequent in the cases than in the controls. Cases were five times more likely to be on lipid-lowering drugs; as a result, they had lower total and LDL-cholesterol levels than the controls. Triglyceride levels were higher and HDL-cholesterol levels were lower in the cases. Interestingly, the cases had a lower mean body mass index (BMI), together with a lower hematocrit, a lower plasma protein concentration, and higher leukocyte and platelet counts. Renal function, based on serum creatinine levels, was similar in the two groups. Age-matched control subjects (n = 330) with no history of arterial disease (stroke, MI, angina, or PAD) were randomly selected among 703 Caucasian men composing a previously described control group used to study genetic risk factors for vascular thrombosis<sup>4</sup>. They were recruited in a

healthcare center specializing in cardiovascular prevention, to which they had been referred for a routine check-up. All participants gave their written informed consent and the study protocol was approved by the Paris-HEGP -Broussais ethics committee.

### **Blood collection**

Blood samples were collected in Vacutainer tubes (Becton-Dickinson Diagnostics, Le Pont-de-Claix, France) containing 0.105 M sodium citrate (1 vol/9 vol). Plasma was obtained by centrifugation at 2300 g for 10 minutes and was immediately stored at - 80°C until analysis.

### **Local injection of bone marrow mononuclear cells (BM-MNC) in PAD patients with CLI**

The OPTIPEC clinical trial (Optimization of Progenitor Endothelial Cells in the Treatment of Critical Leg Ischemia; *clinicaltrials.gov*: NCT00377897) was a multicenter, phase I non randomized study. The clinical findings have been published elsewhere <sup>5</sup>. Briefly, patients were eligible for the protocol if they had CLI associated with limited gangrene or a non healing ischemic ulcer and if they were not eligible for surgical revascularization or percutaneous angioplasty, or if such a procedure had little chance of success. The cell therapy protocol was similar to that initially published by Tateishi-Yuyama et al <sup>6</sup>. Control histological sections were obtained from age- and sex-matched patients with critical limb ischemia who were not included in the cell therapy protocol and who were amputated during the same period.

### **ELISA Assays**

Plasma levels of VEGF, PlGF and TSP-1 were measured with enzyme-linked immunosorbent kits from R&D Systems<sup>®</sup> (Minneapolis, MN, USA).

### **ECFC culture, *in vitro* angiogenesis assays, and *in vivo* Matrigel-plug assay**

ECFC culture, *in vitro* angiogenesis assay and *in vivo* Matrigel-plug assay conditions have been described in detail elsewhere.<sup>7-12</sup> *TSP1*<sup>-/-</sup> mice, in which the *TSP-1* gene was disrupted by homologous recombination<sup>13</sup>, were kindly provided by Dr. A Bonnefoy<sup>14</sup>. For this study the *TSP-1* gene deficiency was bred into a C57Bl6/J background.

A1 peptide (TSP Hep I<sup>15</sup>) derived from N-terminus of TSP-1 was synthesized in the Department of biophysics at UNIFESP ((Federal University of São Paulo, Escola Paulista de Medicina), using an automated bench-top simultaneous multiple solidphase peptide synthesizer (PSSM 8 System; Shimadzu, Tokyo, Japan).

### **ECFC transfection with siRNA against TSP-1**

Short interfering RNA silencing *TSP-1* gene expression (sc-36665, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) was mixed with the Primefect<sup>®</sup> reagent (LONZA) at 10 µM to obtain transfection complexes, which were added to 2x10<sup>5</sup> ECFC in complete EGM2 medium in 6-well plates. Control siRNA (Allstars Neg. control siRNA, Qiagen, Cambridge, MA, USA) was used in parallel.

### **Real-Time - quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)**

The theoretical and practical aspects of RT-qPCR on the ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems) are described in detail elsewhere<sup>10</sup>. Rapidly, we quantified transcripts of the TBP gene, which encodes the TATA box-binding protein (a component of the DNA-binding protein complex TFIID) as the endogenous RNA control, and target gene expression was normalized on the basis of its TBP content. Primers for TBP and the target genes (sequences available on request) were chosen with the assistance of Oligo 5.0 software (National Biosciences, Plymouth, MN, USA).

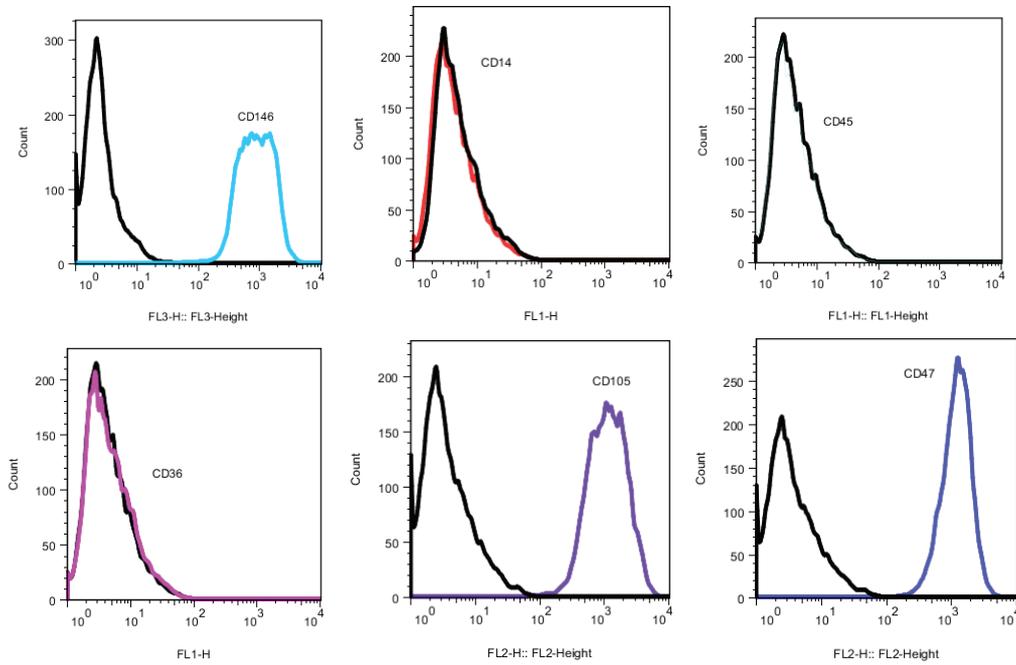
### **Hindlimb ischemia model.**

Nude mice underwent surgery to induce unilateral hindlimb ischemia as previously described<sup>16</sup> and were then randomly allocated to intravenous injection of ECFC that had been transfected with control or TSP-1 siRNA. After 1 week, the ischemic/normal limb blood flow ratio was determined by using a laser Doppler perfusion imaging system (Moor instruments). C57Bl6/J mice underwent surgery to induce unilateral hindlimb ischemia left femoral artery and vein ligation and excision. Laser Doppler Perfusion Imaging was performed at day 14 in the C57Bl6/J mice Hindlimb ischemia model. Figure 3E: left panel: mice receiving 20  $\mu$ L PBS per day by intra-muscular injections during 5 days; right panel: mice receiving 10  $\mu$ g rhTSP-1 (R&D systems) per day, in 20  $\mu$ L intra-muscular injections, during 5 days. Figure 3F: Perfusion ratio means for the C57Bl6/J mice Hindlimb ischemia model. n = 10 for each group, p = 0.04.

### **Statistical analysis**

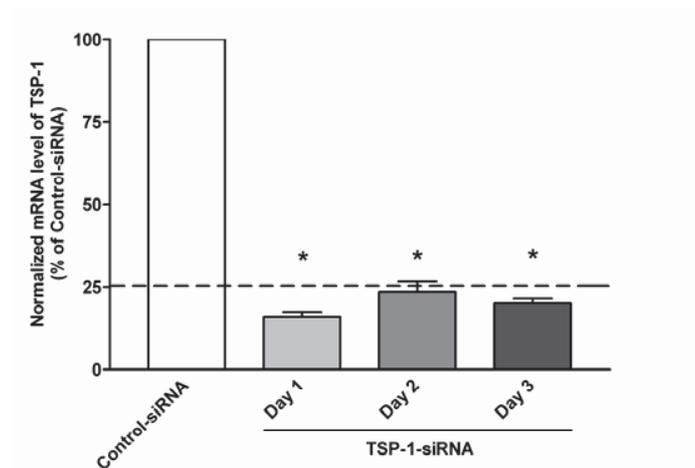
The nonparametric Mann-Whitney *U* test was used to analyze differences between PAD patients and controls. Data from *in vitro* ECFC assays are reported as means  $\pm$  SEM. Significant differences were identified by ANOVA followed by Fisher's protected least-significant-difference test. StatView statistical software (Cary, NC 27513, USA) was used for all analyses, and p values below 0.05 were considered to denote significant differences.

**Supplementary Figure I: ECFC express endothelial markers and TSP-1 receptor CD47 but not CD36**

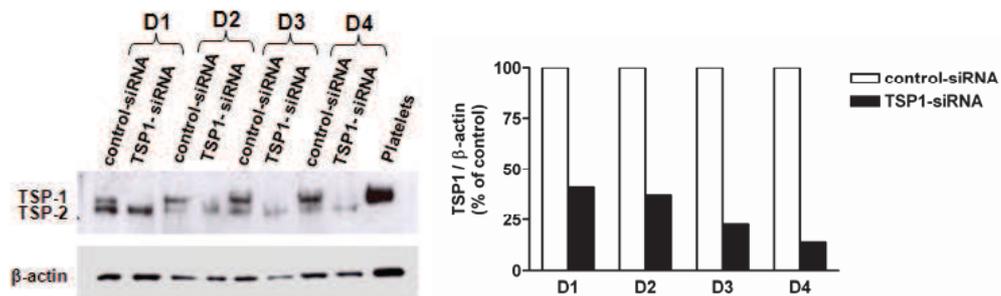


## Supplementary Figure II: TSP-1 inhibition in cord blood derived ECFC

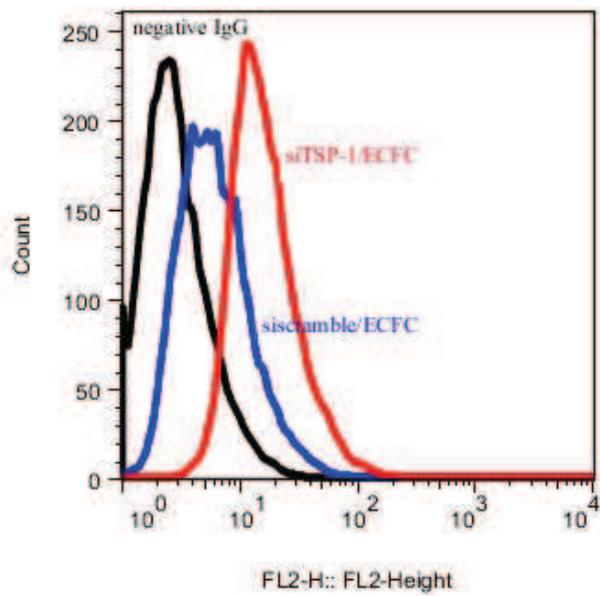
A. Quantitative analysis of TSP-1 mRNA by RT-qPCR, after 24, 48 and 72 hours of transfection with control-siRNA (All Star negative control, Qiagen®) and TSP-1-siRNA (Santa Cruz Biotechnologies®) using the Primefect® reagent kit (LONZA). The mean and SEM of three experiments are shown. \*:  $p < 0.05$



B. Quantitative analysis of TSP-1 protein by western blot, after 48 hours of transfection with control-siRNA (All Star negative control, Qiagen®) and TSP-1-siRNA (Santa Cruz Biotechnologies®) using the Primefect® reagent kit (LONZA).

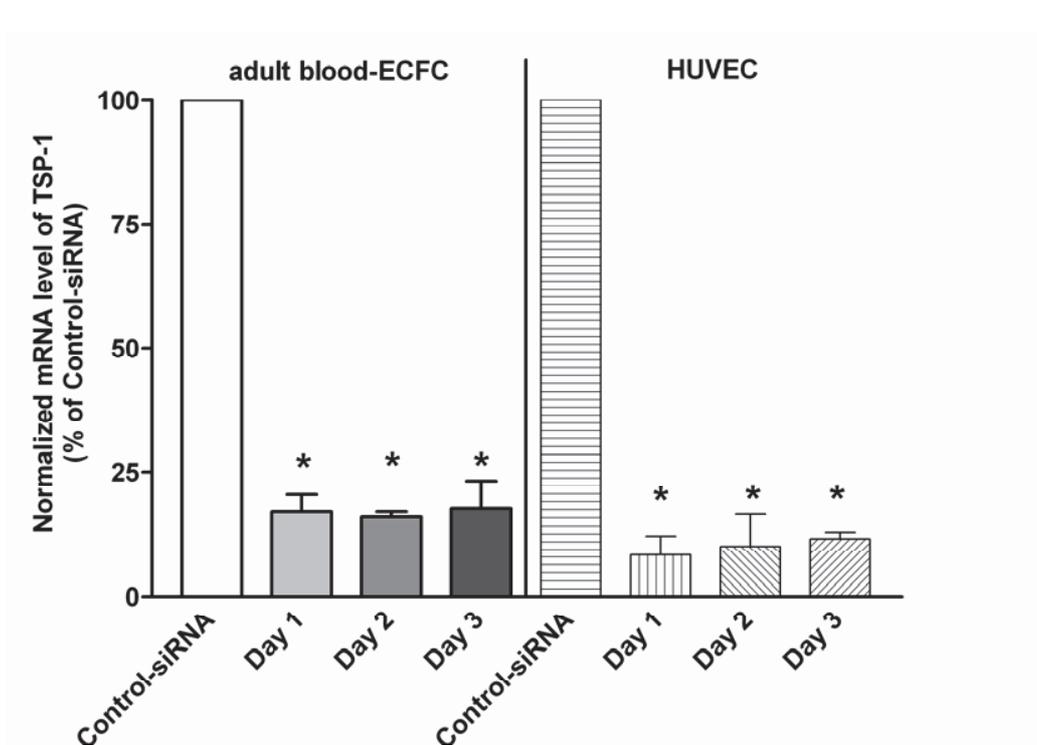


**Supplementary Figure III :Expression of CXCR4 on transfected cord blood-ECFC**

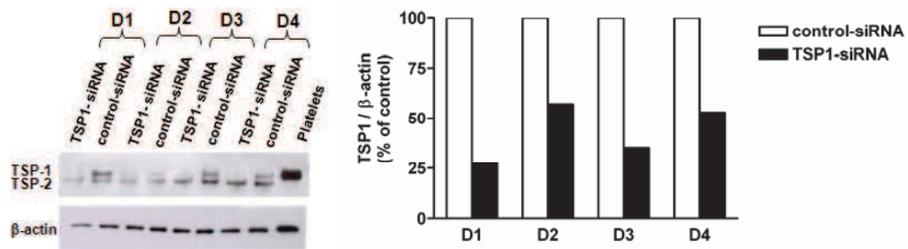


**Supplementary Figure IV: TSP-1 inhibition in adult blood derived ECFC and in HUVEC**

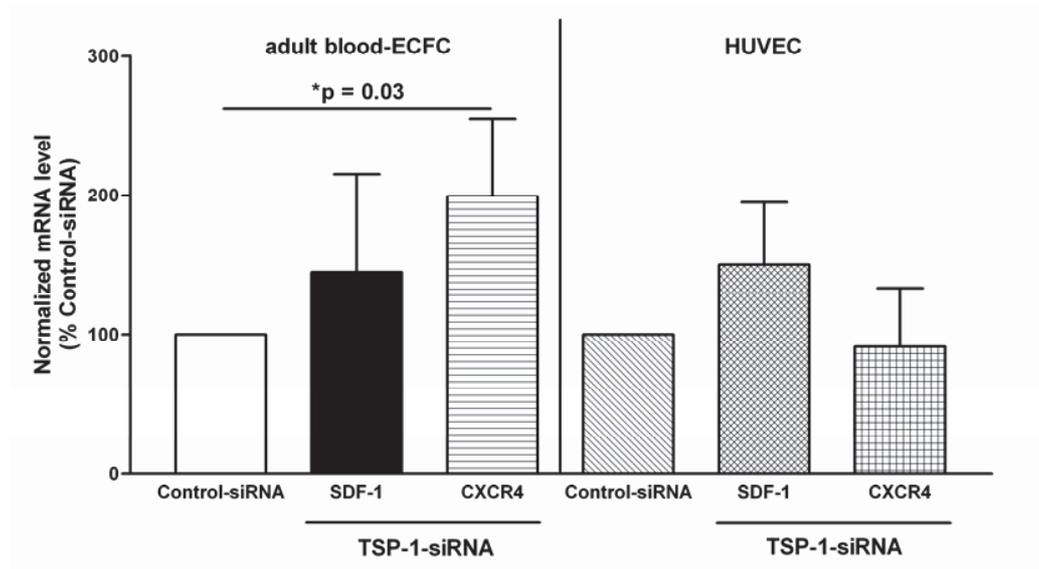
A. Quantitative analysis of TSP-1 mRNA by RT-qPCR, after 24, 48 and 72 hours of transfection with control-siRNA (All Star negative control, Qiagen<sup>®</sup>) and TSP-1-siRNA (Santa Cruz Biotechnologies<sup>®</sup>) using the Primefect<sup>®</sup> reagent kit (LONZA). The mean and SEM of three experiments are shown. \*:p < 0.05



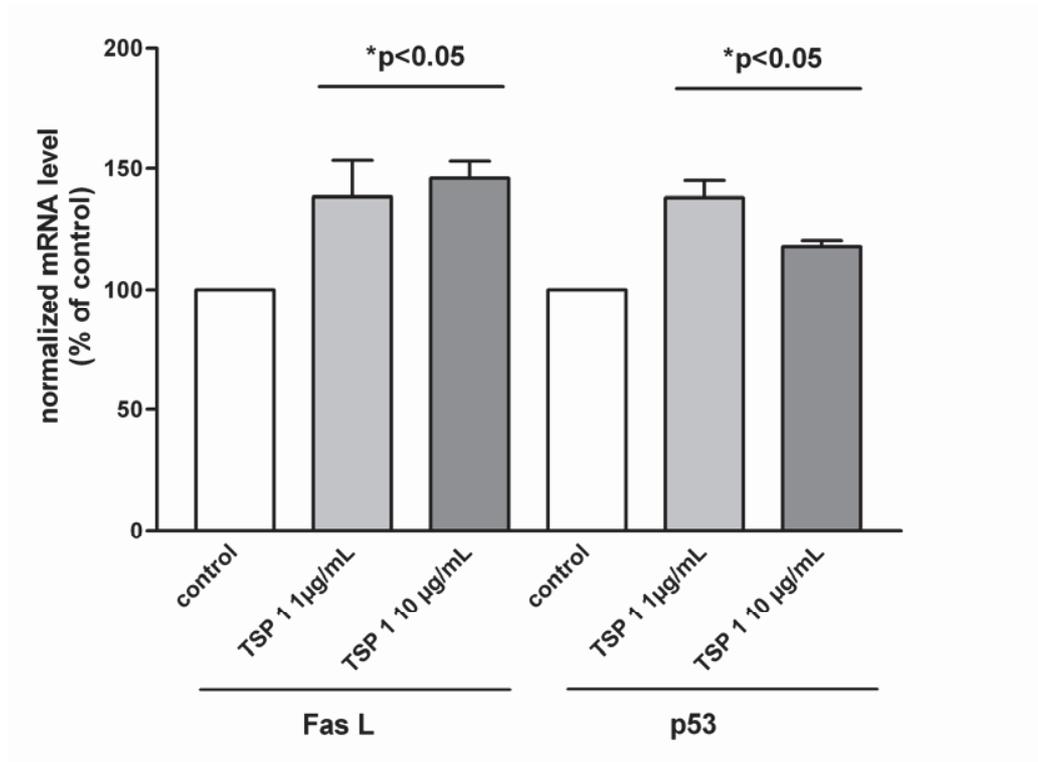
B. Quantitative analysis of TSP-1 protein by western blot, after 48 hours of transfection with control-siRNA (All Star negative control, Qiagen<sup>®</sup>) and TSP-1-siRNA (Santa Cruz Biotechnologies<sup>®</sup>) using the Primefect<sup>®</sup> reagent kit (LONZA).



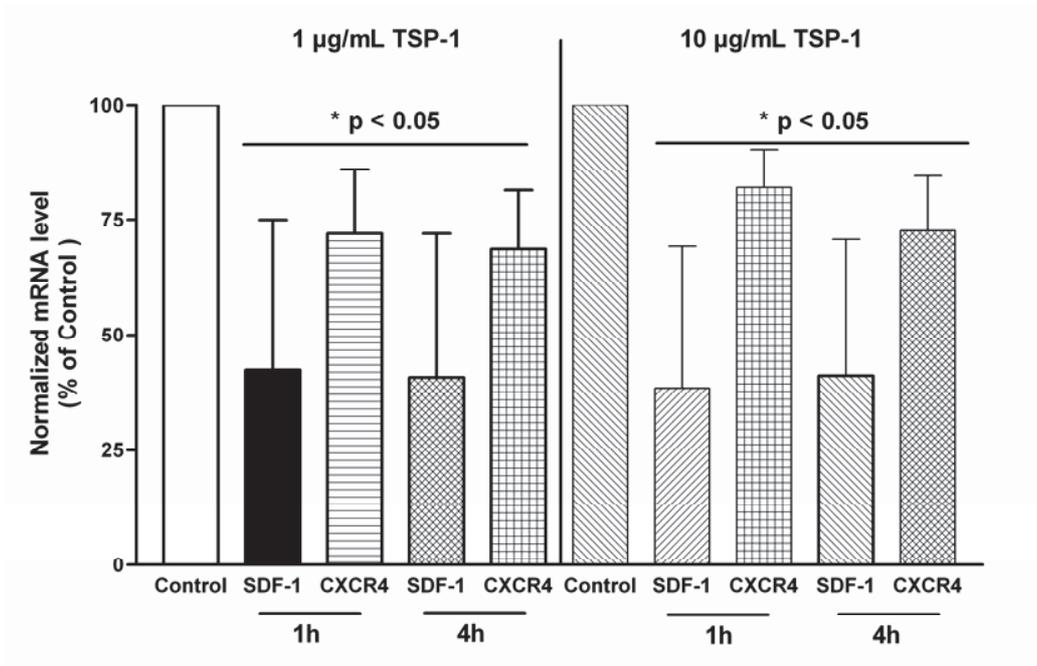
C. Quantitative analysis of SDF-1 and CXCR4 after transfection with control-siRNA (All Star negative control, Qiagen<sup>®</sup>) and TSP-1-siRNA (Santa Cruz Biotechnologies<sup>®</sup>) using the Primefect<sup>®</sup> reagent kit (LONZA) in adult blood derived ECFC and HUVEC.



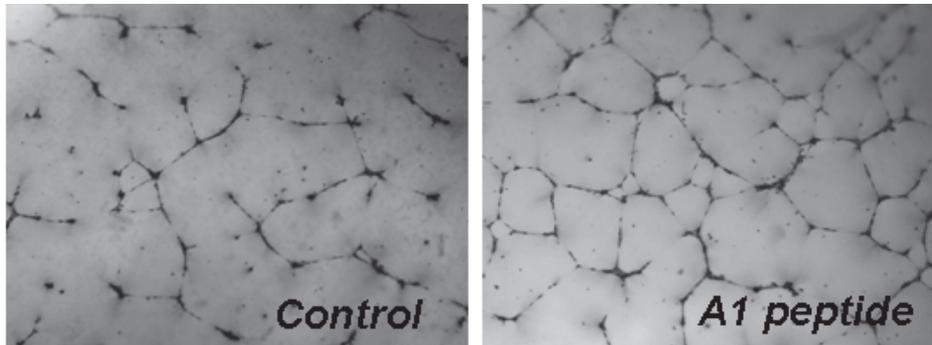
**Supplementary Figure V: effect of 1 and 10 µg/mL human recombinant TSP-1 on apoptosis related genes in cord blood derived ECFC.**



**Supplementary Figure VI: effect of 1 and 10 µg/mL human recombinant TSP-1 on cord blood derived ECFC.**



**Supplementary Figure VII: Effect of TSP-1 N-terminal peptide (10  $\mu$ M) on cord blood derived ECFC differentiation in Matrigel *in vitro*.**



**Table 1. Characteristics of the Study Population**

	Cases (n=184)	Control Subjects (n=330)	P
Age, y	57.1±7.2	56.7±7.6	0.6
Current+past smokers, %	97.8	47.0	<0.0001
Hypertension, %	43.5	16.1	<0.0001
Hypercholesterolemia, %	59.2	61.2	0.9
Lipid-lowering treatment, %	43.0	8.4	<0.0001
Total cholesterol, mmol/L	4.97±1.23	6.10±0.93	<0.0001
LDL cholesterol, mmol/L	3.04±1.03	3.94±0.87	<0.0001
HDL cholesterol, mmol/L	1.09±0.33	1.54±0.41	<0.0001
Triglycerides, mmol/L	1.96±1.35	1.41±0.87	<0.0001
Diabetes, %	24.5	8.5	<0.0001
Fasting blood glucose, mmol/L	6.5±2.4	5.9±0.7	<0.0001
Asymptomatic, %	10.3	...	...
Intermittent claudication, %	75.6	...	...
Critical ischemia, %	14.1	...	...
Prior revascularization, %	55.4	...	...
Ankle-brachial systolic pressure index	0.64±0.14	...	...
Coronary heart disease, %	23.9	...	...
Cerebrovascular disease, %	10.4	...	...
Values are given as mean±SD or percentages. BMI indicates body mass index.			

**Table 2. Association of peripheral arterial disease with VEGF, PIGF, TSP-1 tertiles**

	CASES	CONTROLS	<i>P</i>	OR (95%CI)	OR (95%CI)*
<b>VEGF</b>					
<11.2	36.4 (67)	31.0 (77)	<0.0001	2.62 (1.59-4.31)	4.11 (1.80-9.43)
11.2-18.0	19.6 (36)	44.0 (109)		1.00 (reference)	1.00 (reference)
>18.0	44.0 (81)	25.0 (62)		3.95 (2.39-6.53)	2.28 (0.99-5.21)
<b>PIGF</b>					
<6.7	39.1 (72)	29.9 (89)	0.005	2.09 (1.32-3.33)	5.03 (2.09-12.09)
6.7-9.8	24.5 (45)	38.9 (116)		1.00 (reference)	1.00 (reference)
>9.8	36.4 (67)	31.2 (93)		1.84 (1.16-2.94)	0.84 (0.35-2.02)
<b>TSP-1</b>					
<215	9.1 (16)	50.4 (122)	<0.0001	0.17 (0.09-0.32)	0.23 (0.09-0.60)
215-432	34.9 (61)	32.6 (79)		1.00 (reference)	1.00 (reference)
>432	56.0 (98)	16.9 (41)		3.09 (1.88-5.07)	3.25 (1.40-7.08)

Odd ratios for the lowest and upper tertiles relative to the middle tertile were computed using unconditional logistic regression analysis adjusted on age

\* Additional adjustment for PAD risk factors (hypertension, hypercholesterolemia, diabetes and smoking status), lipid-lowering treatment and CRP.

**Table 3. Association of PAD patient clinical characteristics with VEGF, PIGF, TSP-1 levels**

	VEGF	PIGF	TSP-1
<b>Continuous factors</b>			
Age	0.02	0.12 *	-0.07
BMI	0.01	0.08	-0.05
Glycaemia	-0.02	0.05	-0.003
Total cholesterol	-0.004	0.04	0.01
HDL cholesterol	-0.07	-0.03	0.07
LDL cholesterol	-0.004	0.04	-0.004
Triglycerides	0.10	0.05	-0.004
CRP	0.16 *	0.24 *	0.001
<b>Categorical factors</b>			
<b>Diabetes</b>			
No	219 ± 7	238 ± 7	219 ± 6
Yes	214 ± 16	258 ± 17	219 ± 13
<b>Current smoking</b>			
No	209 ± 8	237 ± 9	214 ± 7
Yes	232 ± 10	247 ± 11	227 ± 8
<b>Hypertension</b>			
No	221 ± 8	225 ± 9 *	217 ± 7
Yes	214 ± 9	262 ± 10	223 ± 8
<b>Hyperlipidemia</b>			
No	219 ± 9	246 ± 10	223 ± 8
Yes	217 ± 8	238 ± 8	217 ± 7
<b>Lipid-lowering treatment</b>			
No	212 ± 7	242 ± 8	224 ± 6
Yes	234 ± 13	242 ± 14	208 ± 11
<b>Antiagregants</b>			
No	206 ± 9	256 ± 10 *	226 ± 8
Yes	233 ± 11	220 ± 12	212 ± 9

\*  $p < 0.05$  (Partial spearman correlation analysis or nonparametric analysis of variance adjusted on case-control status). Partial Spearman correlation or adjusted mean ( $\pm$ SEM) ranks are shown after pooled PAD cases and controls together.

**Table 4. Association of severity of peripheral arterial disease with VEGF, PIGF, TSP-1 levels**

	Grade of Severity			P
	1, n=102	2, n=44	3, n=38	
<b>VEGF</b>	17.1 (9.7-25.9)	12.9 (7.0-25.6)	15.0 (6.4-30.8)	0.43
<b>PIGF</b>	7.1 (5.1-10.6)	9.3 (5.3-12.1)	8.7 (6.9-13.4)	0.07
<b>TSP-1</b>	430 (308-588)	468 (345-584)	513 (379-628)	0.59

Median (interquartile range) are shown and compared using nonparametric analysis of variance. We classified cases according to clinical criteria of PAD severity (Fontaine-Leriche stages, WHO classification): grade 1 = intermittent claudication with maximal walking distance > 100 meters; grade 2 = intermittent claudication with maximal walking distance < 100 meters; grade 3 = critical leg ischemia.

1. Fontana P, Gaussem P, Aiach M, Fiessinger JN, Emmerich J, Reny JL. P2Y12 H2 haplotype is associated with peripheral arterial disease: a case-control study. *Circulation*. 2003;108:2971-2973.
2. Reny JL, Alhenc-Gelas M, Fontana P, Bissery A, Julia PL, Fiessinger JN, Aiach M, Emmerich J. The factor II G20210A gene polymorphism, but not factor V Arg506Gln, is associated with peripheral arterial disease: results of a case-control study. *J Thromb Haemost*. 2004;2:1334-1340.
3. Smadja DM, Lorient MA, Hindorff LA, Mellottee L, Gaussem P, Emmerich J. No clear link between VKORC1 genetic polymorphism and the risk of venous thrombosis or peripheral arterial disease. *Thromb Haemost*. 2008;99:970-972.
4. Arnaud E, Nicaud V, Poirier O, Rendu F, Alhenc-Gelas M, Fiessinger JN, Emmerich J, Aiach M. Protective effect of a thrombin receptor (protease-activated receptor 1) gene polymorphism toward venous thromboembolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:585-592.
5. Van Huyen JP, Smadja DM, Bruneval P, Gaussem P, Dal-Cortivo L, Julia P, Fiessinger JN, 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.
6. 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.
7. Smadja DM, Basire A, Amelot A, Conte A, Bieche I, Le Bonniec BF, Aiach M, Gaussem P. Thrombin bound to a fibrin clot confers angiogenic and haemostatic properties on endothelial progenitor cells. *J Cell Mol Med*. 2008;12:975-986.
8. Smadja DM, Bieche 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*. 2006;4:2729-2731.
9. Smadja DM, Bieche 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*. 2007;11:1149-1161.
10. Smadja DM, Bieche 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. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:2321-2327.
11. Smadja DM, Laurendeau I, Avignon C, Vidaud M, Aiach M, Gaussem P. The angiotensin pathway is modulated by PAR-1 activation on human endothelial progenitor cells. *J Thromb Haemost*. 2006;4:2051-2058.
12. Smadja DM, Cornet A, Emmerich J, Aiach M, Gaussem P. Endothelial progenitor cells: Characterization, in vitro expansion, and prospects for autologous cell therapy. *Cell Biol Toxicol*. 2007;23:223-239.
13. Lawler J, Sunday M, Thibert V, Duquette M, George EL, Rayburn H, Hynes RO. Thrombospondin-1 is required for normal murine pulmonary homeostasis and its absence causes pneumonia. *J Clin Invest*. 1998;101:982-992.
14. Bonnefoy A, Daenens K, Feys HB, De Vos R, Vandervoort P, Vermylen J, Lawler J, Hoylaerts MF. Thrombospondin-1 controls vascular platelet recruitment and thrombus adherence in mice by protecting (sub)endothelial VWF from cleavage by ADAMTS13. *Blood*. 2006;107:955-964.
15. Murphy-Ullrich JE, Gurusiddappa S, Frazier WA, Hook M. Heparin-binding peptides from thrombospondins 1 and 2 contain focal adhesion-labilizing activity. *J Biol Chem*. 1993;268:26784-26789.
16. Foubert P, Silvestre JS, Souttou B, Barateau V, Martin C, Ebrahimian TG, Lere-Dean C, Contreres JO, Sulpice E, Levy BI, Plouet J, Tobelem G, Le Ricousse-Roussanne S. PSGL-1-mediated activation of EphB4 increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells. *J Clin Invest*. 2007;117:1527-1537.

### Publication 3: La stimulation/inhibition ciblée du VEGFR1 des progéniteurs endothéliaux module leur potentiel de différenciation

Clément d’Audigier<sup>1,2,3</sup>, Benoit Gautier<sup>1,4</sup>, Alexis Yon<sup>1,2</sup>, Jean-Meidi Alili<sup>1,2</sup>, Solène Evrard<sup>1,2,3</sup>, Anne Godier<sup>1,2,5</sup>, Skerdi Haviari<sup>1,2</sup>, Blandine Dizier<sup>1,2</sup>, Nicolas Inguibert<sup>4</sup>, Delphine Borgel<sup>6,7</sup>, Ivan Bieche<sup>8</sup>, Catherine Boisson-Vidal<sup>1,2</sup>, Carmen Roncal<sup>9,10</sup>, Peter Carmeliet<sup>9,10</sup>, Michel Vidal<sup>1,4</sup>, Pascale Gaussem<sup>1,2,3</sup> and David M. Smadja<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cite, Paris, France

<sup>2</sup> Inserm UMR-S 765, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris, France

<sup>3</sup> AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service d’hématologie biologique, Paris, France

<sup>4</sup> CNRS UMR 8638, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris, France

<sup>5</sup> AP-HP, Hôpital Hôtel Dieu, Service d’anesthésie et réanimation, Paris, France

<sup>6</sup> AP-HP, Hôpital Ambroise Pare, Service d’hématologie biologique, Boulogne-Billancourt, France

<sup>7</sup> Université Paris XI, Faculté de Pharmacie, Chatenay Malabry, France

<sup>8</sup> INSERM UMR 745, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris, France

<sup>9</sup> Vesalius Research Center, Laboratory of Angiogenesis & Neurovascular Link, Department of Oncology, University of Leuven, Leuven, Belgium

<sup>10</sup> Vesalius Research Center, Laboratory of Angiogenesis & Neurovascular Link, VIB, Leuven, Belgium

### Résumé

Le « *Placental Growth Factor* » (PIGF) est un ligand spécifique du récepteur au « *Vascular Endothelial Growth Factor* » (VEGF), le Flt-1/VEGFR1, qui lie aussi les isoformes VEGF-A et VEGF-B. Le VEGFR1 serait un régulateur négatif de la vasculogenèse mais pourrait agir comme régulateur positif de l’angiogenèse chez l’adulte, et le PIGF pourrait potentialiser sa réponse au VEGF dans l’angiogenèse pathologique mais non physiologique<sup>185</sup>.

Des taux élevés de PIGF ont déjà été proposés comme biomarqueur de mauvais pronostic dans les syndromes coronariens aigus<sup>428</sup> et dans les thromboses du Syndrome des Anti-PhosphoLipides<sup>835</sup>. Par ailleurs, plusieurs études décrivant différentes méthodes d’inhibition du PIGF ont montré que cette inhibition réduisait la progression de l’athérosclérose<sup>804, 836</sup>.

Les progéniteurs endothéliaux et en particulier les ECFC possèdent un potentiel thérapeutique car ils sont impliqués dans la vasculogenèse post-natale *in vivo*<sup>38, 41</sup>. Notre équipe a également montré que les ECFC exprimaient des taux élevés d’ARN messagers du VEGFR1<sup>179</sup>. D’autre part, les pathologies cardiovasculaires constituent un contexte reconnu où le taux des progéniteurs endothéliaux est modifié.

Nous avons évalué si les taux plasmatiques de différents facteurs angiogènes et marqueurs endothéliaux (VEGF, PIGF, thrombomoduline soluble, Gas6) étaient modifiés chez des patients atteints de pathologies coronaires ou subissant une chirurgie cardiaque, et si ces facteurs modulaient le potentiel angiogène des progéniteurs endothéliaux.

143 plasmas de patients provenant de 2 études cliniques différentes ont été analysés : une première étude comprenant 30 patients coronariens (patients présentant un IDM avec ou sans élévation du segment ST), 30 patients ayant un angor stable, associés à 30 individus contrôles appariés pour l'âge et le sexe ; une seconde étude comprenant 30 patients subissant une chirurgie de la valve, et 23 patients subissant un pontage coronarien, avec dans les 2 cas une mise en place d'une circulation extracorporelle. Les PIGF-1 & -2 ont été testés sur les propriétés angiogènes *in vitro* des ECFC. Elles ont également été étudiées en inhibant le VEGFR1 des ECFC par ARN interférence, mais aussi via le composé chimique « 4321 », inhibiteur du VEGFR1 décrit par l'équipe du Pr. Michel VIDAL. De plus, le composé 4321 a été testé dans le modèle murin d'implants de Matrigel® chez la souris C57Bl/6J, ainsi que dans le modèle murin d'ischémie du membre inférieur chez souris Swiss Nude.

Parmi les facteurs angiogènes et les marqueurs de l'endothélium explorés chez ces populations de patients cardiaques, seul le taux plasmatique de PIGF est significativement augmenté chez les patients coronariens, comparativement aux patients avec angor stable et à la population contrôle ; de même, le taux de PIGF est également augmenté de manière significative chez les patients ayant subi une chirurgie cardiaque. L'effet de ce facteur angiogène qui semble caractériser ces populations cardiaques en situation d'ischémie aiguë (SCA), ou immédiatement après un remodelage vasculaire artificiel (chirurgie), a ensuite été évalué sur les propriétés angiogènes des ECFC. Ainsi nous avons observé que les PIGF-1 et -2 potentialisent uniquement la tubulogénèse des ECFC *in vitro* via la phosphorylation du récepteur VEGFR1, sans effet sur leurs capacités proliférative et migratoire.

Pour vérifier l'hypothèse que la tubulogénèse des ECFC est dépendante du VEGFR1, nous avons réévalué les propriétés de prolifération, de migration et de différenciation des ECFC en inhibant leurs VEGFR1. Pour cela nous avons utilisé un siRNA spécifique du VEGFR1, ainsi que le composé chimique « 4321 ».

Nous avons donc observé que l'effet *in vitro* du PIGF est aboli lorsque le VEGFR1 est inhibé par ARN interférence ou par ce composé « 4321 ». De plus le composé « 4321 » inhibe la vascularisation des implants de Matrigel® chez la souris C57Bl/6J, comme l'attestent le taux d'hémoglobine et les taux d'ARN messagers de la VE-Cadhérine dans les implants, ainsi que la revascularisation de la patte ischémisée chez la souris Swiss Nude.

Ces résultats suggèrent que le système PIGF/VEGFR1 module la tubulogénèse induite par les ECFC, que le composé « 4321 » pourrait moduler la vasculogénèse post-natale *in vivo*, et que le taux de PIGF pourrait être un biomarqueur potentiel dans les syndromes coronariens aigus.

### **Discussion et perspectives**

Les syndromes coronariens aigus constituent une situation d'ischémie artérielle aiguë où la réponse post-ischémique immédiate mobilise des acteurs protéiques (cf § 2.5.) et cellulaires au moins en partie différents d'une situation d'ischémie chronique (cf § 2.4.). Le comportement des ECFC potentiellement impliqués dans cette réponse sera donc probablement différent par rapport au contexte d'ischémie chronique illustré par l'AOMI.

Dans notre étude, nous avons choisi de déterminer les concentrations plasmatiques des facteurs angiogènes VEGF et PIGF chez les patients atteints de SCA ainsi que chez des patients subissant une chirurgie cardiaque et assistés d'une circulation extracorporelle. La

variation des taux de ces facteurs pourrait être le reflet d'un mécanisme de réponse post-ischémique visant à pallier l'hypoxie tissulaire en favorisant une néovascularisation réactionnelle. A noter que des taux élevés de PIGF ont déjà été proposés comme biomarqueurs de mauvais pronostic dans les SCA<sup>428</sup>. Les SCA et la circulation extracorporelle sont des situations où l'on observe des variations de taux de PEC. Il est donc concevable de supposer que les ECFC soient mobilisés<sup>412</sup> dans ces contextes via des facteurs angiogènes comme le VEGF ou le PIGF<sup>32, 791</sup>. Chez les patients subissant une chirurgie cardiaque, en plus des taux de VEGF et de PIGF, nous avons également déterminé les concentrations des marqueurs d'activation / lésion endothéliale que sont la thrombomoduline soluble et Gas6. En effet, la variation du taux de ces marqueurs pourrait être le reflet d'une stimulation et/ou d'un renouvellement endothélial dans ce contexte. A noter que dans le groupe de patients atteints de SCA, il n'a pas été observé de différence significative des taux plasmatiques de Gas6 en comparaison aux populations contrôle et de patients atteints d'angor stable<sup>837</sup>. Par ailleurs, les taux plasmatiques de Gas6 sont corrélés positivement avec ceux de thrombomoduline, chez des sujets sains, des patients avec sepsis sévère et des patients non septiques avec défaillance d'organe<sup>838</sup>.

Dans ces 2 situations, SCA et chirurgie cardiaque, seuls les taux plasmatiques de PIGF sont significativement augmentés par rapport aux populations contrôles ou avant la chirurgie respectivement. Ce profil plasmatique dans ces 2 situations permet de supposer que la source de PIGF est possiblement locale (notamment les différents types cellulaires composant la plaque athérosclérotique dont les cellules participant à l'inflammation, ou site inflammatoire pour les patients chirurgicaux) plutôt que systémique (endothélium de l'ensemble du réseau vasculaire).

Suivant l'hypothèse que les ECFC seraient impliquées dans la réponse post-ischémique au décours de ces 2 situations cardiaques aiguës, nous avons évalué le comportement *in vitro* des ECFC vis-à-vis des PIGF-1 et -2 recombinants. Les PIGF-1 et -2 montrent une spécificité vis-à-vis du VEGFR1 des ECFC puisqu'ils entraînent sa phosphorylation alors que le VEGFR2 reste sous sa forme non phosphorylée. Le VEGF-A quant à lui active aussi bien le VEGFR1 que le VEGFR2 des ECFC.

Les propriétés angiogènes *in vitro* des ECFC exposés aux 2 isoformes du PIGF ont ensuite été évaluées. Nous n'avons pas observé de modification de leurs propriétés proliférative ni migratoire, alors que leur capacité à former des pseudotubes dans le Matrigel® est significativement augmentée avec les 2 PIGF. Le PIGF semble donc capable de stimuler la tubulogénèse des ECFC indépendamment du VEGF et donc par un mécanisme direct via le VEGFR1.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons choisi de réévaluer les propriétés angiogènes *in vitro* des ECFC en inhibant leur VEGFR1. Pour cela, nous avons utilisé un siRNA spécifique (siRNA-VEGFR1) ainsi que le composé chimique « 4321 », un inhibiteur du VEGFR1 élaboré par l'équipe du Pr M. Vidal. Nous avons observé des résultats similaires avec les 2 méthodes, i.e. une absence d'effet sur la prolifération et la migration des ECFC, mais une diminution de leur potentiel tubulogénique. Ces résultats corroborent l'hypothèse que le système PIGF/VEGFR1 est capable de moduler le potentiel de différenciation des ECFC.

A partir de ces résultats *in vitro* et des données de la littérature<sup>412, 839, 840</sup>, il est difficile de privilégier l'hypothèse soit d'un rôle délétère, soit d'un rôle bénéfique de la mobilisation des ECFC combinée à l'augmentation des taux plasmatiques de PIGF, en situation de réaction post-ischémique aiguë/immédiate. En effet, la mobilisation de ces cellules vasculogéniques pourrait soit contribuer à augmenter la vascularisation de la plaque athérosclérotique et

donc aggraver le tableau clinique, soit permettre la recanalisation du thrombus responsable du SCA, et donc diminuer l'ischémie myocardique.

La démarche d'étude par inhibition du récepteur candidat, associée à l'étude par stimulation directe de ce même récepteur permet d'identifier une voie de signalisation potentiellement responsable des effets observés *in vitro* sur les ECFC. Cela permet alors de préciser les propriétés biologiques des ECFC vis-à-vis de ce récepteur, le VEGFR1. Le procédé d'inhibition ciblée d'un récepteur peut ensuite constituer une méthodologie de développement de nouvelles thérapeutiques. L'identification et le développement de ligands de petite taille comme le 4321 constituent en ce sens une innovation par rapport au développement d'anticorps monoclonaux qui reste très coûteux. La capacité du 4321 à inhiber la formation de pseudotubes dans le Matrigel® par des CE matures (HUVEC) a déjà été validée<sup>841</sup>. Après avoir observé que le PIGF stimulait uniquement la tubulogénèse des ECFC (confirmé par les expériences d'ARN interférence), il a donc paru très intéressant de tester le 4321 sur les ECFC ; le 4321 se présente donc comme une molécule capable de bloquer la voie PIGF/VEGFR1 et d'inhiber son effet biologique dans les ECFC. L'étape suivante pour valider le potentiel thérapeutique d'un tel composé chimique est l'utilisation de modèles pré-cliniques.

Nous avons ainsi testé le 4321 dans les modèles murins d'implants de Matrigel® et d'ischémie de la patte postérieure. La présence de 4321 à 200 µM dans les implants diminue leur vascularisation 14 jours après l'injection du Matrigel® chez des souris C57Bl6/J. Cela a été objectivé par le dosage d'hémoglobine ainsi que des taux d'ARNm de la VE-cadhérine dans les implants. Dans le modèle d'ischémie du membre inférieure, les injections intrapéritonéales de 4321 à 10 mg/kg (3 injections au total, à J0, J1 et J2) diminuent la revascularisation de la patte ischémiée, comme l'atteste l'analyse par laser Doppler 7 jours après la ligature de l'artère fémorale. Ces résultats apportent la preuve que le 4321 est capable d'inhiber la néovascularisation *in vivo*, probablement en bloquant le VEGFR1 des cellules vasculogéniques murines. Dans ce dernier modèle nous avons utilisé des souris Nude afin de valider l'effet *in vivo* du 4321 dans ce type de souris pour ensuite tester le 4321 dans le modèle de xélogreffe de tumeur chez ces souris Swiss Nude. Ces expérimentations sont en cours.

Le VEGFR1 est présent sur un nombre important de types cellulaires, incluant notamment les monocytes, les péricytes, les CAC et donc les ECFC. Les effets pro-angiogènes du PIGF décrits dans la littérature pourraient en partie être dus à un effet pro-inflammatoire. En effet, il a été décrit que l'activation des monocytes par le PIGF stimulait l'expression des ARNm de différentes cytokines/chimiokines inflammatoires comme le TNF-α, l'IL-1β, Le MCP-1, le MIP-1 et l'IL-8<sup>795</sup>. L'effet anti-angiogène du 4321 décrit dans nos 2 modèles *in vivo* est donc probablement pluricellulaire, avec possiblement une composante anti-inflammatoire (diminution du recrutement des leucocytes par le tissu ischémié).

Le PIGF est également capable d'activer la neuropiline-1 (NRP-1)<sup>842</sup>. Malgré une affinité importante de nos PIGF recombinants vis-à-vis du VEGFR1, nous ne pouvons pas exclure une activité des PIGF-1 et -2 via la NRP-1. Cependant, nous avons retrouvé les mêmes effets avec le siRNA-VEGFR1 et le composé 4321 sur les propriétés angiogènes des ECFC, indiquant que l'effet du PIGF sur ces cellules est principalement médié par le VEGFR1.

Chez les patients atteints de SCA, l'augmentation des taux plasmatiques de PIGF que nous avons décrite, pourrait être considérée comme déclenchée par l'ischémie myocardique aigue, afin de favoriser la constitution d'un infiltrat inflammatoire propice à une néovascularisation visant à compenser l'hypoxie tissulaire. Les ECFC dans ce contexte

pourraient participer à cette néovascularisation compensatrice. Cependant des expériences complémentaires sont nécessaires pour étayer cette hypothèse. La caractérisation par CMF des PEC et des leucocytes dans le sang périphérique de ces patients pourrait apporter un élément de réponse quant à la mobilisation de cellules médullaires dans cette situation. De plus, toujours dans une démarche de démonstration par inhibition du VEGFR1, il serait judicieux de reproduire les expériences *in vivo* de Matrigel®-plug et d'ischémie du membre inférieur avec le 4321, après transplantation allogénique de moelle, afin d'identifier une inhibition de la mobilisation des éléments médullaires contribuant à la diminution de la néovascularisation. Un modèle murin d'induction d'infarctus du myocarde serait également adapté pour évaluer *in vivo* l'inhibition du VEGFR1, dans un contexte plus proche de celui de nos patients atteints de SCA, ce qui pourrait nous permettre d'éclaircir le rôle de l'augmentation des taux plasmatiques de PlGF chez ces patients.

**Article soumis :**



# Angiogenesis

## Targeting VEGFR1 on endothelial progenitors modulates their differentiation potential --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Full Title:</b>	Targeting VEGFR1 on endothelial progenitors modulates their differentiation potential
<b>Article Type:</b>	Original Article
<b>Keywords:</b>	Biomarker Placental growth factor endothelial progenitor cells endothelial colony forming cells VEGFR-1
<b>Corresponding Author:</b>	David M Smadja, PharmD, PhD Paris Descartes University Paris, FRANCE
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Paris Descartes University
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	clement d'Audigier, PharmD, PhD
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	clement d'Audigier, PharmD, PhD benoit gauthier, PhD alexis yon, PharmD jean-Meidi Alili, PharmD solene M Evrard, PharmD, PhD anne godier, MD, PhD Skerdi Haviari, MD Blandine Dizier, MSc Nicolas Inguibert, PharmD, PhD Delphine Borgel, PharmD, PhD Ivan Bieche, PharmD, PhD Catherine Boisson-Vidal, PhD Carmen Roncal, PhD Peter Carmeliet, MD, PhD Michel Vidal, PharmD, PhD Pascale Gaussem, PharmD, PhD David M Smadja, PharmD, PhD
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Abstract:</b>	<p><b>Objectives.</b> We studied whether plasma levels of angiogenic factors and endothelial markers in coronary artery disease patients or undergoing cardiac surgery are modified, and whether those factors modulate endothelial progenitor's angiogenic potential.</p> <p><b>Methods and Results.</b> 143 patients' plasmas from two different studies were analyzed</p>

(30 coronary artery disease patients, 30 patients with stable angina, coupled with 30 age and sex-matched controls; 53 patients underwent cardiac surgery). Among factors screened, only placental growth factor (PIGF) was found significantly increased in these pathological populations. PIGF-1 and -2 were then tested on human endothelial colony forming cells (ECFCs). We found that PIGF-1 and -2 induce VEGFR1 phosphorylation and potentiate ECFCs tubulogenesis in vitro. ECFCs VEGFR1 was further inhibited using a specific small interfering RNA (siRNA) and the chemical compound 4321. We then observed that the VEGFR1-siRNA and the compound 4321 decrease ECFCs tubulogenesis potential in vitro. Finally we tested the compound 4321 in the preclinical Matrigel®-plug model with C57Bl/6J mice as well as in the hindlimb ischemia model with Swiss Nude mice. We found that 4321 inhibited the plug vascularization, attested by the haemoglobin content and the VE-Cadherin expression level, and that 4321 inhibited the post-ischemic revascularization, assessed by Laser Doppler Perfusion Imaging.

Conclusion. PIGF plasma levels were found increased in cardiovascular patients. Disrupting PIGF/VEGFR1 pathway could modulate ECFCs induced tubulogenesis, the cell type responsible for newly formed vessels in vivo.

## Targeting VEGFR1 on endothelial progenitors modulates their differentiation potential

Clément d'Audigier<sup>1,2,3</sup>, Benoit Gautier<sup>1,4</sup>, Alexis Yon<sup>1,2</sup>, Jean-Meidi Alili<sup>1,2</sup>, Solène M. Evrard<sup>1,2,3</sup>, Anne Godier<sup>1,2,5</sup>, Skerdi Haviari<sup>1,2</sup>, Blandine Dizier<sup>1,2</sup>, Nicolas Inguibert<sup>4</sup>, Delphine Borgel<sup>6,7</sup>, Ivan Bieche<sup>8</sup>, Catherine Boisson-Vidal<sup>1,2</sup>, Carmen Roncal<sup>9,10</sup>, Peter Carmeliet<sup>9,10</sup>, Michel Vidal<sup>1,4</sup>, Pascale Gaussem<sup>1,2,3</sup> and David M. Smadja<sup>1,2,3</sup>

### **From:**

<sup>1</sup> Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

<sup>2</sup> Inserm UMR-S 765, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris, France

<sup>3</sup> AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service d'hématologie biologique, Paris, France

<sup>4</sup> CNRS UMR 8638, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris, France

<sup>5</sup> AP-HP, Hôpital Hôtel Dieu, Service d'anesthésie et réanimation, Paris, France

<sup>6</sup> AP-HP, Hôpital Ambroise Pare, Service d'hématologie biologique, Boulogne-Billancourt, France

<sup>7</sup> Université Paris XI, Faculté de Pharmacie, Chatenay Malabry, France

<sup>8</sup> INSERM UMR-S 745, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris, France

<sup>9</sup> Vesalius Research Center, Laboratory of Angiogenesis & Neurovascular Link, Department of Oncology, University of Leuven, Leuven, Belgium;

<sup>10</sup> Vesalius Research Center, Laboratory of Angiogenesis & Neurovascular Link, VIB, Leuven, Belgium

### **Corresponding author:**

Pr. David SMADJA

Haematology Department, Paris Descartes University

European Georges Pompidou Hospital, 20 rue leblanc, 75015 Paris

Phone: +33 1 56093933; fax: +33 1 56093393

E-mail: [david.smadja@egp.aphp.fr](mailto:david.smadja@egp.aphp.fr)

**Abstract: 232 words**

**Body: 4662 words**

**Figures: 6**

## ABSTRACT

*Objectives.* We studied whether plasma levels of angiogenic factors and endothelial markers in coronary artery disease patients or undergoing cardiac surgery are modified, and whether those factors modulate endothelial progenitor's angiogenic potential.

*Methods and Results.* 143 patients' plasmas from two different studies were analyzed (30 coronary artery disease patients, 30 patients with stable angina, coupled with 30 age and sex-matched controls; 53 patients underwent cardiac surgery). Among factors screened, only placental growth factor (PIGF) was found significantly increased in these pathological populations. PIGF-1 and -2 were then tested on human endothelial colony forming cells (ECFCs). We found that PIGF-1 and -2 induce VEGFR1 phosphorylation and potentiate ECFCs tubulogenesis *in vitro*. ECFCs VEGFR1 was further inhibited using a specific small interfering RNA (siRNA) and the chemical compound **4321**. We then observed that the VEGFR1-siRNA and the compound **4321** decrease ECFCs tubulogenesis potential *in vitro*. Finally we tested the compound **4321** in the preclinical Matrigel<sup>®</sup>-plug model with C57Bl/6J mice as well as in the hindlimb ischemia model with Swiss Nude mice. We found that **4321** inhibited the plug vascularization, attested by the haemoglobin content and the VE-Cadherin expression level, and that **4321** inhibited the post-ischemic revascularization, assessed by Laser Doppler Perfusion Imaging.

*Conclusion.* PIGF plasma levels were found increased in cardiovascular patients. Disrupting PIGF/VEGFR1 pathway could modulate ECFCs induced tubulogenesis, the cell type responsible for newly formed vessels *in vivo*.

## INTRODUCTION

Placental growth factor (PlGF) acts through binding to VEGF receptor-1 (VEGFR1) /Flt-1, which also links VEGF-A and -B isoforms. Given its weak tyrosine kinase activity, VEGFR1 was proposed to act as a negative regulator of vasculogenesis during embryogenesis by sequestering VEGF. Indeed, loss of VEGFR1 disrupts normal vascular development, but deletion of its tyrosine kinase domains allows normal embryonic angiogenesis(1). Conversely, in adulthood, VEGFR1 should act as a positive regulator of angiogenesis and PlGF was reported to potentiate the angiogenic response to VEGF in pathological but not physiological angiogenesis(2). These effects have been related to activation of macrophages functions, inflammation, atherosclerosis and cancer metastasis(2, 3). VEGFR1 has been involved in both angiogenesis and tumor dissemination(4, 5) and its upregulation was responsible for vascular maturation of tumor blood vessels in PHD2<sup>+/-</sup> mice(6). PlGF could stimulate angiogenesis by VEGFR1 direct signaling and/or displacing VEGF from its binding site. In line with these functions, elevated PlGF plasma levels have been proposed as a biomarker of adverse outcome in patients with acute coronary syndrome (7), thrombosis associated with antiphospholipid syndrome (8) and also has been found upregulated in advanced colorectal, breast cancer or melanoma (9-11). PlGF inhibition with gene-inactivation studies (12) or use of anti-PlGF antibody ( $\alpha$ PlGF mAb) reduced atherosclerosis progression (13).  $\alpha$ PlGF mAb also has been shown to decrease tumour growth and metastasis by inhibiting angiogenesis (11, 14).

Bone marrow-derived cells, and especially endothelial progenitor cells (EPCs), have been proposed to contribute to atherosclerosis progression, angiogenesis as well as tumor neovasculature (15, 16). EPCs are crucial actors in neovascularization in human adults and are currently considered as cardiovascular risk biomarkers(17). At least 2 populations of EPCs are well-documented in human (18, 19). "Early" EPCs, also called "circulating angiogenic cells" (CACs), are spindle shaped and express both endothelial and leukocyte markers. "Late" EPCs, also called endothelial colony-forming cells

(ECFCs)(19), develop after 2 to 3 weeks of culture and have the characteristics of precursor cells committed to the endothelial lineage. CACs and ECFCs have therapeutic potential; however, *in vivo*, cells that merge into neovessels have an ECFC phenotype (19, 20). In a previous work designed to study the kinetics of VEGFR2 expression along expansion, we observed that ECFCs expressed high level of VEGFR1 mRNA(21). Because ECFCs are a potential cell therapy product and/or an angiogenic cell type responsive of tumoral angiogenesis, and according to PlGF/VEGFR1 implication in atherosclerosis and tumoral angiogenesis, a better understanding of PlGF/VEGFR1 implication in ECFCs is needed. Herein, we report increased PlGF plasma levels in cardiovascular patients; a setting known to modulate EPCs counts. We thus explored PlGF/VEGFR1 role in angiogenic properties of ECFCs. We further investigated their *in vitro* and *in vivo* angiogenic effect of a newly developed chemical compound (**4321**) that inhibits the interaction of VEGFR1 to its ligands (22).

## **METHODS**

### **Study population and blood collection**

We studied patients from 2 separate prospective studies both approved by the Paris-Broussais-HEGP ethics committee.

The first group was composed of 90 patients admitted to our hospital for a coronary angiogram. They were assigned to three groups: i) acute coronary syndromes, i.e. patients with STEMI and NSTEMI according to current definition (patient's chest pain associated with ST modifications and or troponin levels  $> 0.15 \mu\text{g/L}$ ); ii) stable angina [patients with stable clinical symptoms, normal rest electrocardiogram, normal troponin levels ( $< 0.15 \mu\text{g/L}$ ) and stenosis  $> 50\%$  confirmed by angiogram]; iii) control patients (patients without angina, with normal troponin levels and normal preoperative coronary angiogram). Patients from the 3 groups were matched for age and sex (23). For each patient, a single blood sampling was performed just before coronary angiogram, from the catheter introduced in the radial artery for angioplasty. Citrated plasma was obtained by double centrifugation (2x10 minutes at 2,300 g) of blood collected in tubes containing 0.105 M sodium citrate.

The second study enrolled 53 consecutive patients scheduled for valve surgery or coronary artery bypass grafting (CABG) with extracorporeal circulation (ECC) (24). Patients' characteristics and inclusion/exclusion criteria are described elsewhere (24). The on-pump was managed with a standard protocol, using a membrane oxygenator and a roller pump, with mild systemic hypothermia ( $32^{\circ}\text{C}$ ). For this study, blood samples were collected before and immediately after bypass, through an arterial catheter into Vacutainer tubes (Becton-Dickinson Diagnostics, Le Pont-de-Claix, France) containing 0.105 M sodium citrate. Citrated plasma was obtained by double centrifugation (2x10minutes at 2,300g).

## **ELISA Assays**

Plasma levels of VEGF and PlGF were measured with enzyme-linked immunosorbent kits from R&D Systems<sup>®</sup> (Minneapolis, MN, USA). Plasma levels of soluble thrombomodulin were measured with enzyme-linked immunosorbent kits from Stago<sup>®</sup> (Courtaboeuf, France). Plasma levels of Gas6 were measured with a homemade enzyme-linked immunosorbent as previously described(25).

## ***In vitro* VEGFR1 chemiluminescent assay**

The assay was performed as previously described (26). Briefly, a fixed amount (131 pM) of biotinylated human VEGF<sub>165</sub> was incubated with the screened compounds in a 96-well microplate coated with a human VEGFR1 ECD / Fc chimera or a VEGFR1 D1-D3 domains / Fc chimera (R&D Systems<sup>®</sup> Minneapolis, MN, USA). The residual biotinylated VEGF<sub>165</sub> present after washing was detected by chemiluminescent with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin.

## **Western blot analysis**

The Western blot experiments were performed as previously described (27, 28). Confluent ECFCs in six-well plates were starved by incubation overnight in EBM-2 without supplements. ECFCs were incubated with PlGF-1,-2 (Reliatech<sup>®</sup>) at 250 ng/mL (2) or VEGF<sub>165</sub> (R&D Systems<sup>®</sup> Minneapolis, MN, USA) at 50 ng/mL (21) for 5, 10, 15, 20 and 30 min. ECFCs were lysed in 1% NP40 (Invitrogen<sup>®</sup>) plus 1% Bridj 96 lysis buffer. The lysate was subjected to SDS-PAGE in an 8% polyacrylamide gel and the resulting bands were transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were incubated with the anti-phospho-Flt-1 (Millipore, Billerica, MA, USA) or anti-phospho-VEGF Receptor 2 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) antibodies at a dilution of 1:1000, with the exception of the anti-tubulin antibody (Epitomics, Burlingame, CA, USA), which was used at a dilution of 1:15000. Antibody binding was detected by enhanced chemiluminescence with a CCD camera (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France), and densitometry analysis was performed with Chemicapt 3000 software (Fisher

Bioblock Scientific, Illkirch, France). The results are expressed assuming a value of 100% for the untreated wells.

### **ECFC proliferation assay**

After 16 h of serum and growth factor privation, ECFCs were incubated for 48 h in EBM2 medium, 5% FBS in presence or absence of different concentrations of PlGF-1, PlGF-2 or VEGF. Proliferation was then examined by measuring cell phosphatase activity based on the release of paranitrophenol (pNP) from paranitrophenylphosphate substrate (pNPP, Sigma, Saint-Louis, Missouri, USA) measured at 405 nm optical density (OD) (Fluostar optima; BMG labtech, Champigny-sur-Marne, France).

### ***In vitro* Matrigel<sup>®</sup> tube formation assay**

After 16 h of serum and growth factor privation, ECFCs ( $3 \times 10^4$  cells/well) were seeded on growth factor-reduced Matrigel<sup>®</sup> (200  $\mu$ L) (BD Biosciences) in EBM2 medium and cultured for 18 h at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> with the indicated treatments. Capillary-like structures were observed by phase-contrast microscopy and networks formed by ECFCs were quantified with Videomet<sup>™</sup> software version 5.4.0. (Microvision Instruments, Evry, France).

### **Wound healing assay**

A reproducible circular “wound” was made with a tip in confluent monolayers of ECFCs cultured in 12-well plates. The wound area was measured at x20 magnification under an inverted microscope, then the medium was removed and the cells were further incubated for 18 h with PlGF-1 or -2 at 250 ng/mL. Wound repair activity was calculated by expressing the area of the wound after 4, 8 and 24 hours of incubation as a percentage of the initial area (“0%” of migration).

### **ECFC transfection with siRNA against VEGFR1**

Short interfering RNA silencing *VEGFR1* gene expression (VEGFR1-siRNA) (sc-29319, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) was mixed with the Primefect<sup>®</sup> reagent (LONZA) at 10  $\mu$ M to obtain transfection complexes, which were added to  $2 \times 10^5$  ECFCs in complete EGM2 medium in 6-well plates (siRNA final concentration = 50 nM). Control siRNA (Allstars Neg. control siRNA, Qiagen, Cambridge, MA, USA) was used in parallel.

### **Real-Time - quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)**

The theoretical and practical aspects of RT-qPCR on the ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) are described in detail elsewhere(29). Total RNA were extracted from sub-confluent ECFC or frozen Matrigel<sup>®</sup>-plug using the RNABle<sup>®</sup> reagent (Eurobio, Courtaboeuf, France). Reverse transcription reactions using 1  $\mu$ g of RNA and random hexamer oligonucleotides (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) were performed following the manufacturer's instructions. For VEGFR1 mRNA quantification, we quantified transcripts of the TBP gene, which encodes the TATA box-binding protein (a component of the DNA-binding protein complex TFIID) as the endogenous RNA control, and target gene expression was normalized on the basis of its TBP content. Primers for TBP and the target genes (sequences available on request) were chosen with the assistance of Oligo 5.0 software (National Biosciences, Plymouth, MN, USA). For VE-Cadherin mRNA quantification, reverse transcription products were incubated in PCR MasterMix (TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression MasterMix, Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA) with 1  $\mu$ M of each specific primer (murin CD144 TaqMan<sup>®</sup> probe and murin GAPDH TaqMan<sup>®</sup> probe as the endogenous control, Applied Biosystems), in a final volume of 10  $\mu$ L. Reactions were heated for 5 min at 95°C and 50 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at annealing temperature and 1 min at 72°C were performed.

### **Target and compound preparation and *in silico* screening protocol.**

Molecule **4321** has been screened from The CERMN (Centre d'Etude et de Recherche sur le médicament de Normandie – Normandy Drug Study and Research Center, <http://www.cermn.unicaen.fr/>) collection. The structure of the VEGFR1 protein target was obtained from the X-ray structure of the VEGF-VEGFR1 D2 complex (PDB: 1FLT, resolution 1.70 Å). As previously described, docking experiments of a library bank compound, molecule **4321**, were performed with AutoDock4 (30) with some side chains in the binding area allowed to be flexible during the docking runs(22). This compound has been described to inhibit the VEGF-induced VEGFR-1 transduction pathways (22).

### ***In vivo* Matrigel<sup>®</sup>-plug assay**

As previously described (20), Matrigel<sup>®</sup>-plugs were prepared on ice by mixing growth factor-reduced Matrigel<sup>®</sup> (BD Biosciences) with recombinant mouse bFGF (750 ng/mL, R&D systems) and the compound **4321**(22) (200 µM). They were implanted in C57/Bl6J mice backs and removed after 14 days. The hemoglobin concentration was measured in the supernatants with Drabkin's reagent (Sigma-Aldrich).

### **Hindlimb ischemia model**

Swiss Nude mice underwent surgery to induce unilateral hindlimb ischemia as previously described (31) and were then randomly allocated to receive intraperitoneal injections (day 0, day 1 and day 2) of vehicle (ethanol 10%, Cremophor<sup>®</sup> EL 10%, bi-distilled water) or the compound **4321** at 10 mg/kg dose. Mice underwent surgery to induce hindlimb ischemia by left femoral artery ligation at D0. The first injection was administered 6 hours after the ligation. The ischemic/normal limb blood flow ratio was determined by using a laser Doppler perfusion imaging system (Moor instruments), performed at day 2 (D2) and day 7 (D7). Results are expressed as the difference between the perfusion ratios at D7

(rD7) and D2 (rD2) [ $\Delta(D2-D7)\% = (rD7-rD2)*100/rD2$ ]. n = 12 for each group, representative of two distinct experiments.

### **Statistical analysis**

Baseline characteristics were compared between the clinical groups by using Wilcoxon's rank sum test for none normally distributed variables and Student's unpaired t test otherwise. Data from *in vitro* ECFC assays are reported as means  $\pm$  SEM. Data from *in vivo* studies are reported as means  $\pm$  SEM or medians with minimum to maximum value (hindlimb ischemia experiment). Significant differences were identified by ANOVA followed by Fisher's protected least-significant-difference test. StatView statistical software (Cary, NC 27513, USA) was used for all analyses, and p values below 0.05 were considered to denote significant differences. Significance is noticed on Figures: \* when  $p < 0.05$ , \*\* when  $p < 0.01$  and \*\*\* when  $p < 0.001$ . *All in vitro experiments were performed at least 3 times.*

## RESULTS

### **PIGF, but not VEGF, is increased during coronary artery disease and after cardiac surgery**

High levels of PIGF were found in acute coronary artery disease patients, compared to patients with stable angina or no coronary disease (Table 1), whereas VEGF level did not vary along groups. We further studied PIGF in a setting known to mobilize angiogenic cells, i.e. extra-corporeal circulation (ECC). In cardiac surgery patients, plasma PIGF levels increased substantially upon ECC whatever the presence (CABG) or the absence of cardiovascular risk factors (valve surgery) ( $p < 0.001$ , table 1), whereas VEGF and two endothelial markers of activation, soluble Thrombomodulin and Gas6, did not significantly vary.

### **PIGF-1 and -2 induce VEGFR1 phosphorylation and increase ECFCs tube formation**

Because postnatal vasculogenesis is thought to involve endothelial progenitor cells (15), we further explored whether PIGF-1 and -2 activation was able to modulate ECFCs angiogenic potential. We focused on ECFCs because this cell type is currently proposed as the one at the origin of newly formed vessels (19, 20). We previously found a high VEGFR1 mRNA expression in ECFCs (21). We induced VEGFR1 activation by recombinant PIGF proteins (Reliatech<sup>®</sup>), because of their good affinity towards VEGF binding sites, D1 and D3 domains, on VEGFR1 (Figure 1A, B and C). We further showed that PIGF-1 and -2 triggered VEGFR1 but not VEGFR2 phosphorylation on ECFC (Supplementary Figure 1), contrary to VEGF-A which activated both receptors (Figure 1D, E, F and Supplementary Figure 1).

To examine PIGF-1 and -2 effects on proliferation, ECFCs were treated with rPIGF (50, 150 and 250 ng/mL) for 72 h. As shown in figure 2A, PIGF-1 and -2 did not significantly promote ECFC proliferation by contrast to VEGF-A. The impact of PIGF on ECFCs migration was investigated using wound-healing assay. Figure 2B shows representative images of ECFCs monolayer just after wounding and 24 hours after incubation with PIGF-1 or -2 (Figure 2B), though no differences were

detected compared to untreated cells (Figure 2C). These migration cell data confirmed results previously published (2, 32). Finally, we used a Matrigel<sup>®</sup> model to examine the capacity of PlGF-1 and -2-activated ECFCs to differentiate into capillary-like structures. Treatment with both PlGF induced a significant increase in ECFC organization into branched structures and pseudotubes with enclosed areas which was similar to the effect observed when cells were stimulated with VEGF (Figure 3). Overall, PlGF-1 and -2 did not modify ECFCs proliferation and migration but stimulated their tubulogenesis potential *in vitro*.

### **VEGFR1 inhibition with siRNA and the chemical compound 4321 decrease ECFC tube formation in vitro.**

As shown in figure 4A, specific siRNA transfection induced a dramatic inhibition of VEGFR1 mRNA expression in ECFC after 48 hours of transfection. We explored the effect of VEGFR1 inhibition on ECFCs angiogenic properties *in vitro*. VEGFR1 inhibition did not modified ECFCs proliferation (Figure 4B) or migration (Figure 4C) while a significant decrease in ECFCs pseudotube formation was observed (Figure 4D,  $p = 0.002$ ). As a control, PlGF-1 and -2 were no more able to stimulate tube formation in VEGFR1 inhibited-ECFC (Figure 4E). In line with these results, ECFC treatment with the specific VEGFR1 inhibitor, the compound 4321, significantly inhibited the endothelial cell tubulogenesis when used at 100  $\mu\text{M}$  (Figure 5C), while no effect was found on proliferation and migration potential (Figure 5A, B).

### **Compound 4321 decreases Matrigel<sup>®</sup>-plug vascularization in C57Bl/6J mice.**

We used the Matrigel<sup>®</sup>-plug assay as a model of *in vivo* angiogenesis. Plugs, with and without 4321 (200  $\mu\text{M}$  = 100nmol per plug), were subcutaneously implanted in C57Bl/6J mice. The plugs were removed 14 days later and their blood vessel content was analyzed. Macroscopic observation showed

that **4321** decreased blood vessel formation in the plugs (Figures 6A), as confirmed by measuring the hemoglobin content (Figure 6B) and the mRNA content of VE-cadherin (Figure 6C).

**Compound 4321 inhibits post-ischemic revascularization in hindlimb ischemia model.**

After showing that the compound **4321** inhibits ECFC tubulogenesis *in vitro*, as well as Matrigel<sup>®</sup>-plug vascularization *in vivo*, we decided to study the compound **4321** in the hindlimb ischemia mouse model. As shown in Figures 6D and 6E, intraperitoneal injections of the compound **4321** induced a significant decrease in blood flow recovery 7 days after surgery (\*\* p = 0.0048). Perfusion ratios mean ( $\Delta$ (D2-D7)%) for the “vehicule” group was about 72.57% +/- 16.21, and only reached 9.93% +/- 11.67 for the “**4321**” group.

## DISCUSSION

PlGF may promote vascular formation by inducing local proliferation of endothelial cells (33) as well as the recruitment of angiogenic bone marrow derived progenitor cells (34, 35). In line with these data, anti-VEGFR1 antibodies suppressed recruitment of myeloid progenitors and transplantation of wild-type bone marrow rescued the impaired collateral vascular growth in PlGF-deficient mice (2). Moreover, either PlGF gene transfer or injection of PlGF protein induced angiogenesis in myocardium. The administration of PlGF improved cardiac performance, stimulated cardiac remodeling and angiogenesis following mouse acute myocardial infarction (36). PlGF infusion was also demonstrated to increase the neovascularization in ischemic hindlimbs of mice (3, 37) and to induce arteriogenesis (38). Interestingly, collateral artery growth was more significant in response to PlGF compared to the VEGFR2-specific ligand VEGF-E(39).

The widespread distribution of VEGFR1 in vascular cells, macrophages, and pericytes might explain the pleiotropic reported role of PlGF. In our work, high PlGF plasma concentrations were found in patients with acute coronary artery disease, i.e. in hypoxic conditions, by contrast to VEGF or endothelial markers, such as soluble thrombomodulin and Gas6. This suggests that a local production of PlGF by cells within the plaque may be at the origin of increased plasma PlGF levels, favoring inflammatory cells recruitment and subsequent plaque complication. Thus, as proposed (7, 40), PlGF plasma levels could be a biomarker of vascular inflammation to modulate recruitment or angiogenic properties of angiogenic cells. During extracorporeal circulation, a situation known to mobilize bone marrow cells upon hypoxia, we found a dramatic increase in PlGF, supporting our conclusions.

The VEGF system is the target of new antiangiogenic treatments, therefore it is important to elucidate the angiogenic potential of VEGF isoforms on ECFCs. A previous study has explored the effect of PlGF and VEGF on CACs derived from human peripheral blood, however, due to the phenotypic and functional differences between CACs and ECFCs, we cannot assume the same results for the later(34).

Angiogenic functions of CACs have been related to growth factor secretion, as they are not able to build vessel by themselves(19). Therefore because endothelial colony forming-cells (ECFCs) are the cells known to be involved in neoangiogenesis process(19, 20), we investigated the effect of VEGFR1 activation by PlGF-1 and -2 on the angiogenic properties of cultured human ECFCs. Interestingly, we found that PlGF promotes ECFCs tubulogenesis on a VEGFR1 dependent mechanism, whereas no effect was observed on proliferation and migration. To the best of our knowledge, it is the first study to explore VEGFR1 activation on this cell type. Since ECFCs have been demonstrated to be mobilized in patients with angiographically significant coronary artery disease (41), together with high PlGF plasma concentrations as described in our work, we may hypothesize that in this pathological setting, a thrombus recanalization and/or an atherosclerotic plaque vascularisation could be involved. These hypothetic roles of ECFC and PlGF sustain the controversy about beneficial or worse effects ascribed to bone marrow mononuclear cells transplantation in the atherosclerotic setting (42, 43).

PlGF induced-VEGFR1 signaling has been associated to inflammation process by regulating migration of leukocytes in tumor or ischemic tissues. Synovial angiogenesis and infiltration by inflammatory cells was reduced by anti-VEGFR1 mAb treatment, which also suppressed the activation of leukocytes and their production of tumor necrosis factor  $\alpha$  and MCP-1, cytokines implicated in arthritis(3). PlGF activation on monocytes also induced an increase in mRNA levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and chemokines MCP-1, MIP-1 and IL-8 (44). Most of these molecules have been shown to modify ECFCs angiogenic properties (45). However, we can exclude such an effect in PlGF-stimulated ECFCs, as no increase in gene expression of TNF, CXCL or CCL families was observed upon PlGF activation (data not shown). Nevertheless, since leukotrienes have been shown to be up regulated by PlGF (46) and interact with VEGF induced angiogenesis (47), we cannot exclude an indirect effect on tubulogenesis related to leukotrienes. One of the mechanisms of PlGF/VEGFR1 effect in tip/stalk cells has been shown to be correlated to Notch signaling (48). Thus, because Notch has been shown to modulate ischemic neoangiogenesis (49) and EPCs angiogenic properties (50, 51), it could be part of the PlGF/VEGFR1

tubulogenic effect. Finally, PlGF can also activate neuropilin-1 (NRP1) (52). Despite high affinity of our recombinant protein for VEGFR1, we cannot exclude an effect of PlGF-1 and -2 on NRP1. However, VEGFR1-siRNA and the chemical compound **4321** having produced the same effect on ECFCs induced angiogenesis and allowed us to affirm that PlGF effect are closely correlated to VEGFR1 activation.

Targeting VEGF is becoming a cornerstone of anticancer therapy. However, PlGF and VEGFR1 were not primarily considered attractive therapeutic targets, because insufficient insight in their role in disease was available. After evidence that PlGF/VEGFR1 had implication in pathological angiogenesis, the therapeutic potential of VEGFR1 and / or PlGF inhibitors to block angiogenesis during ischemic retinopathy, cancer, atherosclerosis and rheumatoid arthritis has been explored. In this context, an emerging strategy to disrupt interaction between VEGFR1 and their ligands could be the discovery of small ligands of the receptor, less expensive than recombinant humanized mAb. Indeed, the modulation of protein-protein interactions with small organic compounds is of huge therapeutic interest, but remains an enormous challenge. In a previous study, we carried out *in silico* and *in vitro* screening experiments with VEGFR1 D2 domain, and 20 compounds inhibiting the formation of the VEGF-VEGFR complex were identified. These small compounds contained a (3-carboxy-2-ureido) thiophen unit, had IC<sub>50</sub> values in the low micromolar range and decreased the auto-phosphorylation of VEGFR1 induced by VEGF. Thus, the best chance of hit for development of new treatments in VEGFR1-dependent diseases is such a promising scaffold to probe this macromolecular complex. The **4321** compound has been then tested in the present study for ECFCs *in vitro* angiogenic potential and *in vivo* in the Matrigel<sup>®</sup>-plug assay and the hindlimb ischemia model. This compound recapitulated all the effects found with PlGF and VEGFR1 siRNA. Moreover, we have here the *in vivo* proof that this compound **4321** is able to decrease vascularization in the two *in vivo* models tested.

In conclusion, PIGF/VEGFR1 modulates ECFC tubulogenesis, the angiogenic human progenitor cell type responsible for newly formed vessels in vivo. VEGFR1 inhibition with the chemical compound **4321**, that recapitulate angiogenic effects related to VEGFR1, might have the potential to modulate angiogenic disorders in future clinical trials.

### **Acknowledgments**

We thank Anna Lokajczyk and Isabelle Galy-Fauroux for their technical assistance in ECFC culture, and the IMTCE animal facilities (Paris-Descartes University). We are indebted to the nursing services of Hôpital des Diaconesses (Paris) and Hôpital des Instructions et des Armées de Begin (Saint Mandé) for providing umbilical cord blood samples.

### **Sources of funding**

Clément d'Audigier and Alexi Yon were supported by a research grant from Fondation pour la Recherche Médicale. This work was supported by research grants from the Leducq TransAtlantic Network of Excellence on Atherothrombosis Research (grant 04CVD01).

**Table 1: Plasma levels of angiogenic factors and endothelial activation markers in patients with coronary artery disease and undergoing cardiac surgery.**

Among those parameters, only PIGF is significantly increased on these pathological settings.

	<b>Coronary Angiogram n = 90</b>			
	<b>stable angina, n=30</b>	<b>acute coronary syndrome, n=30</b>	<b>no coronary disease, n=30</b>	<b>p</b>
<b>VEGF (pg/mL)</b>	25.9 [2.5-72.2]	10.7 [0 ; 83.4]	22.3 [4.4 ; 81.4]	0,12
<b>PIGF (pg/mL)</b>	11.7 [2.6 ; 21.1]	18.4 [6.7 ; 43.8]	10.0 [3.8 ; 20.5]	*** < 0.0001
<b>Cardiac Surgery, all patients n = 53</b>				
	<b>Before</b>	<b>After</b>	<b>p</b>	
<b>VEGF (pg/mL)</b>	9.5 [0-116.9]	0 [0 ; 126.6]	0,06	
<b>PIGF (pg/mL)</b>	11.6 [3.4 ; 50.8]	33.3 [14.1 ; 74.0]	*** < 0.0001	
<b>sTM (ng/mL)</b>	19.6 [0 ; 779.1]	14.9 [0 ; 281.2]	0,22	
<b>Gas6 (µg/mL)</b>	98.8 [121.6-378.8]	94.8 [76.8-266.1]	0,6	
<b>Cardiac Surgery, CABG n = 23</b>				
	<b>Before</b>	<b>After</b>	<b>p</b>	
<b>VEGF (pg/mL)</b>	15.6 [0-54]	0 [0 ; 71.4]	0,25	
<b>PIGF (pg/mL)</b>	12.77 [4.0 ; 50.8]	33.0 [14.1 ; 74.0]	*** 0.0003	
<b>sTM (ng/mL)</b>	21.5 [0 ; 225.3]	19.3 [0 ; 224.0]	0,19	
<b>Gas6 (µg/mL)</b>	103.4 [121.6-378.8]	105.2 [76.8-254.7]	0,81	
<b>Cardiac Surgery, Valve Surgery n = 30</b>				
	<b>Before</b>	<b>After</b>	<b>p</b>	
<b>VEGF (pg/mL)</b>	7.3 [0-116.9]	0 [0 ; 126.4]	0,12	
<b>PIGF (pg/mL)</b>	11.4 [3.48 ; 39.91]	31.4 [15.0 ; 49.8]	*** < 0.0001	
<b>sTM (ng/mL)</b>	19.5 [0 ; 779.1]	14.3 [0 ; 281.2]	0,5	
<b>Gas6 (µg/mL)</b>	90.4 [137.5-327.8]	82.9 [86.6-266.1]	0,4	

## **FIGURE LEGENDS**

### **Figure 1: VEGFR1 activation on ECFCs with recombinant PlGF proteins compared to VEGF-A.**

**A:** “50%” inhibiting concentration determination for PlGF-1

**B:** “50%” inhibiting concentration determination for PlGF-2

**C:** “50%” inhibiting concentration determination for VEGF-A

**D:** Immunoblotting showing VEGFR1 phosphorylation subsequently to ECFCs stimulation by PlGF-1

**E:** Immunoblotting showing VEGFR1 phosphorylation subsequently to ECFCs stimulation by PlGF-2

**F:** Immunoblotting showing VEGFR1 phosphorylation subsequently to ECFCs stimulation by VEGF-A

**G:** P-VEGFR1 immunoblotting quantification: each sample (ECFCs stimulated by PlGF-1, PlGF-2 and VEGF-A) is normalized toward tubulin, then after compared to unstimulated ECFCs. Stimulation by VEGF is shown as a positive control. Both PlGF-1 and -2 are able to trigger VEGFR1 phosphorylation as well as VEGF.

### **Figure 2: Proliferation and migration assay on PlGF-stimulated ECFCs.**

**A:** pNPP proliferation assay on PlGF-stimulated ECFCs: PlGF-1 and -2 did not significantly enhance ECFCs proliferation, whatever the dose used. VEGF stimulation (50 ng/mL) is shown as a positive control.

**B:** Wound healing assay on PlGF-stimulated ECFCs. Left panel: photomicrograph representing the circular wound area at T 0; right panel: photomicrograph representing the same circular wound area at T 24h.

**C:** Wound healing assay quantification. Wound areas were measured with Videomet<sup>®</sup> software, and compared to the initial area (T 0) which represents the “0%” of cell migration. No statistical difference is denoted between unstimulated and PlGF-stimulated ECFCs (250 ng/mL).

**Figure 3: In vitro Matrigel<sup>®</sup> tube formation assay with PlGF-stimulated ECFCs.**

**A:** Left panel: photomicrograph representing unstimulated ECFCs seeded on Matrigel<sup>®</sup> after 18 hours of incubation; middle panel: photomicrograph representing pseudotubes network resulting from PlGF-1-stimulated ECFCs (250 ng/mL) after 18 hours; right panel: photomicrograph representing pseudotubes network resulting from PlGF-2-stimulated ECFCs (250 ng/mL) after 18 hours

**B:** Differentiation assay quantification. Tubule-like structure length quantification was realized with Videomet<sup>®</sup> software. Total length average in EBM2 is represented by the control bar. VEGF-A (50 ng/mL) as well as PlGF-stimulated ECFCs (250 ng/mL) displayed a significant extensive network, compared to the control.

**Figure 4: In vitro angiogenic assays performed with VEGFR1 siRNA-transfected ECFCs.**

**A:** VEGFR1 mRNA level in siRNA transfected ECFCs. VEGFR1 specific siRNA reduced by 80% the expression of the receptor 48 hours after transfection, compared to control siRNA transfected ECFCs.

**B:** pNPP proliferation assay on siRNA-transfected ECFCs. No differences were found between control and VEGFR1 siRNA transfected ECFCs.

**C:** Wound healing assay quantification on siRNA-transfected ECFCs, 4, 8 and 24 hours after practicing the circular wound. No significant result was found between control and VEGFR1 siRNA transfected ECFCs.

**D:** Tubule-like structure length quantification on siRNA-transfected ECFCs, realized with Videomet<sup>®</sup> software. VEGFR1 siRNA transfected ECFCs presented a significant decrease in pseudotubes formation, compared to control-siRNA.

**E:** Tubule-like structure length quantification on VEGFR1 siRNA transfected ECFCs, stimulated by PlGF recombinant proteins. PlGF-1 and -2 (250 ng/mL) were no more able to enhance pseudotubes formation in VEGFR1 inhibited ECFCs.

**Figure 5: Effect of the compound 4321 on ECFCs angiogenic properties.**

**A:** pNPP proliferation assay on 4321-stimulated ECFCs (100  $\mu$ M). No modification in ECFC proliferation potential was observed with the compound 4321 compared to the DMSO control.

**B:** Wound healing assay with 4321-stimulated ECFCs (100  $\mu$ M). No modification in ECFC migration potential was observed with the compound 4321 compared to the DMSO control.

**C:** *In vitro* Matrigel<sup>®</sup> tube formation assay with 4321-stimulated ECFCs (100  $\mu$ M). Tubule-like structure length quantification showed a significant decrease in pseudotubes formation, compared to control.

**Figure 6: In vivo effects of the compound 4321.**

**A:** *In vivo* Matrigel<sup>®</sup>-plug assay. Left panel: DMSO-containing plug removed after 14 days from C57Bl/6J mouse. Right panel: 4321-containing plug removed after 14 days from C57Bl/6J mouse.

**B:** Hemoglobin content analysis in Matrigel<sup>®</sup>-plug. After crushing plugs in appropriate buffer containing protease inhibitors (3 mL for each plug), followed by a 8000 rpm centrifugation, hemoglobin was quantified by spectrophotometry analysis (optical density at 540 nm) in a 1:1 Drabkin's reagent dilution. Hemoglobin concentration in 4321-containing plugs was significantly lower compared to DMSO-containing plugs.

**C:** VE-Cadherin mRNA quantification in Matrigel<sup>®</sup>-plug. After extracting total RNA from frozen Matrigel<sup>®</sup>-plug, CD144 gene expression was quantified by RT-qPCR. VE-Cadherin expression was significantly lower in 4321-containing plugs, compared to control.

**D:** Laser Doppler perfusion imaging at day 7 in the Swiss Nude mouse hindlimb ischemia model. Left: mouse receiving 200 $\mu$ L for 20 g weight of vehicle (ethanol 10%, Cremophor<sup>®</sup> EL 10%, bi-distilled water) by intraperitoneal injection. Right: mouse receiving 200 $\mu$ L for 20 g weight of the compound 4321 (10 mg/kg).

**E:** Perfusion ratios for the Swiss Nude mouse hindlimb ischemiamodel. n = 12 for each group, p = 0.0048.

**Supplemental Figure 1: VEGFR2 activation on ECFCs with recombinant PlGF proteins compared to VEGF-A.**

**A:** Immunoblotting showing VEGFR2 phosphorylation subsequently to ECFCs stimulation by PlGF-1

**B:** Immunoblotting showing VEGFR2 phosphorylation subsequently to ECFCs stimulation by PlGF-2

**C:** Immunoblotting showing VEGFR2 phosphorylation subsequently to ECFCs stimulation by VAGF-A

**D:** P-VEGFR2 immunoblotting quantification: each sample (ECFCs stimulated by PlGF-1, PlGF-2 and VEGF-A) is normalized toward tubulin, then after compared to unstimulated ECFCs. Stimulation by VEGF is shown as a positive control. Both PlGF-1 and -2 are not able to significantly trigger VEGFR1 phosphorylation as compared to VEGF.

## References

1. Hiratsuka S, Maru Y, Okada A, Seiki M, Noda T, Shibuya M. Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis. *Cancer Res.* 2001 Feb 1;61(3):1207-13.
2. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med.* 2001 May;7(5):575-83.
3. Luttun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y, Angelillo-Scherrer A, Liao F, et al. Revascularization of ischemic tissues by PIGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med.* 2002 Aug;8(8):831-40.
4. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature.* 2005 Dec 8;438(7069):820-7.
5. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis.* 2006;9(4):225-30; discussion 31.
6. Mazzone M, Dettori D, Leite de Oliveira R, Loges S, Schmidt T, Jonckx B, et al. Heterozygous deficiency of PHD2 restores tumor oxygenation and inhibits metastasis via endothelial normalization. *Cell.* 2009 Mar 6;136(5):839-51.
7. Heeschen C, Dimmeler S, Fichtlscherer S, Hamm CW, Berger J, Simoons ML, et al. Prognostic value of placental growth factor in patients with acute chest pain. *Jama.* 2004 Jan 28;291(4):435-41.
8. Smadja D, Gaussem P, Roncal C, Fischer AM, Emmerich J, Darnige L. Arterial and venous thrombosis is associated with different angiogenic cytokine patterns in patients with antiphospholipid syndrome. *Lupus.* 2010;19(7):837-43.
9. Wei SC, Tsao PN, Yu SC, Shun CT, Tsai-Wu JJ, Wu CH, et al. Placenta growth factor expression is correlated with survival of patients with colorectal cancer. *Gut.* 2005 May;54(5):666-72.
10. Parr C, Watkins G, Boulton M, Cai J, Jiang WG. Placenta growth factor is over-expressed and has prognostic value in human breast cancer. *Eur J Cancer.* 2005 Dec;41(18):2819-27.
11. Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, Zacchigna S, Loges S, Pattarini L, et al. Anti-PIGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell.* 2007 Nov 2;131(3):463-75.
12. Khurana R, Moons L, Shafi S, Luttun A, Collen D, Martin JF, et al. Placental growth factor promotes atherosclerotic intimal thickening and macrophage accumulation. *Circulation.* 2005 May 31;111(21):2828-36.
13. Roncal C, Buyschaert I, Gerdes N, Georgiadou M, Ovchinnikova O, Fischer C, et al. Short-term delivery of anti-PIGF antibody delays progression of atherosclerotic plaques to vulnerable lesions. *Cardiovasc Res.* 2010 Apr 1;86(1):29-36.
14. Van de Veire S, Stalmans I, Heindryckx F, Oura H, Tijeras-Raballand A, Schmidt T, et al. Further pharmacological and genetic evidence for the efficacy of PIGF inhibition in cancer and eye disease. *Cell.* 2010 Apr 2;141(1):178-90.
15. Smadja DM, Cornet A, Emmerich J, Aiach M, Gaussem P. Endothelial progenitor cells: characterization, in vitro expansion, and prospects for autologous cell therapy. *Cell Biol Toxicol.* 2007 Jul;23(4):223-39.

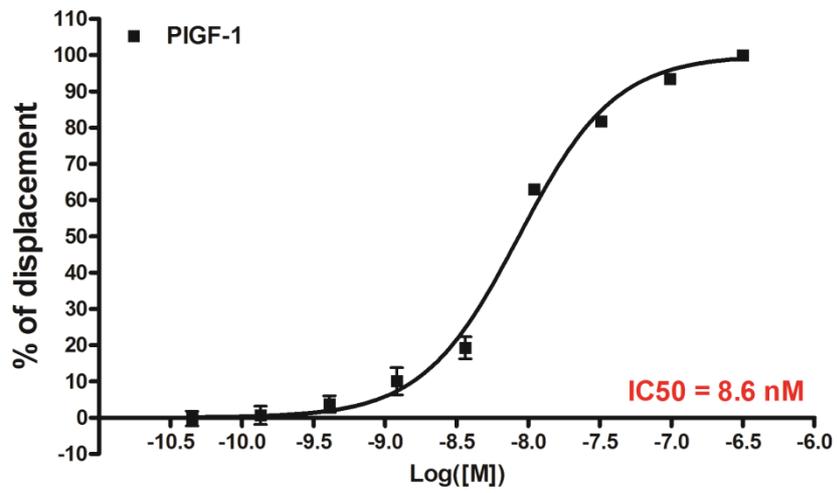
16. Gao D, Nolan D, McDonnell K, Vahdat L, Benezra R, Altorki N, et al. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells contribute to the angiogenic switch in tumor growth and metastatic progression. *Biochim Biophys Acta*. 2009 May 19.
17. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2003 Feb 13;348(7):593-600.
18. 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 neovasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Feb;24(2):288-93.
19. Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*. 2007 Mar 1;109(5):1801-9.
20. Smadja DM, Bieche I, Silvestre JS, Germain S, Cornet A, Laurendeau I, et al. Bone morphogenetic proteins 2 and 4 are selectively expressed by late outgrowth endothelial progenitor cells and promote neoangiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Dec;28(12):2137-43.
21. Smadja DM, Bieche I, Helley D, Laurendeau I, Simonin G, Muller L, et al. 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*. 2007 Sep-Oct;11(5):1149-61.
22. Gautier B, Miteva MA, Goncalves V, Huguenot F, Coric P, Bouaziz S, et al. Targeting the proangiogenic VEGF-VEGFR protein-protein interface with drug-like compounds by in silico and in vitro screening. *Chem Biol*. 2011 Dec 23;18(12):1631-9.
23. Borgel D, Durand E, Clauser S, Bachelot-Loza C, Peyrard S, Remones V, et al. Plasma Gas6 levels and coronary artery disease. *Thromb Haemost*. 2009 Jan;101(1):215-6.
24. Smadja DM, Godier A, Susen S, Packard RR, Fabiani JN, Aiach M, et al. Endothelial progenitor cells are selectively mobilised immediately after coronary artery bypass grafting or valve surgery. *Thromb Haemost*. 2009 May;101(5):983-5.
25. Clauser S, Peyrard S, Gaussem P, Crespin M, Emmerich J, Aiach M, et al. Development of a novel immunoassay for the assessment of plasma Gas6 concentrations and their variation with hormonal status. *Clin Chem*. 2007 Oct;53(10):1808-13.
26. Goncalves V, Gautier B, Garbay C, Vidal M, Inguibert N. Development of a chemiluminescent screening assay for detection of vascular endothelial growth factor receptor 1 ligands. *Anal Biochem*. 2007 Jul 1;366(1):108-10.
27. Goncalves V, Gautier B, Coric P, Bouaziz S, Lenoir C, Garbay C, et al. Rational design, structure, and biological evaluation of cyclic peptides mimicking the vascular endothelial growth factor. *J Med Chem*. 2007 Oct 18;50(21):5135-46.
28. Goncalves V, Gautier B, Garbay C, Vidal M, Inguibert N. Structure-based design of a bicyclic peptide antagonist of the vascular endothelial growth factor receptors. *J Pept Sci*. 2008 Jun;14(6):767-72.
29. Smadja DM, Bieche I, Uzan G, Bompais H, Muller L, Boisson-Vidal C, et al. PAR-1 activation on human late endothelial progenitor cells enhances angiogenesis in vitro with upregulation of the SDF-1/CXCR4 system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Nov;25(11):2321-7.
30. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*. 2009 Dec;30(16):2785-91.

31. Foubert P, Silvestre JS, Souttou B, Barateau V, Martin C, Ebrahimian TG, et al. PSGL-1-mediated activation of EphB4 increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells. *J Clin Invest.* 2007 Jun;117(6):1527-37.
32. Bompais H, Chagraoui J, Canron X, Crisan M, Liu XH, Anjo A, et al. Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood.* 2004 Apr 1;103(7):2577-84.
33. Dull RO, Yuan J, Chang YS, Tarbell J, Jain RK, Munn LL. Kinetics of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor synergy in endothelial hydraulic conductivity and proliferation. *Microvasc Res.* 2001 Mar;61(2):203-10.
34. Li B, Sharpe EE, Maupin AB, Teleron AA, Pyle AL, Carmeliet P, et al. VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *Faseb J.* 2006 Jul;20(9):1495-7.
35. Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B, et al. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med.* 2002 Aug;8(8):841-9.
36. Roncal C, Buyschaert I, Chorianopoulos E, Georgiadou M, Meilhac O, Demol M, et al. Beneficial effects of prolonged systemic administration of PlGF on late outcome of post-ischaemic myocardial performance. *J Pathol.* 2008 Oct;216(2):236-44.
37. Tamarat R, Silvestre JS, Le Ricousse-Roussanne S, Barateau V, Lecomte-Raclet L, Clergue M, et al. Impairment in ischemia-induced neovascularization in diabetes: bone marrow mononuclear cell dysfunction and therapeutic potential of placenta growth factor treatment. *Am J Pathol.* 2004 Feb;164(2):457-66.
38. Scholz D, Elsaesser H, Sauer A, Friedrich C, Luttun A, Carmeliet P, et al. Bone marrow transplantation abolishes inhibition of arteriogenesis in placenta growth factor (PlGF) -/- mice. *J Mol Cell Cardiol.* 2003 Feb;35(2):177-84.
39. Pipp F, Heil M, Issbrucker K, Ziegelhoeffer T, Martin S, van den Heuvel J, et al. VEGFR-1-selective VEGF homologue PlGF is arteriogenic: evidence for a monocyte-mediated mechanism. *Circ Res.* 2003 Mar 7;92(4):378-85.
40. Lenderink T, Heeschen C, Fichtlscherer S, Dimmeler S, Hamm CW, Zeiher AM, et al. Elevated placental growth factor levels are associated with adverse outcomes at four-year follow-up in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol.* 2006 Jan 17;47(2):307-11.
41. Guven H, Shepherd RM, Bach RG, Capoccia BJ, Link DC. The number of endothelial progenitor cell colonies in the blood is increased in patients with angiographically significant coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2006 Oct 17;48(8):1579-87.
42. Silvestre JS, Gojova A, Brun V, Potteaux S, Esposito B, Duriez M, et al. Transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells in ischemic apolipoprotein E-knockout mice accelerates atherosclerosis without altering plaque composition. *Circulation.* 2003 Dec 9;108(23):2839-42.
43. Roncalli J, Mouquet F, Piot C, Trochu JN, Le Corvoisier P, Neuder Y, et al. Intracoronary autologous mononucleated bone marrow cell infusion for acute myocardial infarction: results of the randomized multicenter BONAMI trial. *Eur Heart J.* 2011 Jul;32(14):1748-57.
44. Selvaraj SK, Giri RK, Perelman N, Johnson C, Malik P, Kalra VK. Mechanism of monocyte activation and expression of proinflammatory cytochemokines by placenta growth factor. *Blood.* 2003 Aug 15;102(4):1515-24.

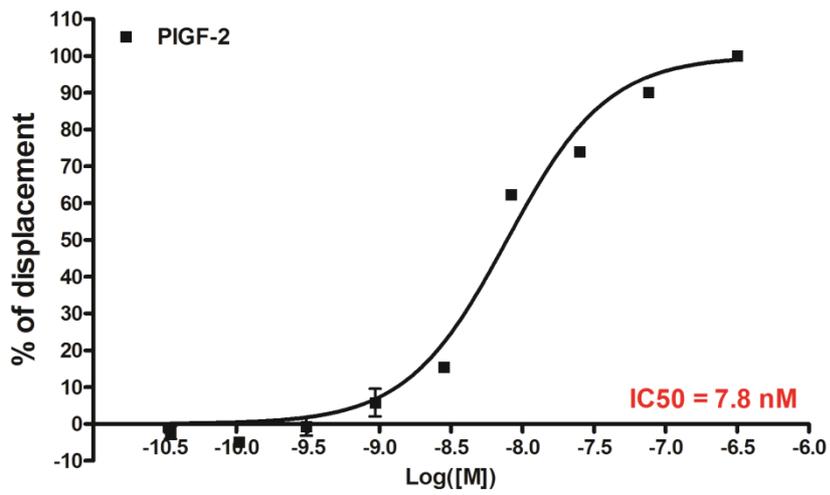
45. Smadja DM, Bieche I, Susen S, Mauge L, Laurendeau I, d'Audigier C, et al. Interleukin 8 is differently expressed and modulated by PAR-1 activation in early and late endothelial progenitor cells. *J Cell Mol Med*. 2009 Aug;13(8B):2534-46.
46. Patel N, Kalra VK. Placenta growth factor-induced early growth response 1 (Egr-1) regulates hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2010 Jul 2;285(27):20570-9.
47. Kim GY, Lee JW, Cho SH, Seo JM, Kim JH. Role of the low-affinity leukotriene B4 receptor BLT2 in VEGF-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Jun;29(6):915-20.
48. Funahashi Y, Shawber CJ, Vorontchikhina M, Sharma A, Outtz HH, Kitajewski J. Notch regulates the angiogenic response via induction of VEGFR-1. *J Angiogenes Res*. 2010;2(1):3.
49. Al Haj Zen A, Oikawa A, Bazan-Peregrino M, Meloni M, Emanuelli C, Madeddu P. Inhibition of delta-like-4-mediated signaling impairs reparative angiogenesis after ischemia. *Circ Res*. 2010 Jul 23;107(2):283-93.
50. Ii M, Takeshita K, Ibusuki K, Luedemann C, Wecker A, Eaton E, et al. Notch signaling regulates endothelial progenitor cell activity during recovery from arterial injury in hypercholesterolemic mice. *Circulation*. 2010 Mar 9;121(9):1104-12.
51. Kwon SM, Eguchi M, Wada M, Iwami Y, Hozumi K, Iwaguro H, et al. Specific Jagged-1 signal from bone marrow microenvironment is required for endothelial progenitor cell development for neovascularization. *Circulation*. 2008 Jul 8;118(2):157-65.
52. Roskoski R, Jr. VEGF receptor protein-tyrosine kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Oct 24;375(3):287-91.

Figure  
Figure 1  
[Click here to download Figure: Fig 1\\_A-C.pptx](#)

A



B



C

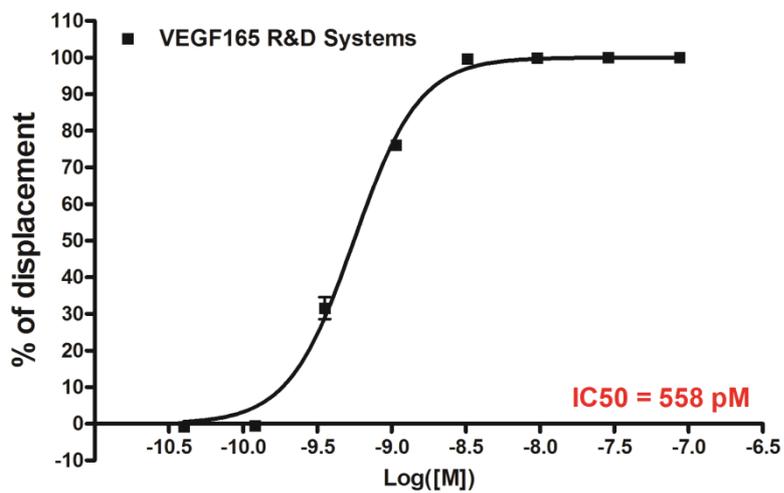


Figure 1  
[Click here to download Figure: Fig 1\\_D-G.pptx](#)

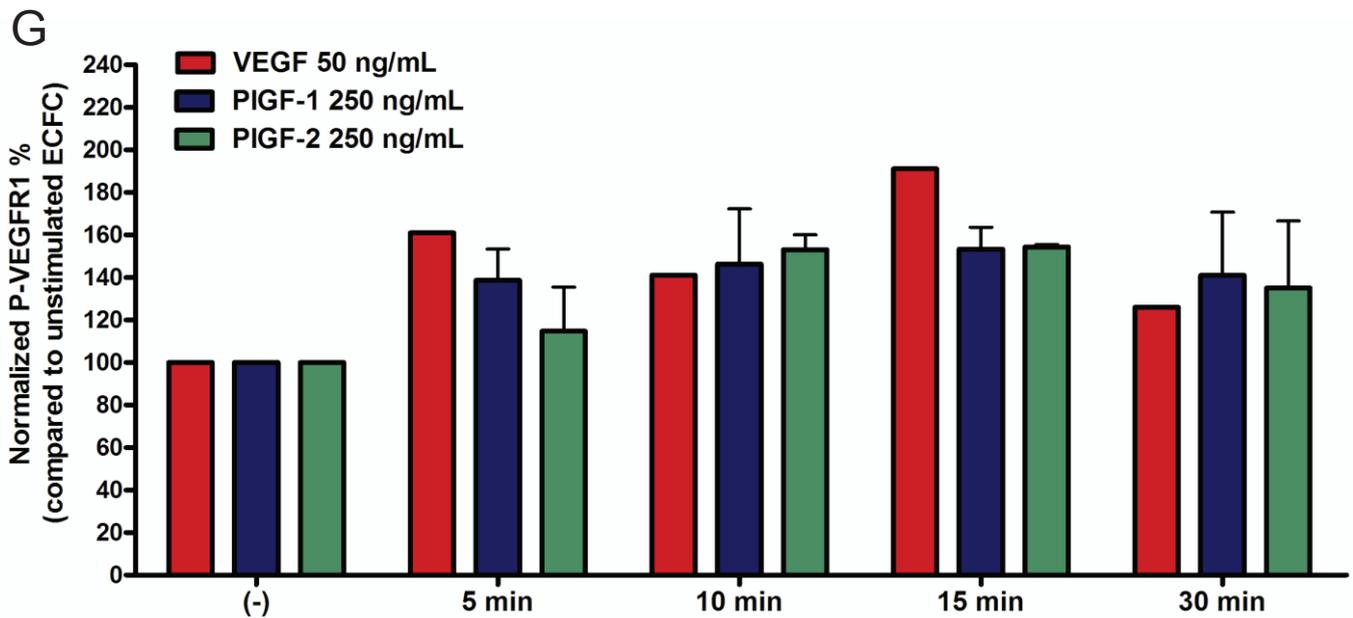
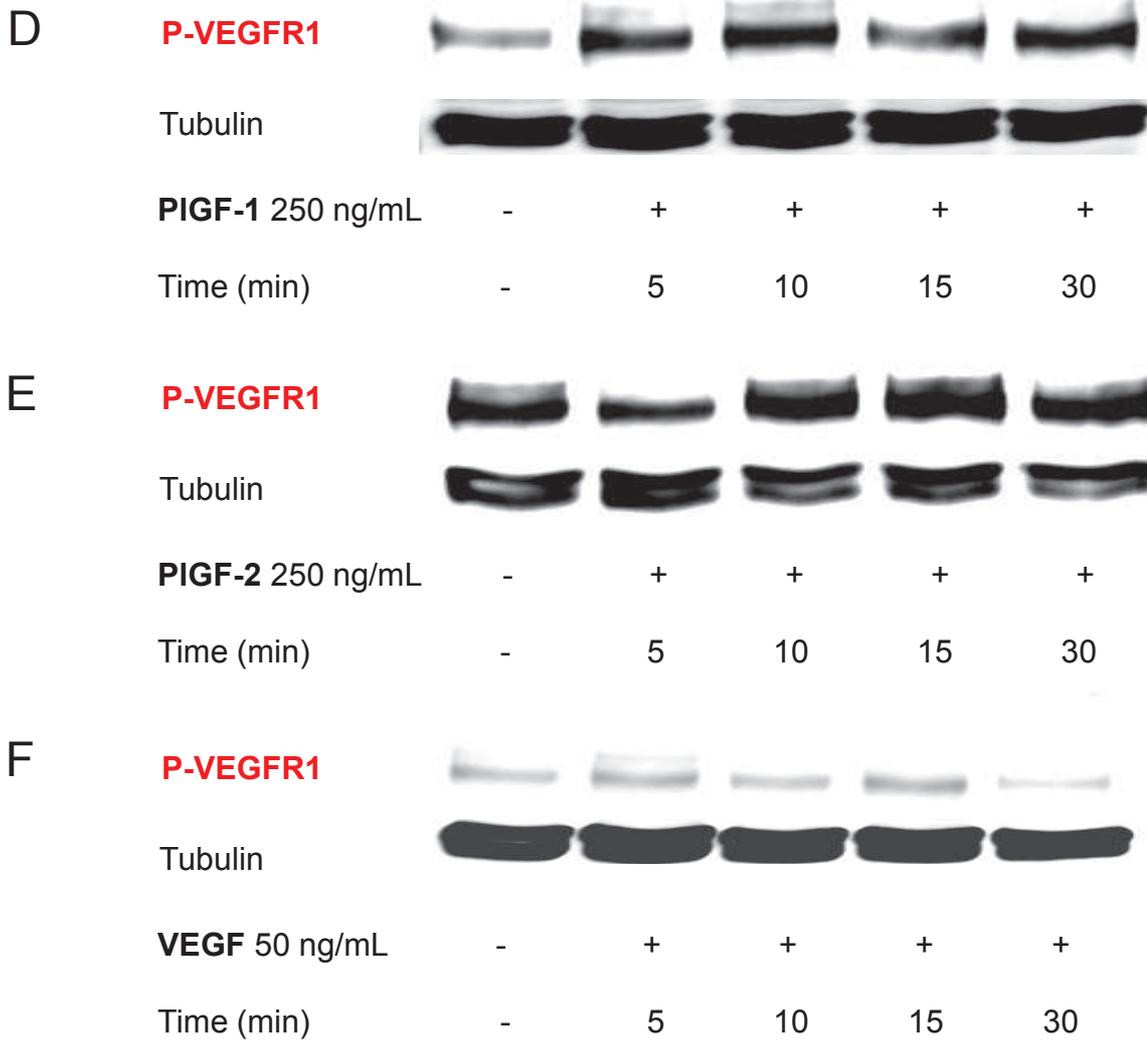
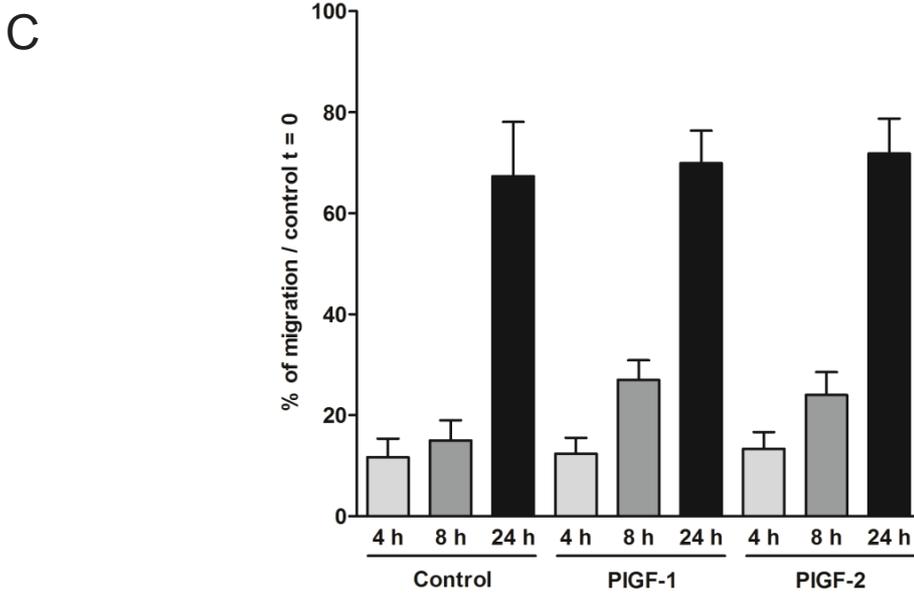
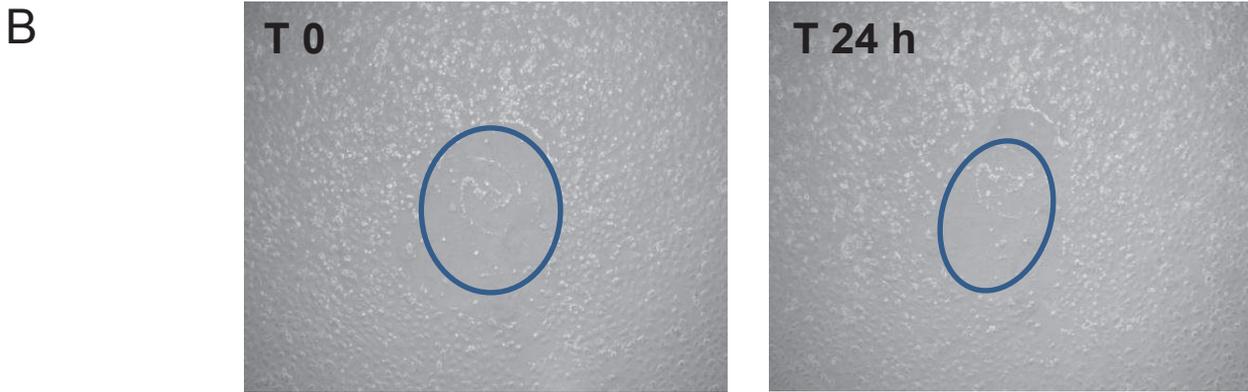
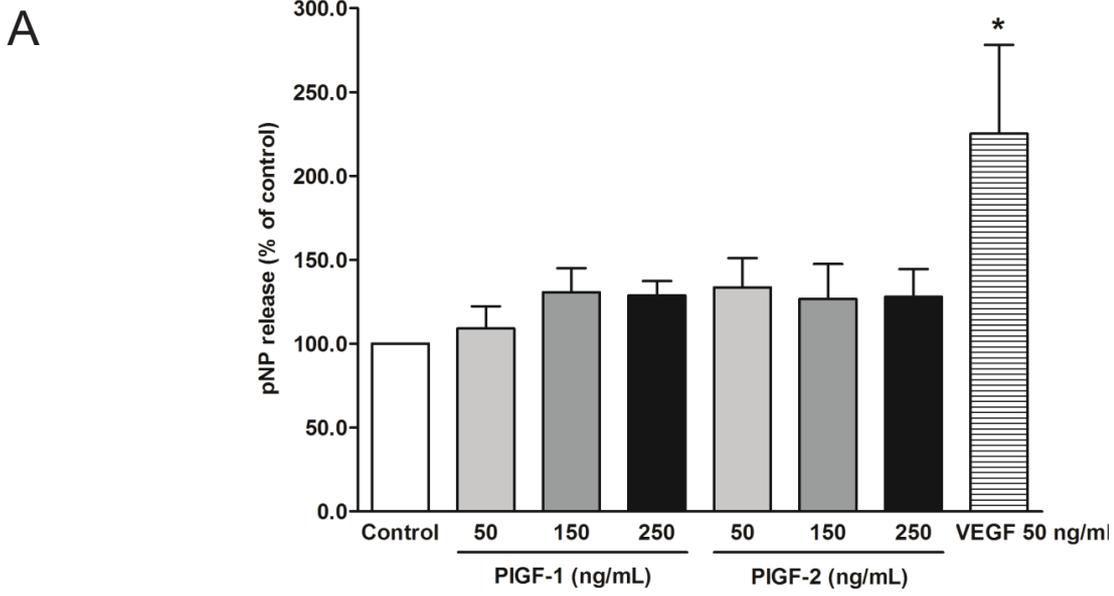
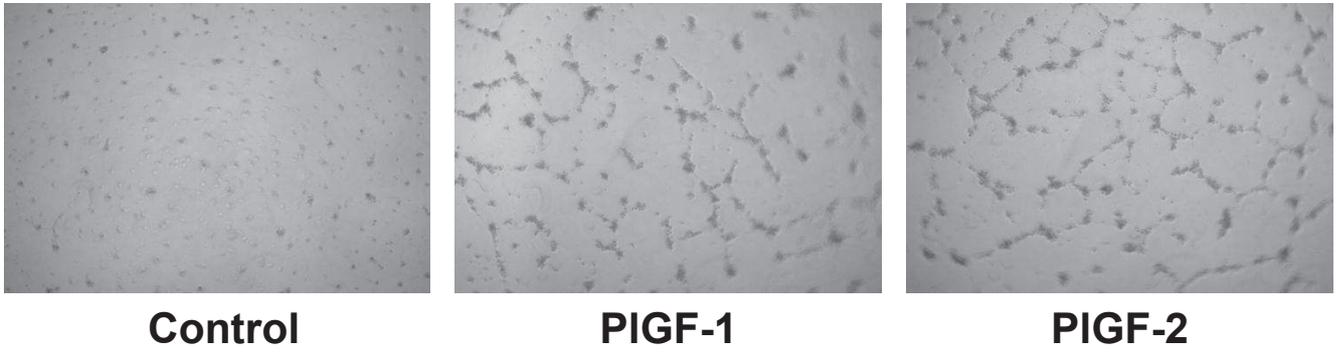


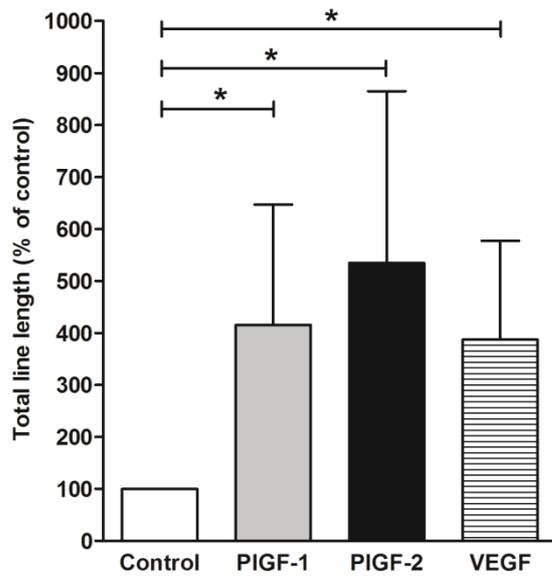
Figure  
Figure 2  
[Click here to download Figure: Fig 2.pptx](#)



A



B



Figure

# Figure 4

[Click here to download Figure: Fig 4.pptx](#)

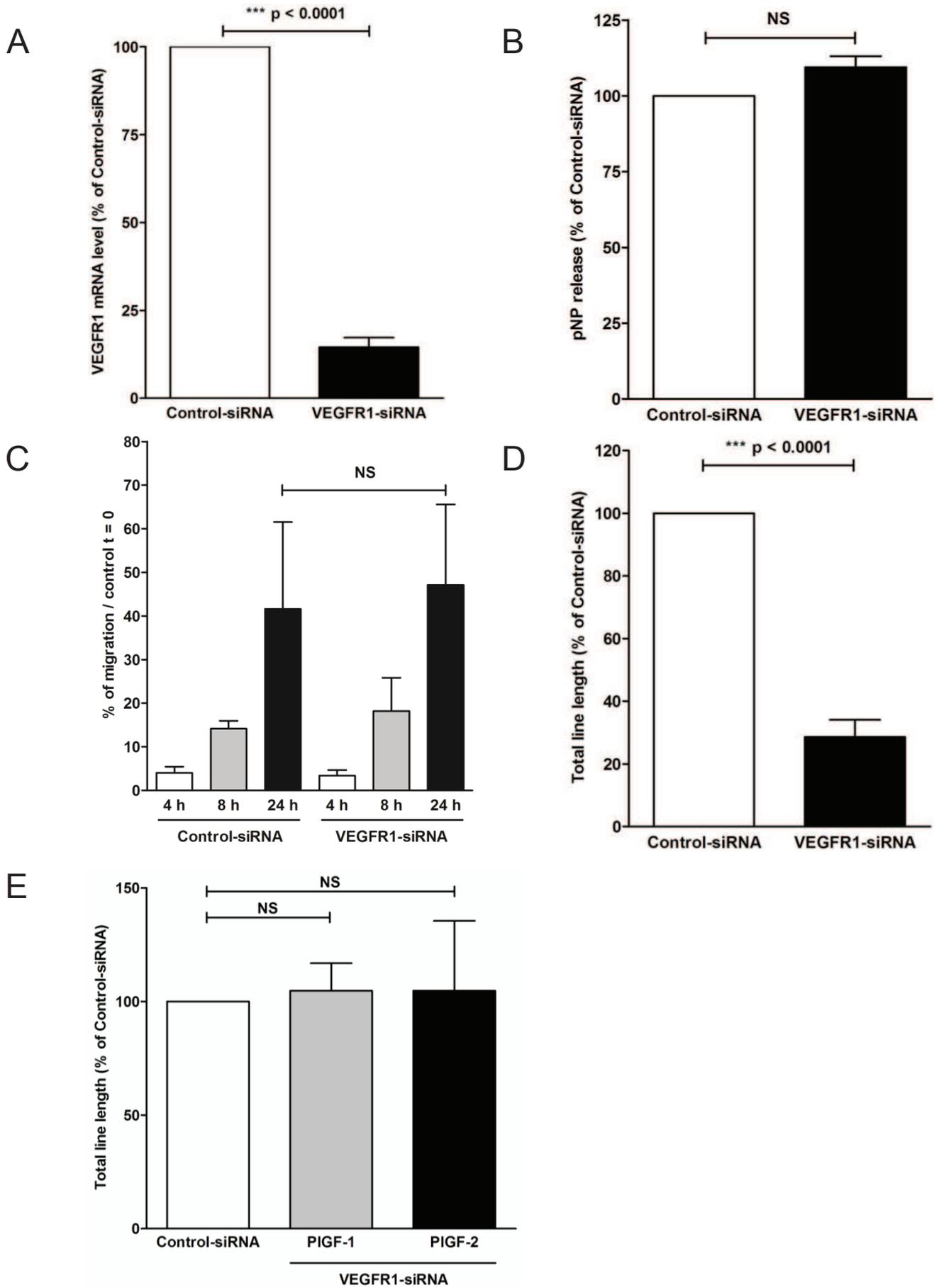


Figure  
Figure 5  
[Click here to download Figure: Fig 5.pptx](#)

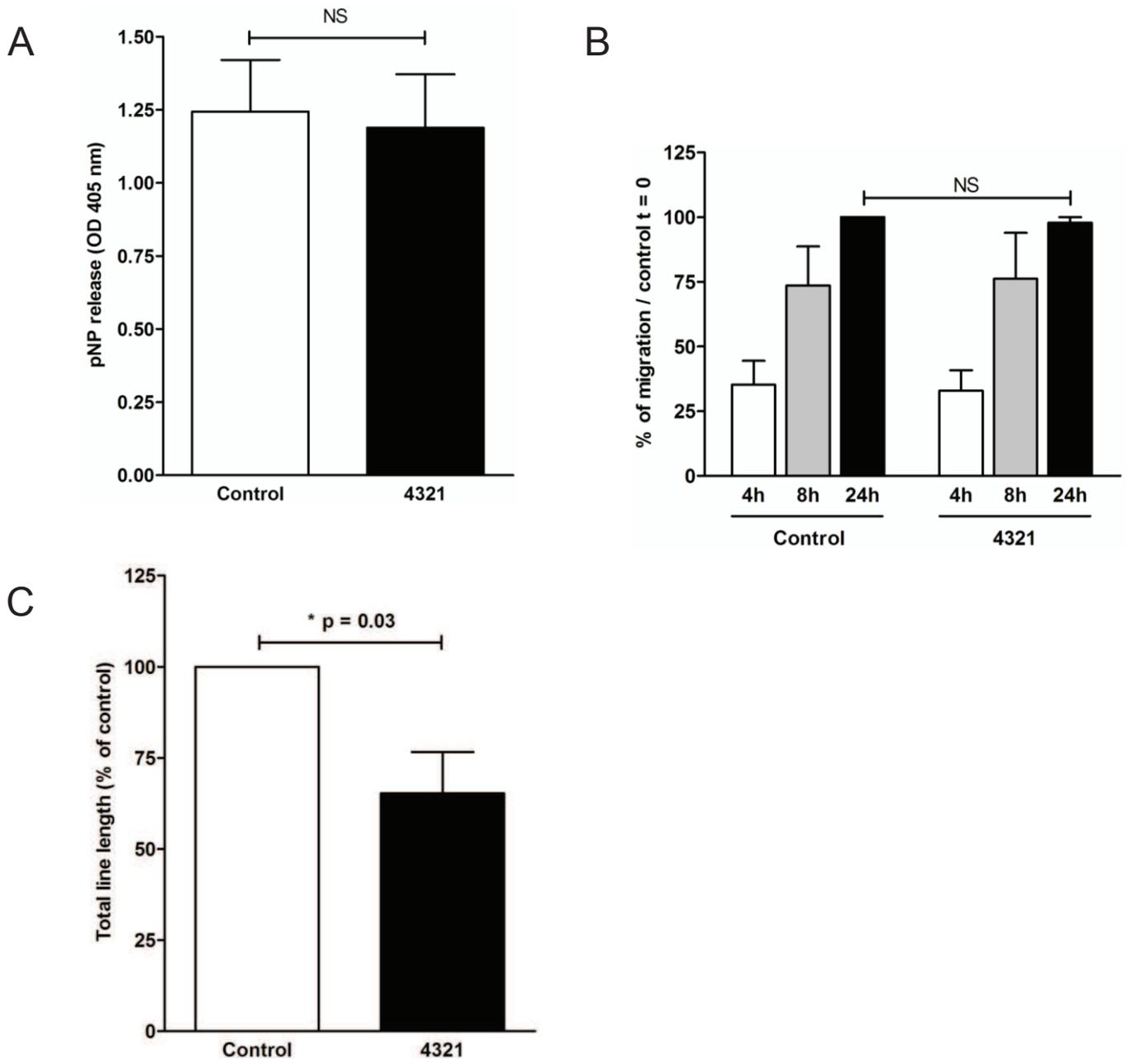


Figure  
Figure 6  
[Click here to download Figure: Fig 6.pptx](#)

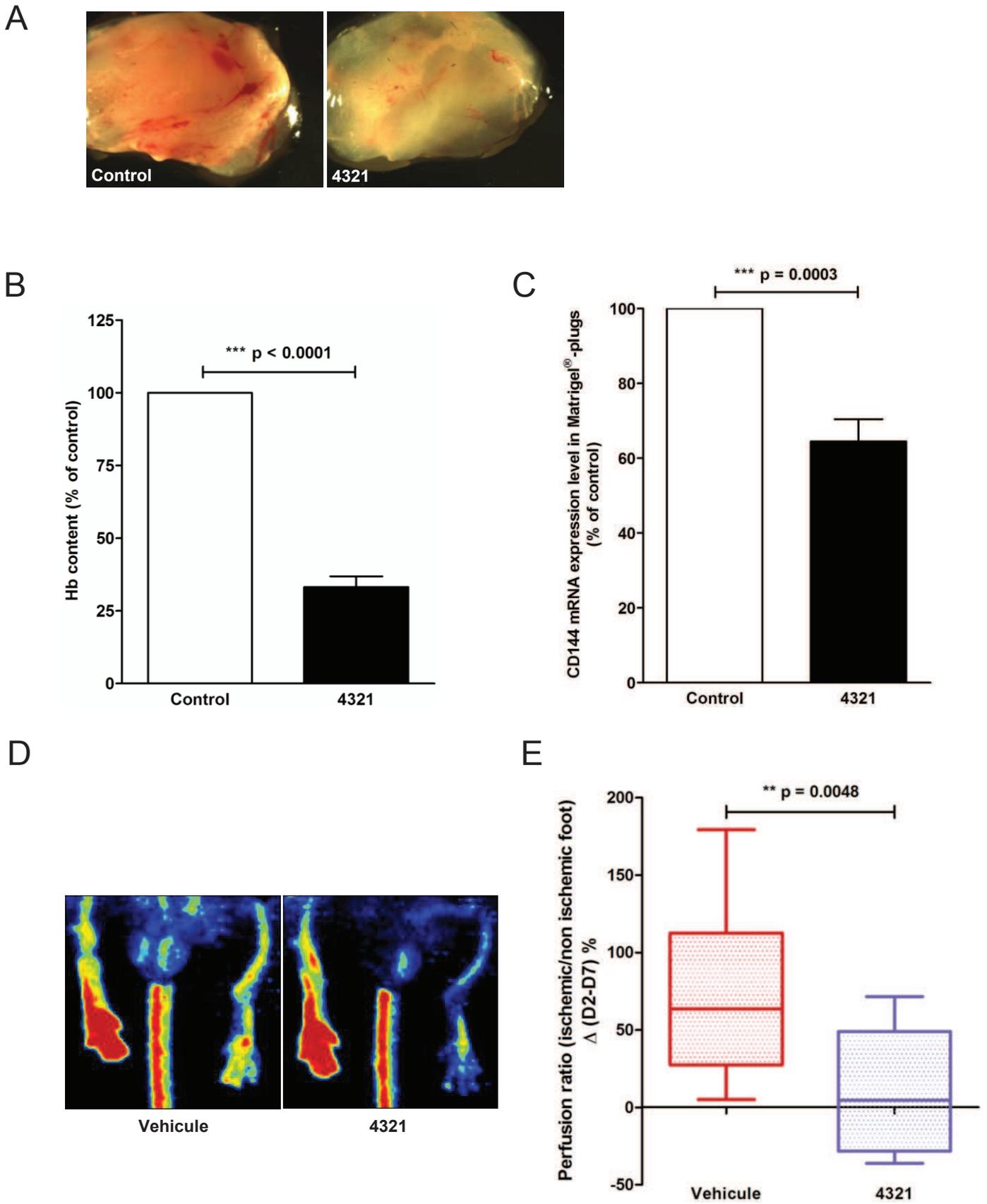
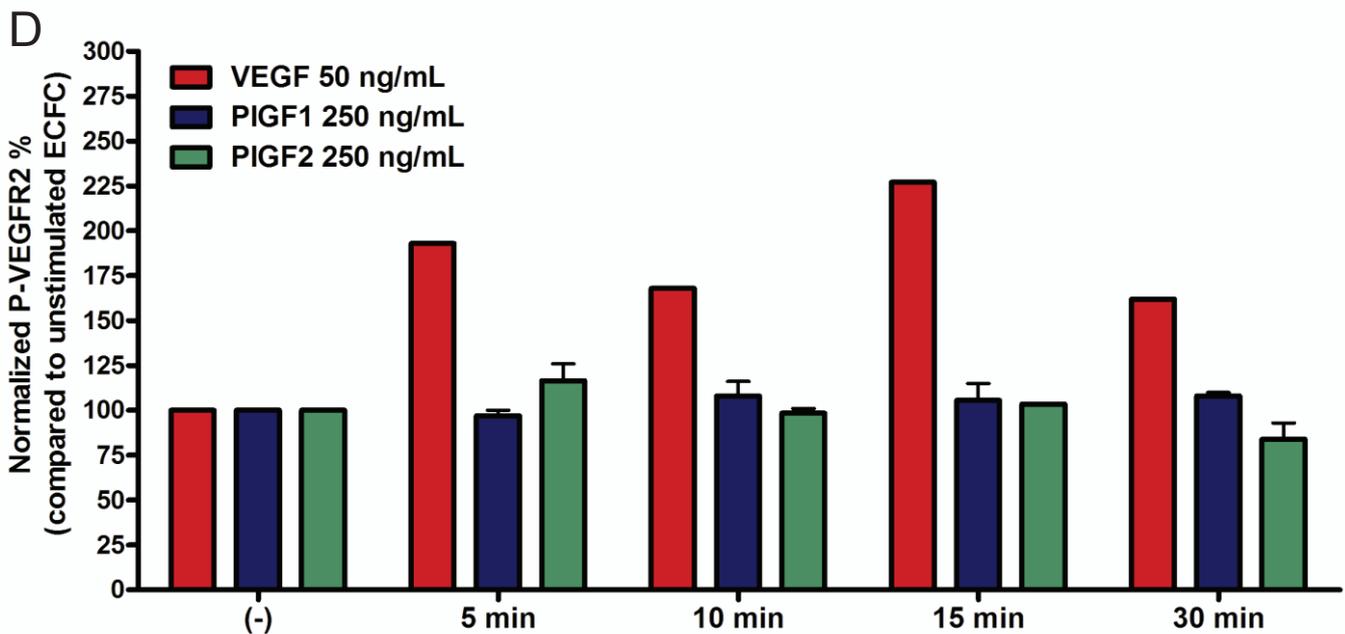
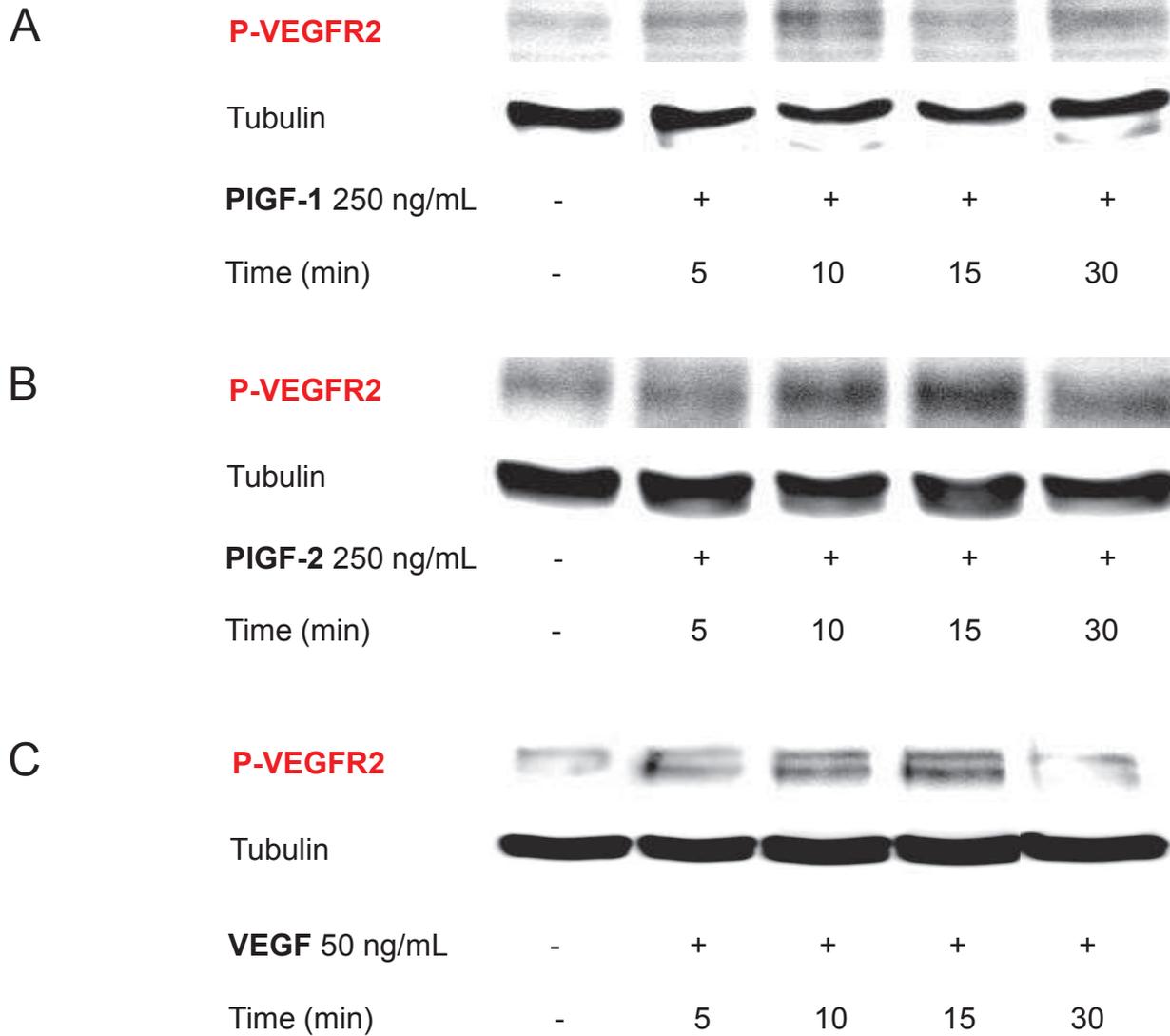


Figure  
[Click here to download Figure1\\_Sup\\_Fig\\_1.pptx](#)



# SYNTHESE DES RESULTATS, DISCUSSION ET PERSPECTIVES GENERALES



Les situations pathologiques constituant les modèles d'étude des travaux présentés dans ma thèse dressent donc des cadres où les ECFC pourraient intervenir soit dans la pathogenèse des anomalies vasculaires, soit dans des tentatives de revascularisation, dans ces contextes de fibrose ou d'ischémie artérielle où a lieu un remodelage vasculaire. Dans un premier temps nous avons pu identifier un potentiel biomarqueur plasmatique vasculaire dans chacune de ces 3 situations pathologiques, ces biomarqueurs étant des facteurs modulant l'angiogenèse, ayant un rôle mécanistique probable dans la genèse de la maladie ou dans les phénomènes réactionnels déclenchés précocement ou plus tardivement lorsque l'ischémie devient chronique ; de plus, ces biomarqueurs mettent potentiellement en scène les ECFC, ce qui nous permet donc de mieux décrire et comprendre les rôles biologiques de ces cellules.

### ***Anomalies vasculaires associées à la fibrose***

Dans le contexte de la FPI, le rôle principal du TGF- $\beta$ 1 reste la stimulation de la fibrogenèse via l'activation des fibroblastes, et en induisant des transitions épithéliale-mésenchymateuses et endothéliale-mésenchymateuses. Cependant nos résultats suggèrent un rôle additionnel du TGF- $\beta$ 1 via la modulation des propriétés angiogènes des ECFC (recrutement des ECFC à partir de la moelle osseuse ou du poumon, augmentation de leur prolifération aboutissant à un remodelage vasculaire pulmonaire aberrant), attribuant donc un rôle pathologique aux ECFC dans la FPI. En effet, les ECFC pourraient participer à la pathogenèse de la FPI, soit en augmentant la vascularisation du tissu fibrotique (et en contribuant donc à son développement de façon indirecte, le TGF- $\beta$ 1 augmentant la viabilité et le potentiel migratoire des ECFC), soit en subissant une transition endothéliale-mésenchymateuse et en participant de façon plus directe à la fibrose pulmonaire (le TGF- $\beta$ 1 étant associé à signal pro-fibrotique via l'activation de la voie Wnt), soit par l'association de ces 2 mécanismes.

Notre équipe a décrit que DKK1, un antagoniste de la voie Wnt, augmente les potentiels prolifératif et migratoire des ECFC<sup>843</sup>, de façon comparable au TGF- $\beta$ 1. Il pourrait alors être intéressant d'explorer aussi bien au niveau plasmatique qu'au niveau de biopsies pulmonaires l'expression du DKK1 chez des patients FPI. Une hypothèse envisageable serait de trouver des taux plasmatiques élevés de DDK1, qui favoriseraient le « homing » pulmonaire des ECFC, combinés à une localisation pulmonaire de DKK1 plus faible, ce qui n'inhiberait pas une transition endothéliale-mésenchymateuse.

### ***Pathologies artérielles périphériques et situation d'ischémie chronique***

Dans ce modèle d'ischémie et d'inflammation chroniques, l'augmentation des concentrations plasmatiques des TSP-1 observée contribuerait à une inefficacité de la vasculogenèse post-natale médiée par les ECFC, assimilable à une décompensation de la maladie par rapport à des stades plus précoces de l'AMI. La TSP-1 dans ce contexte présenterait donc des caractéristiques de biomarqueur pronostique. Cette néovascularisation inefficace pourrait par ailleurs être initiée par les facteurs de risques cardiovasculaires eux-mêmes, qui contribuent au développement de cette pathologie athérosclérotique. Dans ce contexte d'ischémie chronique, ces facteurs de risques cardiovasculaires pourraient contrebalancer l'effet pro-angiogène de l'inflammation.

## ***Pathologies artérielles coronaires et situation d'ischémie aiguë***

La revue de la littérature sur les progéniteurs endothéliaux humains constituant la première partie de ma thèse souligne l'importance des facteurs de risque cardiovasculaire comme paramètres modulant le nombre et la fonctionnalité des progéniteurs endothéliaux. Les pathologies cardiaques qui se développent en rapport avec ces facteurs de risque constituent donc naturellement des potentiels modèles pathologiques d'étude afin de mieux décrire le rôle des progéniteurs endothéliaux et plus précisément des ECFC dans ces pathologies, ainsi que leurs propriétés biologiques.

Dans le contexte des SCA, le taux plasmatique de PIGF pourrait donc constituer un biomarqueur reflétant une conséquence immédiate de l'ischémie myocardique aiguë, c'est-à-dire une sécrétion au moins en partie locale de PIGF par les éléments constituant la plaque d'athérosclérose. Dans cette hypothèse, le PIGF pourrait contribuer à mobiliser des cellules vasculogéniques dont les ECFC, mais davantage que leur mobilisation, le PIGF stimulerait la différenciation des ECFC en structures vasculaires. Le PIGF, associé à des cytokines pro-inflammatoires contribuerait à compenser / limiter les effets délétères de l'ischémie aiguë en facilitant la néovascularisation post-ischémique.

## ***Inflammation et remodelage vasculaire***

De ces trois études, il ressort que les ECFC peuvent être impliquées dans des phénomènes de remodelage vasculaire, remodelage qui a une contribution différente dans le déroulement de la maladie selon la pathologie concernée. L'inflammation est aussi une composante qui a son importance aussi bien dans la FPI, l'AMI que dans les SCA. Dans la FPI, l'inflammation intervient dans le développement de la fibrose (cytokines et chimiokines pro-inflammatoires favorisant l'activation du TGF- $\beta$ , macrophages libérant des protéases et du TGF- $\beta$  latent... cf § 1.3.3.1.3.). Au cours de l'AMI, l'inflammation dans une première étape pourrait favoriser l'initiation de la néovascularisation médiée par les ECFC, qui serait ensuite freinée par l'augmentation des concentrations plasmatiques de TSP-1 ; alors que dans les SCA, l'effet de l'inflammation sur la néovascularisation post-ischémique immédiate pourrait être synergique à l'effet du PIGF.

Notre équipe a particulièrement étudié les effets de l'activation du PAR-1 des ECFC, par la thrombine, enzyme multifonctionnelle qui a entre autres des propriétés pro-inflammatoires. L'activation du PAR-1 des ECFC stimule notamment l'expression des chimiokines pro-inflammatoires CCL2 et CCL3, ayant un effet autocrine pro-angiogène (augmentation des potentiels de tubulogénèse et de migration des ECFC) mais également paracrine en favorisant le recrutement de monocytes et de polynucléaires neutrophiles. Cette stimulation d'expression de CCL2 et CCL3 passant par un mécanisme COX-2 dépendant (article en cours de finalisation). Ces effets de l'inflammation via l'activation du PAR-1 des ECFC sont des éléments qui sont probablement à prendre en compte dans ces trois contextes pathologiques.

## ***Conclusion générale***

Les 3 études présentées dans cette thèse décrivent donc différentes situations où peuvent être impliqués les ECFC : les anomalies vasculaires associées à la fibrose, les pathologies

ischémiques et cardiovasculaires en situation chronique et aigue. A notre connaissance, elles constituent les premières études où sont évalués à la fois *in vitro* et *in vivo*, les effets du TGF- $\beta$ 1, de la TSP-1 et du PIGF sur les propriétés angiogènes des ECFC, ces protéines se présentant comme des biomarqueurs plasmatiques vasculaires potentiels dans la FPI, l'AOMI et les SCA respectivement. Les résultats de ces travaux apportent de nouvelles données concernant le comportement des ECFC vis-à-vis de ces protéines plasmatiques. Déterminer le niveau de contribution de ces protéines en tant que biomarqueur plasmatique vasculaire à visée diagnostique, pronostique, ou de suivi, nécessite cependant des études cliniques complémentaires. Dans cette optique, il serait intéressant d'évaluer de nouvelles stratégies de biomarqueurs multiples dans ces pathologies, et d'essayer d'établir des scores cliniques permettant une meilleure prise en charge des patients.

Ces pathologies humaines où une mobilisation des ECFC est probable, posent également la question du rôle possible des ECFC en tant que biomarqueur. Notre équipe a d'ailleurs récemment montré que le taux d'ECFC chez les patients atteints de FPI avait une tendance (non significative) à être inférieur par rapports à celui des sujets contrôles, pouvant refléter un phénomène de « homing » des ECFC du tissu pulmonaire fibrotique. Le taux de CFU-EC quant à lui était significativement plus bas chez les patients FPI que chez les contrôles. Les taux de PEC (CFU-EC et ECFC) étaient par contre inversement corrélés à la DLCO chez les patients atteints de FPI <sup>263</sup>.

Dans le domaine du développement d'un produit de thérapie cellulaire utilisable dans les pathologies ischémiques, les résultats de ces 3 études confirment que les ECFC restent un candidat intéressant, même si l'expansion de ce type cellulaire à l'échelle industrielle reste un problème d'actualité. La possibilité de réorienter les cellules souches pluripotentes reprogrammées (« *induced Pluripotent Stem Cells* », iPSC) vers la lignée endothéliale représente une voie intéressante pour franchir cet obstacle. Les produits de thérapie cellulaire combinés (par exemple, progéniteurs endothéliaux associés aux cellules souches mésenchymateuses) semblent également constituer une nouvelle piste prometteuse dans les pathologies ischémiques d'après les résultats des études précliniques déjà disponibles.

Nos différents travaux montrent que l'utilisation potentielle d'ECFC comme produit de thérapie cellulaire doit tenir compte de l'influence de l'environnement pathologique sur les propriétés angiogènes des ECFC. Dans l'AMI par le biais de la TSP-1, les propriétés pro-angiogènes des ECFC seraient diminuées et ces cellules pourraient donc rencontrer des difficultés à s'implanter au niveau des sites ischémiés ; il serait envisageable dans ce contexte d'utiliser les ECFC combinés à un anticorps bloquant l'effet anti-angiogène de la TSP-1. Dans les SCA via le PIGF, l'environnement est plutôt pro-angiogène donc potentiellement favorable à l'implantation des ECFC ; une des possibilités pour optimiser les ECFC dans ce contexte serait de préconditionner ces ECFC de manière à surexprimer leur VEGFR1. Enfin dans la FPI via l'effet du TGF- $\beta$ 1, malgré son action pro-angiogène vis-à-vis des ECFC, l'augmentation de leur participation au développement de la fibrose ne peut être exclue, notamment par l'induction d'une transition endothéliale-mésenchymateuse.

L'expansion des ECFC et leur optimisation en fonction du contexte pathologique ciblé représentent ainsi les principaux freins à l'utilisation d'ECFC dans des essais cliniques de thérapie cellulaire.

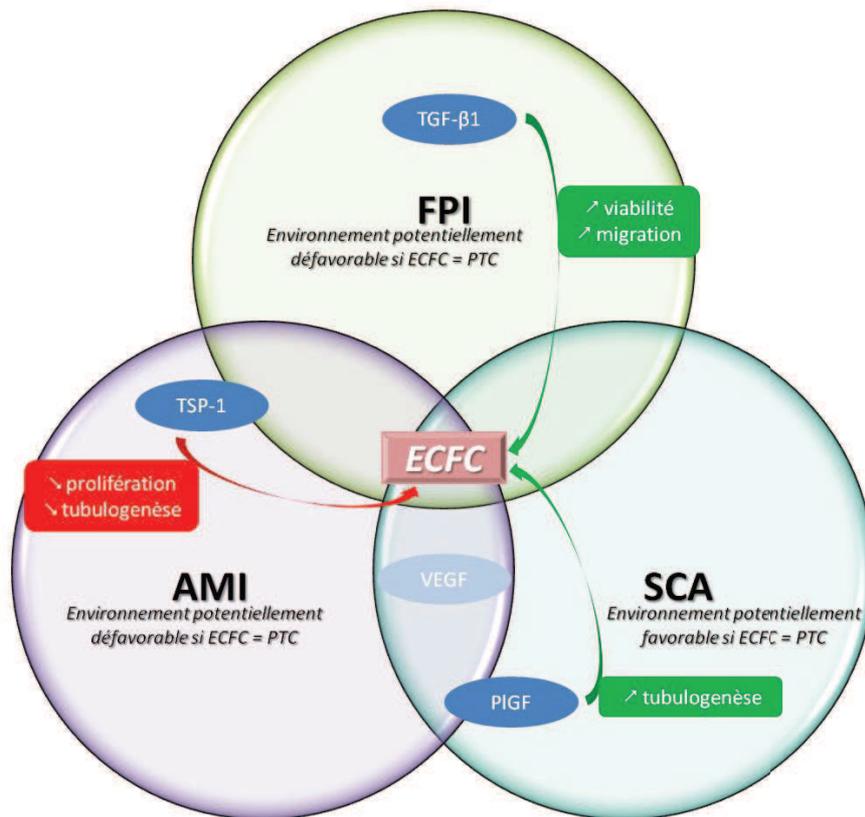


Figure 9 : Représentation schématique récapitulant les effets des potentiels biomarqueurs plasmatiques étudiés dans cette thèse, sur les propriétés angiogènes des ECFC, dans le cadre des modèles pathologiques d'étude choisis. FPI : fibrose pulmonaire idiopathique ; AMI : artériopathie des membres inférieurs ; SCA : syndromes coronariens aigus ; PTC : produit de thérapie cellulaire.

# ANNEXES



#### ANNEXE 1 :

##### **Circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells: cell therapy product or vascular biomarker?**

Mauge L, d'Audigier C, Gaussem P, Smadja DM. *Sang Thrombose Vaisseaux*. 2010 June;22(6):289-300. Review, french.

#### ANNEXE 2 :

##### **The Wnt antagonist Dickkopf-1 increases endothelial progenitor cell angiogenic potential.**

Smadja DM, d'Audigier C, Weiswald LB, Badoual C, Dangles-Marie V, Mauge L, Evrard S, Laurendeau I, Lallemand F, Germain S, Grelac F, Dizier B, Vidaud M, Bièche I, Gaussem P. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010 Dec;30(12):2544-52.

#### ANNEXE 3 :

##### **Treprostinil increases the number and angiogenic potential of endothelial progenitor cells in children with pulmonary hypertension.**

Smadja DM, Mauge L, Gaussem P, d'Audigier C, Israel-Biet D, Celermajer DS, Bonnet D, Lévy M. *Angiogenesis*. 2011 Mar;14(1):17-27.

#### ANNEXE 4 :

##### **Angiogenic potential of BM MSCs derived from patients with critical leg ischemia.**

Smadja DM, d'Audigier C, Guerin CL, Mauge L, Dizier B, Silvestre JS, Dal Cortivo L, Gaussem P, Emmerich J. *Bone Marrow Transplant*. 2012 Jul;47(7):997-1000.

#### ANNEXE 5 :

##### **Imbalance of circulating endothelial cells and progenitors in idiopathic pulmonary fibrosis.**

Smadja DM, Mauge L, Nunes H, d'Audigier C, Juvin K, Borie R, Carton Z, Bertil S, Blanchard A, Crestani B, Valeyre D, Gaussem P, Israel-Biet D. *Angiogenesis*. 2013 Jan;16(1):147-57.



# Les cellules endothéliales circulantes et les progéniteurs endothéliaux : produits de thérapie cellulaire ou biomarqueurs des pathologies vasculaires ?

Laetitia Mauge<sup>1,2,3</sup>, Clément d'Audigier<sup>1,2,3</sup>, Pascale Gaussem<sup>1,2,3</sup>, David M. Smadja<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Université Paris Descartes, France

<sup>2</sup> Inserm UMR-S 765, laboratoire d'hématologie, faculté de pharmacie, 4, avenue de l'observatoire, 75006 Paris, France

<sup>3</sup> Service d'hématologie biologique, AP-HP, hôpital européen Georges-Pompidou, 75270 Paris cedex, France  
<david.smadja@egp.aphp.fr>

**Résumé.** L'endothélium et le maintien de son intégrité sont au centre de nombreuses pathologies cardiovasculaires, pulmonaires et cancéreuses. De nombreuses études ont identifié diverses sous-populations cellulaires circulantes qui permettent une exploration non invasive de la dysfonction/activation de l'endothélium. Parmi ces biomarqueurs, les cellules endothéliales circulantes (CEC) pourraient être considérées comme un marqueur de lésion et/ou d'activation endothéliale, tandis que les progéniteurs endothéliaux circulants (PEC) seraient impliqués dans le processus de régénération. L'injection de progéniteurs endothéliaux (PEC) cultivés *ex vivo* ou provenant de cellules mononucléées médullaires a montré une efficacité dans les modèles précliniques et cliniques de néovascularisation. Cependant, l'origine et la définition exacte de la population de cellules responsables de ces bénéfices cliniques restent controversées. Cette revue récapitule les différentes méthodes décrites pour l'isolement et la caractérisation des CEC et des PEC *ex vivo* ainsi que les perspectives d'utilisation de ces deux marqueurs cellulaires en pathologie humaine.

**Mots clé :** cellule endothéliale circulante, progéniteur endothélial, thrombine, PAR-1, BMP, expansion

## Abstract

**Circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells: cell therapy product or vascular biomarker?**

The endothelium, and the maintenance of its integrity, is at the crossroads of many cardiovascular, pulmonary and cancer diseases. Many published studies have highlighted some cellular circulating markers of endothelial dysfunction, allowing a noninvasive exploration of the endothelium. Among these markers, circulating endothelial cells (CEC) are currently considered as a surrogate marker of endothelial lesion and/or activation, while endothelial progenitor cells (EPC) are thought to be involved in the regenerative process. Administration of EPC contained in bone marrow

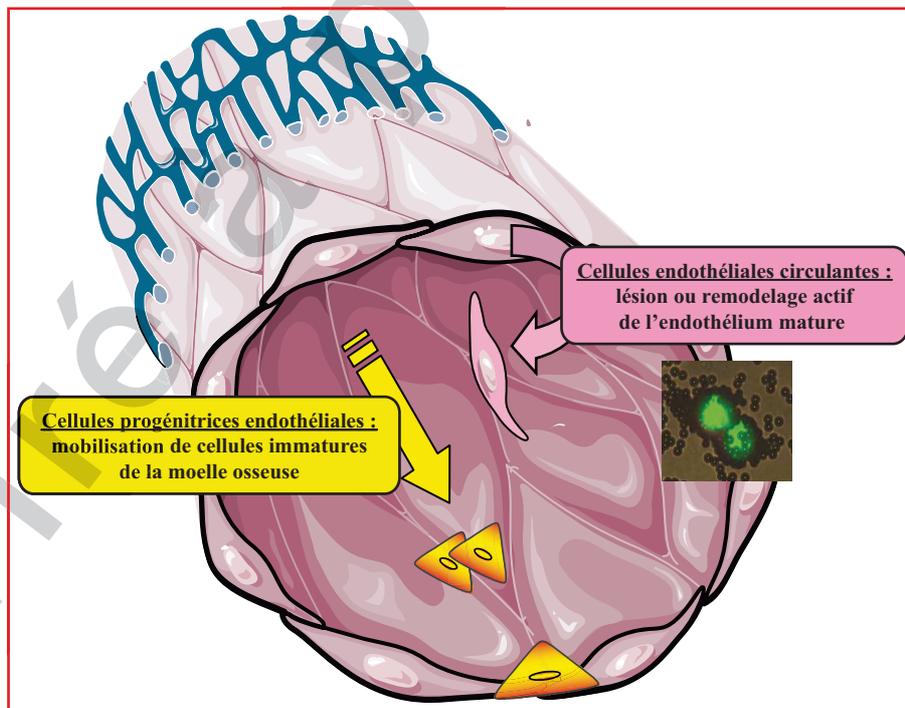
Tirés à part :  
D.-M. Smadja

mononuclear cells or obtained after a culture step *ex-vivo* has shown effectiveness in preclinical's models of ischemia and is a promising cell therapy product for beating critical leg ischemia. However, the origin and the exact definition of the cell population responsible for these clinical benefits remain controversial. This review summarizes the different methods described for isolation and characterization of CEC and EPC *ex-vivo*, as well as the prospects for use of these two cellular markers in human pathology.

**Key words:** circulating endothelial cells, endothelial progenitor cells, thrombin, PAR-1, bone morphogenetic proteins, expansion

Les connaissances acquises sur l'endothélium ces dix dernières années nous ont appris qu'il représente un tissu d'une remarquable plasticité, en équilibre entre deux compartiments. Le « compartiment adhérent », majoritaire, correspond à l'endothélium tapissant l'ensemble de notre système vasculaire. Dans le « compartiment circulant » (*figure 1*), plusieurs sous-populations de cellules endothéliales ont été identifiées, parmi lesquelles se trouvent les cellules endothéliales circulantes (CEC) qui correspondent à des cellules qui se détachent de la paroi vasculaire dans de nombreuses situations pathologiques. Les CEC sont définies par un certain nombre de critères morphologiques, phénotypiques et fonctionnels qui

permettent de les différencier des progéniteurs endothéliaux circulants (PEC). Ces derniers sont mobilisés à partir de la moelle osseuse et participent à la régénération endothéliale. Une modification du nombre de CEC et/ou des PEC a été rapportée dans différentes situations pathologiques associées à une altération et/ou une régénération endothéliale telle que les maladies cardiovasculaires, les pathologies inflammatoires, infectieuses et auto-immunes ou le cancer. Dans ces différents contextes, les CEC et les PEC représentent non seulement des marqueurs non invasifs de l'endothélium mais peuvent également apporter des informations utiles pour le diagnostic, le pronostic et le suivi thérapeutique des pathologies précédemment citées.



**Figure 1.** Origine des cellules endothéliales et progéniteurs endothéliaux circulants.

---

Cette revue récapitule les différentes méthodes décrites pour l'isolement et la caractérisation des CEC et des PEC *ex vivo* ainsi que les perspectives d'utilisation de ces deux marqueurs cellulaires en pathologie humaine.

## Cellules endothéliales circulantes

### *Origine, méthodes d'identification des CEC*

Le concept de CEC est né dans les années 1970 avec les expériences de Bouvier *et al.* qui, après injection d'endotoxine à des lapins, montraient la présence dans le sang périphérique de cellules identifiées morphologiquement comme endothéliales sur des frottis colorés au May-Grünwald Giemsa. Les CEC sont des cellules matures qui se sont détachées de la monocouche intinale suite à une agression de l'endothélium. La présence dans le sang périphérique de ces CEC pourrait représenter un bon marqueur des lésions de la paroi avec mise à nu du sous-endothélium thrombogène.

Dans la circulation, les CEC représentent seulement entre 0,01 et 0,0001 % des cellules mononucléées [1]. Les techniques doivent donc permettre, dans un premier temps, un enrichissement de ces cellules, puis leur identification. A l'origine, les CEC étaient identifiées par des marquages réalisés sur des frottis sanguins. C'est l'introduction d'anticorps plus spécifiques des cellules endothéliales tels que le S-Endo1 dans les années 1990, qui a permis le développement de deux nouvelles techniques de quantification : l'IMS et la cytométrie en flux [2]. Le S-Endo1, anticorps d'isotype IgG1 développé par l'équipe de F. Dignat-George (Marseille, France), présente une forte réactivité avec les HUVEC. Son antigène, le CD146, est largement exprimé à leur surface ( $4 \times 10^5$  sites/HUVEC), ce qui rend possible la détection d'événements rares. De plus, le S-Endo 1 se lie peu aux leucocytes et aux plaquettes. En 1997, Solovey *et al.* ont utilisé un nouvel anticorps monoclonal anti-CD146, le PIH12, dans la drépanocytose [3]. Cet anticorps reconnaît des endothéliums de différents tissus et différentes espèces. Le CD146 est l'antigène de choix comme marqueur des CEC. Cependant, il a aussi été décrit sur d'autres cellules de la paroi vasculaire, ainsi que des cellules malignes. Des précautions dans l'analyse sont donc nécessaires pour en assurer la spécificité.

L'IMS est une technique adaptée à la détection des événements rares. Des billes magnétiques sont recouvertes d'un anticorps monoclonal, le S-Endo 1, reconnaissant l'antigène CD146, et mises en contact avec le sang total. Les billes se fixent alors à la surface des CEC. L'utilisation d'un portoir magnétique qui retient les billes le long de la paroi permet une élimination facile de tous les éléments n'exprimant pas le CD146. Les cellules isolées sont ensuite

comptées en cellule de Nageotte au microscope à fluorescence après une incubation avec de l'acridine orange, qui s'incorpore à l'ADN et confère aux cellules une fluorescence et/ou un marquage avec de l'isolectine B4 spécifiquement endothéliale. La quantification des CEC par IMS et marquage à l'acridine orange demande de l'expérience et du temps technique. Avec cette technique, le nombre de CEC chez le sujet normal est compris entre 0 et 10 cellules/millilitre [1]. Les PEC peuvent également exprimer le CD146 [4] mais plusieurs éléments permettent de les différencier des CEC, comme la morphologie et la taille des cellules ou encore l'expression du CD133 [4].

La cytométrie en flux est l'alternative à l'IMS. Elle présente un intérêt pour sa rapidité d'analyse des cellules à individualiser parmi des populations hétérogènes, et pour leur quantification. Cependant, la sensibilité rapportée dans l'étude de 1991 était de 180 CEC/mL, ce qui est insuffisant pour déterminer les valeurs de CEC chez les individus sains. Avec la cytométrie en flux multiparamétrique, le sang est marqué simultanément par des anticorps monoclonaux couplés à plusieurs fluorochromes [5]. Le CD45 est couramment utilisé pour exclure les cellules hématopoïétiques qui sont CD45+. Les cellules endothéliales sont identifiées par leur expression du CD31 et du CD146 et l'absence de CD133 [6].

L'hétérogénéité des techniques et des définitions des CEC a conduit à la proposition d'une standardisation de l'IMS par Woywodt *et al.* en 2005 [1]. La taille des CEC est très variable, allant d'amas de cellules multinucléées aux cellules entières et aux microparticules. De plus, la morphologie varie selon les pathologies. Une définition consensuelle des CEC a donc été proposée : les CEC sont des cellules nucléées ou non, de plus de 10  $\mu\text{m}$  de longueur, avec plus de cinq billes fixées et qui sont positives au marquage par la lectine UEA-1.

### *Applications*

Un nombre élevé de CEC est rapporté dans des situations variées mais présentant toute une atteinte endothéliale : maladies cardiovasculaires, maladies où l'endothélium est la cible de pathogènes (rickettsie, cytomégalovirus), maladies immunologiques, transplantation, cancer (*tableau 1*). Le nombre de CEC isolées chez les individus sains est en accord avec la notion d'événements rares (*tableau 1*). Dans la plupart des pathologies, l'augmentation du nombre de CEC semble être associée à une élévation des taux plasmatiques de marqueurs d'activation de l'endothélium incluant le facteur Willebrand (vWF) [7], la thrombomoduline soluble ou les molécules d'adhésion solubles (ICAM-1, VCAM-1, E et P-sélectines), suggérant que l'activation pathologique de l'endothélium pourrait être associée au

**Tableau 1. Quantification des cellules endothéliales circulantes (CEC) selon le contexte clinique. Le nombre de CEC chez les individus sains est également rapporté ainsi que la pathologie étudiée, l'anticorps et la technique utilisés**

	Nombre de CEC/mL		Marqueurs immunologiques	Technique
	Patients	Contrôles		
<b>Syndrome coronariens aigus</b>				
Infarctus du myocarde [30]	7,5 [4,1-43,5]	0	S-Endo 1	IMS
Infarctus du myocarde [45]	25,5 [8-35,3]	< 3	S-Endo 1	IMS
Infarctus du myocarde [35]	4,9 [3,6-8,4]	1 [0,5-1,7]	S-Endo 1	IMS
Accident ischémique cérébral [44]	15,5 [10,8-20,7]	2,7 [1,6-3,7]	S-Endo 1	IMS
<b>Maladies immunologiques</b>				
Vasculrite associée aux ANCA [46]	136 [20-5700]	5 [0-20]	S-Endo 1	IMS
Sclérose systémique [47]	243-375	77	P1H12	CF
Maladie de Kawasaki [48]	21 ± 2,1	3,2 ± 0,4	P1H12	IMS
Lupus érythémateux disséminé [49]	32 ± 7	5 ± 2	P1H12	DC
<b>Maladies infectieuses et systémiques</b>				
Rickettsiose [50]	162 ± 454 (0-	6 ± 7	S-Endo 1	IMS
Crise vaso-occlusive drépanocytaire [51]	22,8 ± 18,2 (1-66)	2,6 ± 1,6 (0-5)	P1H12	IMS
Choc septique [52]	30,1 ± 3,3	1,9 ± 0,5	Anti-vWF	IHC
<b>Transplantation</b>				
Rénale [53]	24-72	6	Anti-gp96	IMS
Moelle osseuse [54]	16-44	8	S-Endo 1	IMS
<b>Cancer</b>				
Sein et lymphomes [55]	39100 [16800-61400]	7900 [4700-11100]	P1H12	CF
<b>Autres</b>				
Angioplastie coronaire [56]	59 ± 12,5	2,4 ± 0,9	S-Endo 1	IMS
Angioplastie coronaire [41]	11	1	S-Endo 1	IMS
Angioplastie coronaire [57]	6 - 10	< 3	HEC19	IHC
Hypertension pulmonaire [58]	30	3,5	P1H12	DC + IHC

IMS : immunoséparation magnétique ; IHC : immunohistochimie ; CF : cytométrie en flux ; DC : densité de centrifugation ; CEC : cellules endothéliales circulantes.

détachement cellulaire. Par ailleurs, le taux de CEC semble varier avec l'étendue des lésions. En effet, les valeurs les plus élevées sont trouvées dans les atteintes généralisées de l'endothélium telles que la rickettsiose, la vascularite avec présence d'ANCA (anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires), l'infection à cytomégalovirus. Un taux bas de CEC dans le sang périphérique semble être le reflet de l'intégrité vasculaire et de son bon fonctionnement.

Ainsi, les CEC représentent un marqueur non invasif de l'altération endothéliale (figure 1). Dans les syndromes coronariens aigus sans sus-décalage du segment ST [8], elles sont un marqueur plus précoce que la troponine. Leur taux pourrait même être un indicateur de la sévérité de la pathologie. L'utilisation des CEC a été envisagée pour évaluer l'efficacité thérapeutique dans le traitement du cancer. Mancuso *et al.* ont montré, chez des patients atteints d'un cancer sous traitement anti-angiogène, une

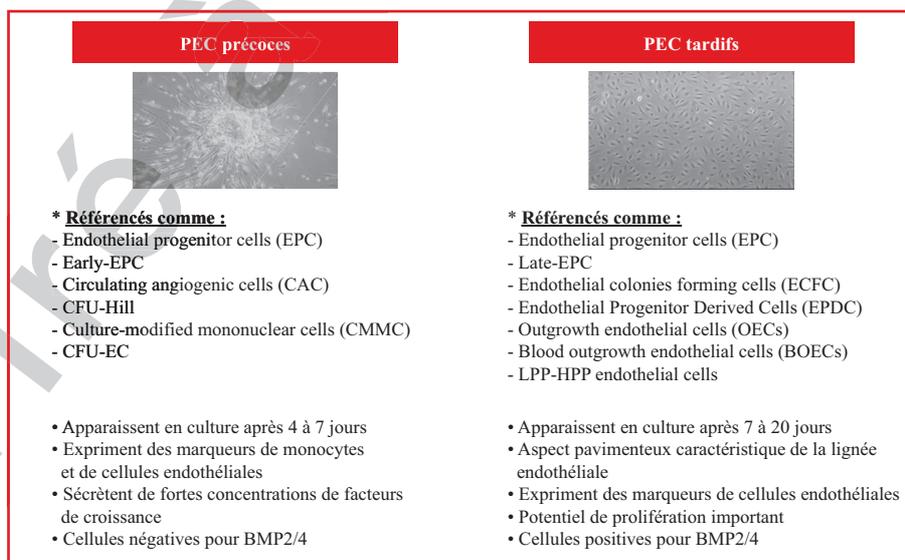
corrélation entre une survie prolongée et des taux de CEC supérieurs à 11 CEC/ $\mu$ L à deux mois de traitement [2], ces CEC étant principalement des cellules apoptotiques soulignant l'efficacité du traitement.

À côté de ces données quantitatives, la caractérisation des CEC par leur morphologie ou leur phénotype apporte des informations très utiles pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques. Ainsi, il faut souligner l'hétérogénéité morphologique des cellules isolées en fonction du processus pathologique : cellules morphologiquement intactes mais de tailles différentes après angioplasties et dans la drépanocytose, cellules d'aspect nécrotique dans les infections à rickettsies et les vascularites à ANCA, cellules apoptotiques ou formations multinucléées typiquement rencontrées dans les syndromes coronariens aigus [7]. L'étude du phénotype des CEC apporte des informations sur leur origine par l'expression du CD36, par exemple :

microvasculaire (CD36+) dans les crises vaso-occlusives drépanocytaires [9] ou macrovasculaire (CD36-) dans l'infarctus du myocarde [10]. Le développement de marqueurs spécifiques du site vasculaire permettrait ainsi de localiser les lésions endothéliales. L'étude de l'expression de certains antigènes par les CEC nous informe également de l'état activé ou non de l'endothélium dans la pathologie [7]. Toutes ces informations apportées par le phénotype permettent d'avancer dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques. La numération des CEC apporte des informations complémentaires dans le diagnostic, le pronostic et le suivi de l'efficacité thérapeutique des maladies vasculaires.

Notre équipe s'est plus particulièrement intéressée au compartiment endothélial circulant dans l'hypertension pulmonaire (HTP). Il s'agit d'une maladie rare, rapidement mortelle en l'absence de traitement, et qui se caractérise par une obstruction vasculaire pulmonaire conduisant à une augmentation progressive des résistances à l'écoulement sanguin et à terme à une défaillance cardiaque droite. L'HTP se définit par une pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) supérieure à 25 mmHg au repos ou supérieure à 30 mmHg à l'effort, mesurée lors du cathétérisme cardiaque droit qui est l'examen de référence pour poser le diagnostic d'hypertension pulmonaire [11]. Elle regroupe plusieurs types classés en cinq groupes selon leurs caractéristiques physiopathologiques, cliniques et leur traitement [11], le premier groupe correspondant aux hypertensions artérielles pulmonaires (HTAP). La dysfonction endothéliale a un rôle essentiel dans le développement de l'hyper-

tension pulmonaire [12]. Cette maladie se caractérise par un remodelage vasculaire pulmonaire des artères de petit calibre et des artéioles précapillaires. Les lésions plexiformes, prolifération anarchique de cellules endothéliales, sont caractéristiques des HTAP idiopathiques, et un profil anti-apoptotique des cellules endothéliales a été décrit dans les formes irréversibles des HTAP secondaires à une cardiopathie congénitale [13]. Afin d'évaluer l'implication du compartiment endothélial circulant au cours de l'HTAP, nous avons quantifié les CEC dans une étude réalisée chez des enfants souffrant d'HTAP secondaire à une cardiopathie congénitale (32 patients). Nous avons montré que le nombre de CEC serait un marqueur non invasif d'irréversibilité de l'HTAP secondaire à ces cardiopathies (57 [12;166] CEC/mL *versus* 3 [1;8] pour les contrôles et 3 [0;20] pour les formes réversibles,  $p < 0,05$ ). Les CEC seraient le reflet de lésions histopathologiques présentes seulement dans certains types d'HTP et non celui de la sévérité hémodynamique de la maladie. La quantification des CEC contribue ainsi à la compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'HTP. Par ailleurs, la classification des HTAP secondaires aux cardiopathies congénitales en forme réversible ou irréversible conditionne le choix du traitement, la chirurgie étant contre-indiquée dans les formes irréversibles. Cette classification est à l'heure actuelle très difficile et essentiellement basée sur les paramètres hémodynamiques. La quantification des CEC dans le sang périphérique pourrait ainsi contribuer à l'orientation thérapeutique dans ce type de pathologie [14].



**Figure 2.** Caractérisation phénotypique des deux types de progéniteurs endothéliaux isolés par culture cellulaire *in vitro*.

## Cellules progénitrices endothéliales

### *Isolement des progéniteurs endothéliaux en culture : deux entités cellulaires*

Les cellules progénitrices endothéliales (PEC) peuvent être isolés à partir de la moelle osseuse, du sang périphérique adulte, de sang de cordon ombilical, ou encore à partir de foie fœtal ou de tissu adipeux. Les méthodes d'isolement classiques sont la mise en culture des cellules monocléées totales après séparation sur gradient de Ficoll ou après une sélection positive par l'utilisation de microbilles recouvertes d'anticorps spécifiques de marqueurs d'immaturation (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 [15-17] :

- des cellules adhérentes dites « précoces » (*early*) qui, après quatre à sept jours de culture, présentent certaines des caractéristiques phénotypiques des 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 deux à trois 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 Ingram *et al.* à établir une hiérarchie à l'intérieur de ces progéniteurs tardifs, similaire à la classification établie pour les cellules souches hématopoïétiques [16].

La distinction en cellules précoces et tardives évoquée par Hur *et al.* en 2004 a clarifié la dénomination des PEC. En effet, comme cité plus haut, ces différents types cellulaires étaient tous dénommés progéniteurs endothéliaux, avec quelques variantes listées dans la *figure 2*. Les PEC précoces, qui expriment le CD14, sont les cellules identifiées par Asahara *et al.* en 1997 [18], et à propos desquelles les travaux publiés sont les plus nombreux. Cependant, leur origine et leur réelle appartenance aux cellules progénitrices, d'une part, et à la lignée endothéliale, d'autre part, sont encore discutées.

En 2005, Ingram *et al.* ont 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 [19].

### *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 CEC. Au niveau des marqueurs membranaires mis en évidence par immunohistochimie, par immunofluorescence ou par cytométrie de flux, on retrouve la lectine UEA-1, 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 (qui est une propriété partagée par les monocytes/macrophages et les cellules endothéliales) ou leur expression intracellulaire de vWF 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, il a été publié par deux équipes que les cellules souches CD133+ ne seraient pas à l'origine de la lignée endothéliale [20, 21], ce qui est contradictoire avec d'autres travaux, et avec le fait que les PEC tardifs lors de leur émergence expriment des taux non négligeables d'ARNm de CD133 [22, 23].

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 2*). 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 permettant d'affirmer leurs caractéristiques fonctionnelles en termes notamment de capacité de prolifération.

Étant donné l'utilité potentielle des PEC comme marqueurs cellulaires de cancer ou de pathologie cardiovasculaire, mais également comme produits de thérapie cellulaire, une meilleure caractérisation des PEC 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 [24]. Les BMP appartiennent à la famille du TGF  $\beta$ . Ce sont des cytokines impliquées dans la croissance des os et du cartilage et dont le rôle est connu dans l'embryogenèse et la formation précoce du squelette. Ainsi, nous avons montré, outre un rôle angiogénique des BMP, que les BMP2 et 4 induisent *in vitro* :

- l'engagement des cellules CD34+ vers la lignée endothéliale ;

– et une augmentation du potentiel proangiogénique des PEC tardifs, notamment en activant les propriétés de prolifération, de migration et de différenciation de ces cellules. Par ailleurs, l'ajout de l'inhibiteur spécifique des BMP, Noggin, au *fibroblast growth factor* dans un modèle d'implant sous-cutané de Matrigel® chez la souris C57/Bl6J, induit une inhibition importante de la vascularisation des implants. Dans le modèle d'ischémie de la patte postérieure chez la souris *Nude*, l'activation des PEC par les BMP2 et 4 augmente leur potentiel proangiogénique [24]. Enfin, nous avons caractérisé le phénotype des cellules responsables de la néovascularisation observée dans des spécimens d'amputation de patients présentant une ischémie critique de jambe et ayant reçu une injection locale de cellules mononucléées autologues de moelle osseuse [25]. Les cellules endothéliales constituant les néovaisseaux sont fortement positives pour BMP2/4, suggérant que les cellules impliquées dans la néovascularisation ont un phénotype endothélial correspondant à celui des PEC tardifs et permettant d'exclure l'hypothèse de l'incorporation de PEC précoces au néovaisseau.

#### **PEC et facteurs de risque cardiovasculaire**

Des études cliniques ont montré que le nombre de PEC circulants est inversement corrélé aux facteurs de risque (FR) classiques d'athérosclérose [26, 27]. De plus, les PEC isolés par cytométrie en flux (CD34+KDR+ et quantification des colonies *early* par le test Endocult®) chez les patients coronariens présentent une diminution de leur capacité migratoire, inversement corrélée avec le nombre de FR cardiovasculaire [26]. Cependant, dans la plupart des études cliniques brièvement résumées dans ce paragraphe, le nombre de patients inclus est généralement faible (< 100) et souvent comparé à des groupes de patients non correctement appariés. Ainsi, l'étude princeps de Dimmeler *et al.*, qui a montré pour la première fois que le nombre et/ou la fonctionnalité des PEC étaient inversement corrélés aux FR cardiovasculaires, comprenait seulement 45 patients vs 15 témoins [26]. Du fait du manque de standardisation des méthodes de quantification, les résultats des corrélations cliniques présentés ici sont à interpréter avec prudence.

Des études récentes ont souligné les effets néfastes du diabète de type 1 et 2 sur le nombre et la fonctionnalité des PEC [28, 29]. Tepper *et al.* ont montré que, dans le diabète de type 2, les capacités prolifératives et adhésives des PEC sont réduites. De plus, les PEC de sujets diabétiques forment moins de tubes en Matrigel® que des PEC de sujets témoins. D'une manière intéressante, l'hémoglobine glyquée est inversement corrélée au nombre et aux propriétés fonctionnelles des PEC *in vitro* dans les diabètes de type 1 et 2. Dans ce contexte, les effets néfastes de l'hyper-

glycémie ont été attribués à une diminution de la production de NO et donc d'activité de la MMP-9 [30]. Enfin, dans un modèle expérimental d'ischémie de la patte chez la souris diabétique [31], il existe une diminution de la mobilisation des PEC médullaires dans la circulation.

Un des principaux FR cardiovasculaire est l'augmentation de la concentration d'une fraction lipidique, le LDL-C (*low density lipoprotein cholesterol*). Cependant, peu d'études ont étudié l'influence des LDL sur les PEC [32-35]. Les LDL oxydés seraient, en outre, capables d'induire l'apoptose de ces cellules, ce qui pourrait expliquer la baisse du nombre de PEC chez les patients présentant une hyperLDLémie [34]. Les effets du LDL-C sur la sénescence des PEC pourraient être contrebalancés par l'utilisation des statines [36, 37]. Enfin, le HDL-C (*high density lipoprotein cholesterol*) aurait un effet sur le nombre et la fonctionnalité des PEC. En effet, les sujets ayant des taux bas de HDL-C présentaient parallèlement des taux bas de PEC, cet effet étant attribué à une moindre activation de la NOS3 par le HDL-C. De plus, le HDL-C permettrait de prévenir l'apoptose des PEC en inhibant la caspase-3 [38].

Fumer est un FR cardiovasculaire important qui a été associé à une diminution du nombre de PEC [26]. Une étude récente a montré que le rôle de la nicotine est très complexe et dose-dépendant [39]. Chez l'homme, des niveaux bas de PEC ont été retrouvés chez des fumeurs chroniques ( $n = 15$ ). Le taux de PEC remonte après arrêt du tabac en moins de quatre semaines [40]. Cependant, aucune différence n'a été retrouvée chez les patients ayant reçu un patch de nicotine après l'arrêt du tabac, en comparaison aux patients n'en ayant pas reçu. Ainsi, les effets directs de la nicotine sur le nombre de PEC peuvent être discutés, du moins *in vivo*.

L'inactivité physique a été associée à une plus grande fréquence de maladies cardiovasculaires, mais également à une augmentation du stress oxydatif, de l'athérosclérose et des dysfonctions endothéliales [41]. Il a été mis en évidence que les souris ayant une activité physique régulière avaient un nombre de PEC plus élevé que les souris soumises à un style de vie sédentaire. Chez l'homme, une augmentation significative des PEC est observée chez les patients qui ont repris une activité physique pendant un programme de réadaptation, chez des patients coronariens soumis à un entraînement physique, et chez des volontaires sains soumis à un exercice physique de 30 minutes [41].

En plus des FR cardiovasculaires, plusieurs pathologies cardiovasculaires ont été associées à un nombre de PEC et à une fonctionnalité diminués [42, 43]. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, le nombre de PEC circulants est inversement corrélé avec les FR classiques d'athéro-

sclérose [26, 27]. De plus, les PEC isolés chez les patients coronariens présentent des capacités migratoires inversement corrélées avec le nombre de FR cardiovasculaire [26]. L'équipe de Hill a montré une forte corrélation entre le nombre de PEC circulants et la présence de FR cardiovasculaire [27]. De plus, le taux de PEC circulants est un meilleur facteur prédictif des dysfonctions endothéliales que les FR habituels [27].

Dimmeler *et al.* ont étudié, dans un modèle de patte ischémique de souris immunodéprimée pouvant recevoir des cellules humaines, les cellules mononucléées de la moelle provenant de sujets sains et de patients atteints d'insuffisance cardiaque (IC). Ils ont montré que les cellules issues de patients souffrant d'IC avaient des propriétés de revascularisation moindres que des sujets témoins. Des expériences *in vitro* ont également étudié les propriétés migratoires de ces cellules provenant de patients atteints d'IC. Dans le modèle de chambre de Boyden, ces cellules migrent moins vers le VEGF et le SDF-1 que les cellules mononucléées issues d'individus sains [44].

À ce jour, une seule étude a inclus un nombre conséquent de sujets [45]. Ainsi, la valeur pronostique du nombre de PEC circulants a été étudiée par Werner *et al.* Cette étude prospective a quantifié le nombre de PEC CD34+/KDR+ par cytométrie en flux chez 519 patients coronariens [45]. L'association entre le taux de base des PEC, la mortalité cardiovasculaire, la survenue d'un premier événement cardiovasculaire (infarctus du myocarde, hospitalisation, revascularisation et mort cardiovasculaire) et toute cause de mortalité après 12 mois a été évaluée. La période sans événements cardiovasculaires cumulés a été corrélée au taux de PEC circulants CD34+/KDR+, à la mortalité cardiovasculaire et à la date du premier événement cardiovasculaire. Les taux élevés de PEC ont été corrélés à une faible mortalité cardiovasculaire et à une survenue du premier événement cardiovasculaire plus tardive [45].

#### **Exploration fonctionnelle des PEC *in vivo***

L'existence des PEC dans le sang périphérique de l'homme adulte a rapidement suscité des perspectives en thérapie cellulaire. En effet, la preuve du concept réalisée 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 [15, 46]. 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'IC 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 globale-

ment positif [47]. 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 [48]. Dans notre expérience (PHRC OPTIPEC, investigateur principal : 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 néovascularisation [24, 25].

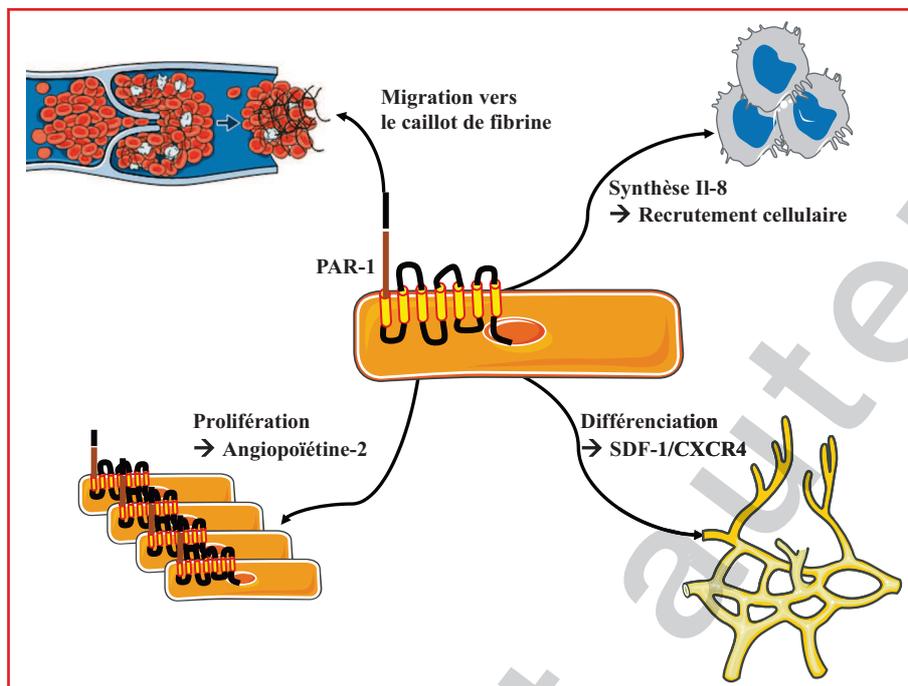
À l'issue de l'observation des effets bénéfiques retrouvés dans ces essais précliniques et cliniques, une abondante littérature est parue au cours de ces dernières années afin de tenter d'expliquer les rôles respectifs des PEC précoces et tardifs, et de mieux connaître leurs propriétés fonctionnelles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

#### **Préconditionnement des PEC**

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

Ainsi, le traitement des PEC par le VEGF [49] induit une augmentation de synthèse de l'intégrine  $\alpha 6$ . Le prétraitement des PEC avec du SDF-1 permettrait la surexpression des sous-unités  $\alpha 4$  et  $\alpha M$  impliquées dans le *homing* des cellules immatures vers le site d'ischémie, et renforce l'adhérence des PEC à l'endothélium mature [50]. 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 précliniques 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 L. Il faut donc nécessairement 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 ayant la capacité de mobiliser les PEC chez des patients coronariens ainsi que dans des modèles expérimentaux [36, 37]. Cela s'accompagne d'une augmentation des capacités migratoires 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) [36, 51]. Le NO joue un rôle crucial dans les PEC et son expression est indispensable pour la mobilisation des cellules médullaires et des PEC. De plus, des composés activateurs du NO induisent la différenciation de cellules souches en cellules hématopoïétiques et endothéliales, et pourraient être utilisés dans le prétraitement des cellules des patients présentant un infarctus du myocarde [52].



**Figure 3.** Rôle pléiotrope de l'activation du principal récepteur de la thrombine (PAR-1) sur les progéniteurs endothéliaux circulants.

D'autres stratégies proposent l'utilisation de la E-sélectine soluble [53], l'activation de l'éphrine B4 par le Fc-éphrine B2 [54], ou l'activation de la  $\beta 2$  intégrine [55] par des anticorps, 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.

En effet, les données de la littérature ont montré l'implication du PAR-1 dans l'angiogenèse embryonnaire et le rôle de l'activation de ce récepteur par la thrombine ou par le peptide SFLLRN (qui mime l'effet de la thrombine sur son récepteur PAR-1 sans en entraîner le clivage) 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. Nous avons montré que l'activation 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) [23].

Nous avons recherché les possibles interactions du PAR-1 avec l'angiopoïétine 2. En effet, en plus de ses rôles déjà connus dans la formation de l'arbre vasculaire, Hildbrand *et al.* [56] ont montré que l'angiopoïétine 2 avait un rôle dans l'expansion des PEC *ex vivo*. Ainsi, nous avons pu attribuer l'effet prolifératif de l'activation du PAR-1 sur

les PEC à l'induction de l'expression du gène de l'angiopoïétine 2 et de la synthèse de la protéine [57].

Pour expliquer les effets de l'activation du PAR-1 sur la migration et la différenciation cellulaire, nous avons mis en évidence un rôle du système autocrine SDF-1 et de son récepteur CXCR4. 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. Les cellules activées par le SFLLRN migrent en chambre de Boyden 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 d'expression de CXCR-4 observée à la surface des cellules.

Après un conditionnement des PEC avec le SFLLRN, une augmentation de formation de structures tubulaires en Matrigel<sup>®</sup> est observée, celle-ci étant bloquée en présence d'anticorps anti-CXCR-4 et anti-SDF-1. Ici encore, comme pour la migration, et de façon indépendante d'une induction de la prolifération, nous avons montré le rôle de la surexpression de SDF-1 et de CXCR-4 suite à l'activation de PAR-1. Ces effets sur la différenciation cellulaire sont indépendants de la voie VEGF/VEGFR2. Ainsi, l'effet proangiogène du PAR-1 induit par SDF-1/CXCR-4, indé-

pendamment 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 potentielles interactions PAR-1/IL-8 sur les PEC précoces et tardifs. 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 interférence inhibe la voie AP-1 et NF-kB, et abolit la synthèse d'IL-8 autant au niveau basal qu'après stimulation du PAR-1. Ces résultats suggèrent que ce processus pourrait participer à la coopération entre les deux types de progéniteurs pendant la néovascularisation, médiée par un effet paracrine [58].

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'acquérir des propriétés anticoagulantes et antifibrinolytiques en plus de leurs propriétés angiogéniques [59]. Cela pourrait représenter une piste intéressante comme biomatrice pour l'expansion des PEC, d'autant que ce procédé existe déjà en conditions de grade clinique.

## Conclusion

L'endothélium vasculaire est un organe dynamique à la croisée des chemins entre le remodelage vasculaire, le développement de la plaque d'athérosclérose et de ses complications ischémiques. L'homéostasie endothéliale, résultant d'un équilibre entre les lésions et la régénération, est sûrement reflétée par le compartiment endothélial circulant composé des cellules progénitrices endothéliales et des CEC. Ces cellules circulantes peuvent ainsi être considérées comme nouvelle classe de biomarqueur du dysfonctionnement vasculaire. De plus, ces cellules pourraient être utilisées comme des outils d'évaluation de l'impact des stratégies thérapeutiques visant à améliorer la fonction vasculaire dans des désordres cardiovasculaires et/ou

pulmonaires. Ainsi, les cellules progénitrices endothéliales autologues sont une source potentielle pour le développement d'un produit de thérapie cellulaire. L'expérience acquise suggère que la possibilité d'amplifier les PEC circulants de l'adulte reste actuellement limitée, et, dans ce contexte, la place de cellules endothéliales allogéniques issues de banques de cordon ombilical reste à définir. Ainsi, la question de l'utilisation de cellules endothéliales isolées à partir de cellules souches embryonnaires ou de cellules souches pluripotentes induites (iPS) se pose. Ces cellules pourraient constituer un outil thérapeutique intéressant pour revasculariser les tissus ischémiques. C'est pourquoi la production de cellules iPS hautement prolifératives autologues et leur amplification *in vitro* pourrait constituer un enjeu clinique considérable dans les pathologies cardiovasculaires. ■

**Conflit d'intérêts :** aucun.

## Références

1. Woywodt A, Blann AD, Kirsch T, *et al.* Isolation and enumeration of circulating endothelial cells by immunomagnetic isolation: proposal of a definition and a consensus protocol. *J Thromb Haemost* 2006 ; 4 : 671-7.
2. George F, Brisson C, Poncelet P, *et al.* Rapid isolation of human endothelial cells from whole blood using S-Endo1 monoclonal antibody coupled to immuno-magnetic beads : demonstration of endothelial injury after angioplasty. *Thromb Haemost* 1992 ; 67 : 147-53.
3. Solovey A, Lin Y, Browne P, *et al.* Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Engl J Med* 1997 ; 337 : 1584-90.
4. Delorme B, Basire A, Gentile C, *et al.* Presence of endothelial progenitor cells, distinct from mature endothelial cells, within human CD146+ blood cells. *Thromb Haemost* 2005 ; 94 : 1270-9.
5. Khan SS, Solomon MA, McCoy JP, Jr, Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*, 2005. 64(1): p. 1-8.
6. Mancuso P, Burlini A, Pruneri G, *et al.* Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood* 2001 ; 97 : 3658-61.
7. Blann AD, Woywodt A, Bertolini F, *et al.* Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thromb Haemost* 2005 ; 93 : 228-35.
8. Quilici J, Banzet N, Paule P, *et al.* Circulating endothelial cell count as a diagnostic marker for non-ST-elevation acute coronary syndromes. *Circulation* 2004 ; 110 : 1586-91.
9. Clancy R, Marder G, Martin V, *et al.* Circulating activated endothelial cells in systemic lupus erythematosus: further evidence for diffuse vasculopathy. *Arthritis Rheum* 2001 ; 44 : 1203-8.
10. Mutin M, Canavy I, Blann A, *et al.* Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood* 1999 ; 93 : 2951-8.
11. Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, *et al.* Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009 ; 54 (1 Suppl) : S43-54.
12. Humbert M, Morrell NW, Archer SL, *et al.* Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004 ; 43 (12 Suppl S) : 13S-24S.

13. Levy M, Maurey C, Celermajer DS, *et al.* Impaired apoptosis of pulmonary endothelial cells is associated with intimal proliferation and irreversibility of pulmonary hypertension in congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2007 ; 49 : 803-10.
14. Smadja DM, Gaussem P, Mauge L, *et al.* Circulating endothelial cells: a new candidate biomarker of irreversible pulmonary hypertension secondary to congenital heart disease. *Circulation* 2009 ; 119 : 374-81.
15. Hur J, Yoon CH, Kim HS, *et al.* Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 ; 24 : 288-93.
16. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, *et al.* Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 2004 ; 104 : 2752-60.
17. Smadja DM, Cornet A, Emmerich J, *et al.* Endothelial progenitor cells: characterization, *in vitro* expansion, and prospects for autologous cell therapy. *Cell Biol Toxicol* 2007 ; 23 : 223-39.
18. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997 ; 275 : 964-7.
19. Ingram DA, Mead LE, Moore DB, *et al.* Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood* 2005 ; 105 : 2783-6.
20. Case J, Mead LE, Bessler WK, *et al.* Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Exp Hematol* 2007 ; 35 : 1109-18.
21. Timmermans F, Van Hauwermeiren F, De Smedt M, *et al.* Endothelial outgrowth cells are not derived from CD133+ cells or CD45+ hematopoietic precursors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007 ; 27 : 1572-9.
22. Bompais H, Chagraoui J, Canron X, *et al.* Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood* 2004 ; 103 : 2577-84.
23. Smadja DM, Bieche I, Uzan G, *et al.* PAR-1 activation on human late endothelial progenitor cells enhances angiogenesis *in vitro* with upregulation of the SDF-1/CXCR4 system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 ; 25 : 2321-7.
24. Smadja DM, Bieche I, Silvestre JS, *et al.* Bone morphogenetic proteins 2 and 4 are selectively expressed by late outgrowth endothelial progenitor cells and promote neoangiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008 ; 28 : 2137-43.
25. Van-Huyen JP, Smadja DM, Bruneval P, *et al.* Bone marrow-derived mononuclear cell therapy induces distal angiogenesis after local injection in critical leg ischemia. *Mod Pathol* 2008 ; 21 : 837-46.
26. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, *et al.* Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001 ; 89 : E1-7.
27. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, *et al.* Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003 ; 348 : 593-600.
28. Loomans CJ, de Koning EJ, Staal FJ, *et al.* Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes* 2004 ; 53 : 195-9.
29. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, *et al.* Human endothelial progenitor cells from type 2 diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* 2002 ; 106 : 2781-6.
30. Krankel N, Adams V, Linke A, *et al.* Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 ; 25 : 698-703.
31. Tamarat R, Silvestre JS, Le Ricousse-Roussane S, *et al.* Impairment in ischemia-induced neovascularization in diabetes: bone marrow mononuclear cell dysfunction and therapeutic potential of placenta growth factor treatment. *Am J Pathol* 2004 ; 164 : 457-66.
32. Chen JZ, Zhang FR, Tao OM, *et al.* Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)* 2004 ; 107 : 273-80.
33. Wang X, Chen J, Tao Q, *et al.* Effects of ox-LDL on number and activity of circulating endothelial progenitor cells. *Drug Chem Toxicol* 2004 ; 27 : 243-55.
34. Imanishi T, Hano T, Sawamura T, *et al.* Oxidized low-density lipoprotein induces endothelial progenitor cell senescence, leading to cellular dysfunction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004 ; 31 : 407-13.
35. Imanishi T, Hano T, Matsuo Y, *et al.* Oxidized low-density lipoprotein inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial progenitor cell differentiation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003 ; 30 : 665-70.
36. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, *et al.* HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest* 2001 ; 108 : 391-7.
37. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, *et al.* Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 2001 ; 103 : 2885-90.
38. Noor R, Shuaib U, Wang CX, *et al.* High-density lipoprotein cholesterol regulates endothelial progenitor cells by increasing eNOS and preventing apoptosis. *Atherosclerosis*, 2006.
39. Wang X, Zhu J, Chen J, *et al.* Effects of nicotine on the number and activity of circulating endothelial progenitor cells. *J Clin Pharmacol* 2004 ; 44 : 881-9.
40. Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, *et al.* Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 ; 24 : 1442-7.
41. Laufs U, Wassmann S, Czech T, *et al.* Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 ; 25 : 809-14.
42. Yamamoto K, Kondo T, Suzuki S, *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 : e192-1e6.
43. Werner N, Nickenig G, Influence of cardiovascular risk factors on endothelial progenitor cells : limitations for therapy? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. 26(2): p. 257-66.
44. Heeschen C, Lehmann R, Honold J, *et al.* Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation* 2004 ; 109 : 1615-22.
45. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, *et al.* Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005 ; 353 : 999-1007.
46. Yoon CH, Hur J, Park KW, *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 : 1618-27.
47. Martin-Rendon E, Brunskill SJ, Hyde CJ, *et al.* Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review. *Eur Heart J* 2008 ; 29 : 1807-18.
48. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, *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 : 427-35.
49. Smadja DM, Bieche I, Helley D, *et al.* 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* 2007 ; 11 : 1149-61.
50. Zemani F, Silvestre JS, Fauvel-Lafeve F, *et al.* *Ex vivo* priming of endothelial progenitor cells with SDF-1 before transplantation could increase their proangiogenic potential. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008 ; 28 : 644-50.

- 
51. Landmesser U, Engberding N, Bahlmann FH, *et al.* 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 : 1933-9.
52. Sasaki K, Heeschen C, Aicher A, *et al.* *Ex vivo* pretreatment of bone marrow mononuclear cells with endothelial NO synthase enhancer AVE9488 enhances their functional activity for cell therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 ; 103 : 14537-41.
53. Oh IY, Yoon CH, Hur J, *et al.* Involvement of E-selectin in recruitment of endothelial progenitor cells and angiogenesis in ischemic muscle. *Blood* 2007 ; 110 : 3891-9.
54. Foubert P, Silvestre JS, Souttou B, *et al.* PSGL-1-mediated activation of EphB4 increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells. *J Clin Invest* 2007 ; 117 : 1527-37.
55. Chavakis E, Aicher A, Heeschen C, *et al.* Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *J Exp Med* 2005 ; 201 : 63-72.
56. Hildbrand P, Cirulli V, Prinsen RC, *et al.* The role of angiopoietins in the development of endothelial cells from cord blood CD34+ progenitors. *Blood* 2004 ; 104 : 2010-9.
57. Smadja DM, Laurendeau I, Avignon C, *et al.* The angiopoietin pathway is modulated by PAR-1 activation on human endothelial progenitor cells. *J Thromb Haemost* 2006 ; 4 : 2051-8.
58. Smadja DM, Bieche I, Susen S, *et al.* Interleukin 8 is differently expressed and modulated by PAR-1 activation in early and late endothelial progenitor cells. *J Cell Mol Med* 2008 : p. in press.
59. Smadja DM, Basire A, Amelot A, *et al.* Thrombin bound to a fibrin clot confers angiogenic and haemostatic properties on endothelial progenitor cells. *J Cell Mol Med* 2008 ; 12 : 975-86.

# The Wnt Antagonist Dickkopf-1 Increases Endothelial Progenitor Cell Angiogenic Potential

David M. Smadja, Clément d'Audigier, Louis-Bastien Weiswald, Cécile Badoual, Virginie Dangles-Marie, Laetitia Mauge, Solène Evrard, Ingrid Laurendeau, François Lallemand, Stéphane Germain, Françoise Grelac, Blandine Dizier, Michel Vidaud, Ivan Bièche, Pascale Gaussem

**Objective**—To determine the role of Wnt antagonist Dickkopf (DKK) 1 in human endothelial colony-forming cells (ECFCs) in view of the emerging importance of Wnt pathways in vascular biology.

**Methods and Results**—Endothelial progenitor cells have been proposed to be crucial in tumor neovascularization. Recombinant DKK1 has been tested in ECFC angiogenic properties in vitro. DKK1 enhanced ECFC proliferation and the capacity of ECFCs to form pseudotubes in Matrigel. These effects have been attributed to enhancement of vascular endothelial growth factor receptor 2, SDF-1, and CXCR4. *DKK1* gene silencing has been realized on ECFCs and mesenchymal stem cells, and we found that DKK1 silencing in the 2 cell types decreased their angiogenic potential. We then examined the possible role of DKK1 in tumor neovascularization and found that blood vessels of breast cancer tissues expressed DKK1 far more strongly in human breast tumors than in normal breast tissues. By studying 62 human breast tumors, we found a significant positive correlation between DKK1 expression and von Willebrand factor. In vivo, DKK1 strongly enhanced the vascularization of Matrigel plugs and increased tumor size in a xenograft model of human breast carcinoma in nude mice.

**Conclusion**—DKK1 enhances angiogenic properties of ECFCs in vitro and is required for ECFC and mesenchymal stem cell angiogenic phenotypes in vivo. DKK1 also increases tumoral angiogenesis. Thus, we demonstrated a major role of DKK1 in angiogenic processes. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:2544-2552.)

**Key Words:** vascular biology ■ endothelial progenitor cells ■ Wnt-DKK1

Wingless related proteins (Wnts) are powerful regulators of cell proliferation and differentiation, and their signaling pathway involves proteins that participate directly in both gene transcription and cell adhesion.<sup>1</sup> The major signaling pathway of Wnt is the canonical pathway that results from Wnt binding to the frizzled and low-density-lipoprotein-receptor-related protein (LRP) families on the cell surface. Complex formation induces  $\beta$ -catenin nuclear entry and forms a complex with transcription factor T cell factor (TCF) and/or lymphoid enhancer factor (LEF) to activate transcription of Wnt target genes. The Wnt pathway is modulated by several Wnt antagonists, including Dickkopfs (DKKs).<sup>2</sup> The DKK family encodes secreted proteins of 255 to 350 amino acids and comprises 4 main members in vertebrates (DKK1 to DKK4). DKK1, the most widely studied member of this family, has been implicated in various physiological and pathological processes in human adults. DKK1 mediates inflammation in atherosclerotic lesions<sup>3</sup> and

mobilizes progenitor cells by activating the bone marrow endosteal stem cell niche.<sup>4</sup> Recently, serum levels of DKK1 correlated with the extent of bone disease in patients with multiple malignant neoplasms, such as breast cancer.<sup>5</sup> In tumoral angiogenesis, endothelial cells have distinct gene expression profiles when compared with normal endothelial cells. Notably, they express high levels of DKK3.<sup>6,7</sup> However, the role of DKK1 in tumoral angiogenesis and postnatal vasculogenesis by endothelial progenitor cells (EPCs) has not yet been studied.

Bone marrow-derived cells have been shown to contribute to tumor neovasculature.<sup>8,9</sup> The active cell population in bone marrow-derived cells has been proposed to be EPCs.<sup>10–13</sup> EPCs are a crucial interface in tumor neovascularization and dissemination<sup>14</sup> and have been considered as a breast tumor biomarker.<sup>15</sup> At least 2 populations of EPCs have been described.<sup>16</sup> “Early” EPCs, also called “circulating angiogenic cells” (CACs), are spindle shaped and express both

Received on: April 17, 2010; final version accepted on: August 26, 2010.

From the Université Paris Descartes (D.M.S., C.d.'A., L.-B.W., C.B., V.D.-M., L.M., S.E., I.L., M.V., I.B., and P.G.), Paris, France; Inserm UMRS765 (D.M.S., C.d.'A., L.M., S.E., F.G., B.D., and P.G.), Faculté de Pharmacie, Paris, France; AP-HP (D.M.S., C.d.'A., C.B., L.M., S.E., S.G., and P.G.), Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France; IFR71 (L.-B.W.), Sciences du Médicament, Université Paris Descartes, Paris, France; Inserm UMRS970 (C.B.), Paris, France; Inserm UMRS832 (V.D.-M.); Preclinical Investigation Unit, Institut Curie, Paris, France; Inserm UMRS745 (I.L., M.V., and I.B.), Faculté de Pharmacie, Paris, France; Laboratoire Oncogénétique (F.L. and I.B.), Centre René Huguenin, Saint-Cloud, France; and Inserm UMRS833 (S.G.), Collège de France, Paris, France.

Drs Weiswald and Badoual contributed equally to the study.

Correspondence to David Smadja, PharmD, PhD, 4 Ave de l'Observatoire, 75006 Paris, France. E-mail david.smadja@egp.aphp.fr

© 2010 American Heart Association, Inc.

*Arterioscler Thromb Vasc Biol* is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.213751

endothelial and leukocyte markers. "Late" EPCs, also called endothelial colony-forming cells (ECFCs),<sup>11,17</sup> develop after 2 to 3 weeks of culture and have the characteristics of precursor cells committed to the endothelial lineage. CACs and ECFCs have therapeutic potential; however, in vivo, cells that merge into neovessels have an ECFC phenotype.<sup>11,12</sup> To determine the potential of ECFCs as a cell therapy product and/or as an angiogenic cell type responsive of tumoral angiogenesis, a better understanding of the mechanisms underlying their angiogenic properties is needed.

Herein, we report that the Wnt canonical pathway antagonist DKK1 enhances the angiogenic properties of ECFCs. Because increased DKK1 levels are found in the serum of patients with breast cancer,<sup>5</sup> we suspected that DKK1 might correlate with breast tumor vascularization. We further investigated how DKK1 secreted from ECFCs, and from another proposed angiogenic cell type (mesenchymal stem cells [MSCs]), could interfere with cell angiogenic properties.

## Methods

Experiments, including in vitro angiogenic assays, reverse transcription–quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), and in vivo Matrigel plug, have been described elsewhere and in detail in supplemental files (available online at <http://atvb.ahajournals.org>).

A human breast carcinoma xenograft-12 (HBCx-12) was previously described.<sup>18</sup> HBCx-12 xenograft fragments of 30 mm<sup>3</sup> were subcutaneously grafted into the interscapular fat pad of 4- to 6-week-old female athymic nude mice (Janvier, Le Genest St Isle, France).

When the tumors reached a volume of approximately 200 mm<sup>3</sup>, animals were ranked according to the tumor volume and divided into 3 groups (6 animals per group) such that the mean and median of tumor volume of the 3 groups were closely matched. Treatment was started on day 1 and given over 3 weeks. Mice were injected twice a week peritumorally with recombinant mouse DKK1 at a dosage of 100 or 500 ng per animal or with PBS containing 0.1% bovine serum albumin as a vehicle control, in a total volume of 100  $\mu$ L.

The study was approved by the local ethics committee of Hôpital des Instructions et des Armées de Bégin in France (registration number: 201008043234797), and the study protocol conformed to the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki.

## Results

### Differential Expression of the Wnt Canonical Pathway in CACs and ECFCs

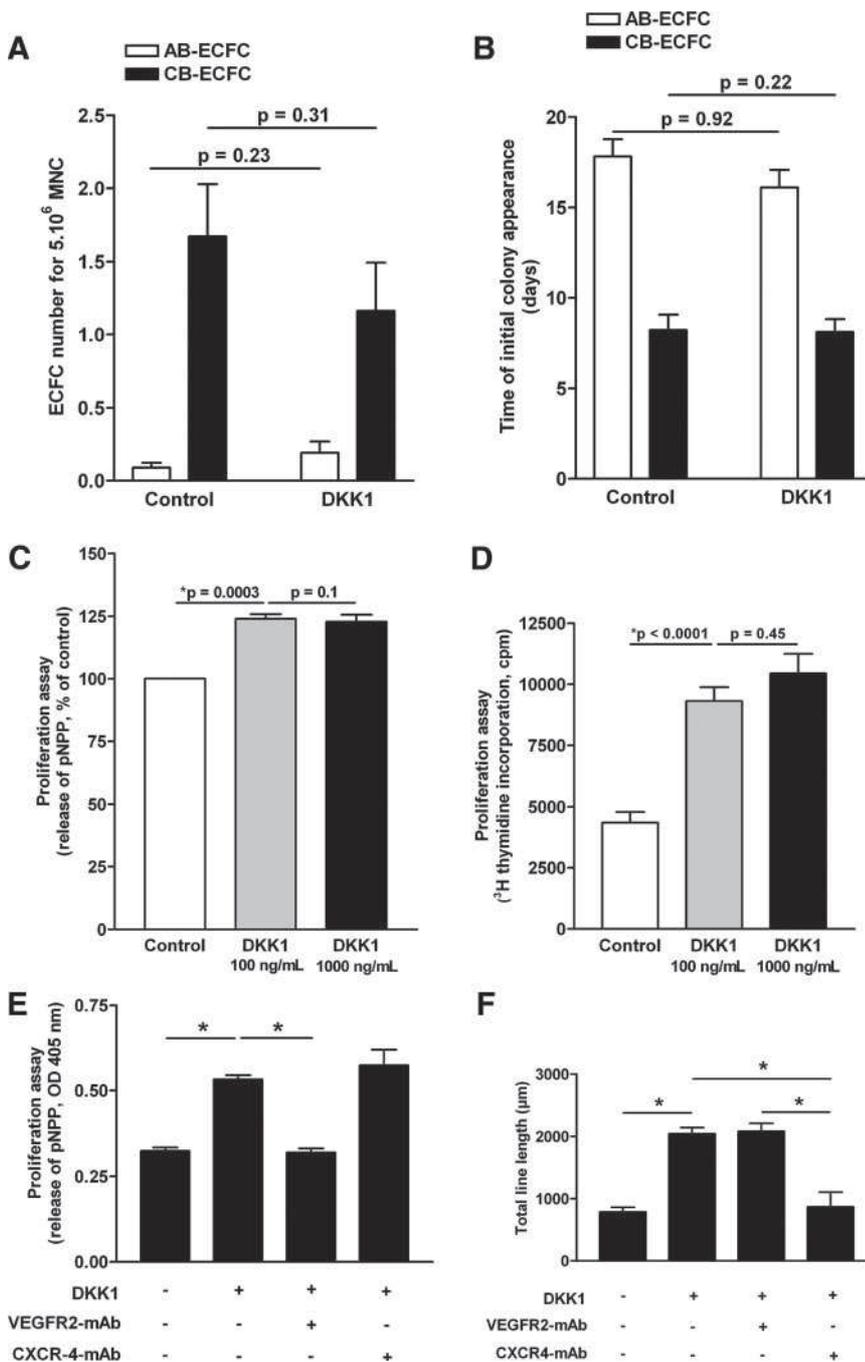
The starting material used to isolate endothelial populations consisted of mononuclear cells (MNCs) from either adult peripheral blood or human umbilical cord blood. On day 5, CAC colonies were identified as elongated sprouting cells that express leukocyte, monocyte, and endothelial markers (supplemental Figure I). ECFCs have a cobblestone appearance typical of the endothelial lineage and express only endothelial markers (supplemental Figure I). To identify the Wnt canonical pathway components expressed in human ECFCs and CACs, gene expression of LRP5, LRP6, and TCF/LEF transcription cofactors was quantified by RT-qPCR. Total RNA was isolated from adult peripheral blood and cord blood ECFCs between 30 and 40 days of culture and from CACs after 5 days of culture. LRP5/LRP6 were strongly expressed by ECFCs from both sources; they were 100-fold lower expressed by CACs (supplemental Figure II). Because these genes encode Wnt coreceptors specific for the canonical

pathway, this finding suggested that the  $\beta$ -catenin pathway is constitutively expressed in ECFCs but not in CACs. We confirmed the presence of  $\beta$ -catenin protein in ECFCs by Western blot and its absence from CACs (supplemental Figure II). We detected  $\beta$ -catenin mRNA in CACs, at a level comparable to that found in total MNCs and whole blood (supplemental Figure III) and significantly lower than that found in ECFCs from adult or cord blood. Moreover, we found strong expression of Wnt ligands and frizzled (FZD) receptors in CACs (supplemental Figure IV), strongly suggesting that the Wnt pathway is expressed in CACs, even if  $\beta$ -catenin is not detected at the protein level. *TCF/LEF* gene expression also differed between the 2 types of EPC (supplemental Figure II). Indeed, although TCF like 1 (TCFL1) and TCF like 2 (TCFL2) or TCF4 were strongly expressed in ECFCs, LEF1 and TCF7 were expressed at high levels in CACs but not in ECFCs.

### Wnt Antagonist DKK1 Enhances Angiogenesis Mediated by ECFCs in Vitro

Based on our finding that the  $\beta$ -catenin pathway is present in ECFCs, and on recent data showing a role of Wnt signaling in endothelial commitment of embryonic stem cells,<sup>19</sup> we first investigated the effect of the Wnt canonical pathway antagonist DKK1 on the emergence of ECFC colonies. As shown in Figure 1A, adding DKK1 (human recombinant DKK1, R&D Systems, Lille, France) from the first week of culture did not modify the number of ECFC colonies obtained with MNCs from either cord or adult blood ( $P=0.31$  and  $P=0.23$ , respectively). Moreover, DKK1 did not modify the length of this period ( $P=0.22$  for cord blood, and  $P=0.92$  for adult blood) (Figure 1B). We also observed a more important size of colonies observed at day 14 of culture (supplemental Figure V).

We further studied the angiogenic implication of DKK1 in cord blood–derived ECFCs. Thus, to examine the effects of DKK1 on proliferation, ECFCs were treated with recombinant DKK1 for 72 hours. As shown in Figure 1C and 1D, 100 and 1000 ng/mL of DKK1 significantly promoted ECFC proliferation, which was measured with 2 different methods (para-nitrophenyl phosphate [pNPP] release in Figure 1C and Tritiated thymidine ([<sup>3</sup>H-TdR]) incorporation in Figure 1D), with no dose effect between 100 and 1000 ng/mL. Lower doses, ranging between 1 and 10 ng/mL, had no proliferative effect on ECFCs (data not shown). To determine whether DKK1 is involved in progenitor proliferation or endothelial cell proliferation in general, we explored its effect on human umbilical vein endothelial cells and found that, in this mature cell type, DKK1 had no proliferative effects (supplemental Figure VI). We used a Matrigel model (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) to examine the capacity of DKK1-activated ECFCs to differentiate into capillary-like structures. Treatment with DKK1 induced a significant increase in ECFC organization into branched structures and pseudotubes with enclosed areas (Figure 1F). Overall, DKK1 did not modify the commitment of MNCs to ECFCs; instead, it stimulated their angiogenic properties in vitro.



**Figure 1.** DKK1 induces ECFC proliferation and differentiation by increasing VEGFR2 and CXCR4 expression, respectively. A, Quantification of ECFC numbers with and without DKK1. B, Delay of appearance of ECFC with and without DKK1. C, ECFC proliferation, evaluated by measuring pNPP release induced by DKK1, 100 and 1000 ng/mL. D, ECFC proliferation, evaluated by measuring <sup>3</sup>H thymidine incorporation induced by DKK1, 100 and 1000 ng/mL. E, VEGFR2 blockade inhibits DKK1-induced proliferation. F, CXCR4 blockade inhibits DKK1-induced tubule formation. AB indicates adult peripheral blood; CB, cord blood. \*p<0.05.

**CXCR4 and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Pathway Blockade Inhibits ECFC Proliferation and Tube Formation Induced by DKK1 Activation**

To decipher the specific role of DKK1 in ECFCs, we quantified DKK1-induced transcriptional modifications by real-time RT-qPCR. We focused on angiogenic factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF), angiopoietins, and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), and their receptors. No change in angiopoietin gene expression was observed. In contrast, we found that VEGF receptor 2 (VEGFR2), SDF-1, and chemokine (CXC motif) receptor 4 (CXCR4) were slightly increased after 8 and 12 hours; a

strong increase was observed after 24 hours (supplemental Table). CXCR4 and VEGFR2 protein expression, quantified by flow cytometry, was increased at 48 hours (supplemental Figure VII). Given the role of DKK1 in VEGFR2 and CXCR4/SDF-1 gene expression, we examined the effect of anti-CXCR4- and anti-VEGFR2-blocking antibodies on DKK1-induced proliferation and tubule morphogenesis. The proliferative effect of DKK1 was abrogated by anti-VEGFR2 but not by anti-CXCR4 (Figure 1E). Conversely, the DKK1-induced increase in tube formation in Matrigel was blocked by anti-CXCR4 but not by anti-VEGFR2 (Figure 1F) or by the irrelevant isotype-matched antibody (supplemental Figure VIII and supplemental Figure IX).

**Table. Relationship Between Expression of DKK1 and Identified DKK1-Inducible Genes in 62 Primary Breast Tumors**

Gene	DKK1 mRNA Level	
	Spearman Correlation Coefficient	P Value, Spearman Rank Correlation Test
<i>vWF</i>	0.319	0.011
<i>VEGFR2</i>	0.282	0.024
<i>CXCR4</i>	0.028	NS
<i>SDF-1</i>	0.437	0.0004

NS indicates not significant.

### Comparative DKK1, VEGFR2, and SDF-1 Pathway Gene Expression in Human Breast Tumors

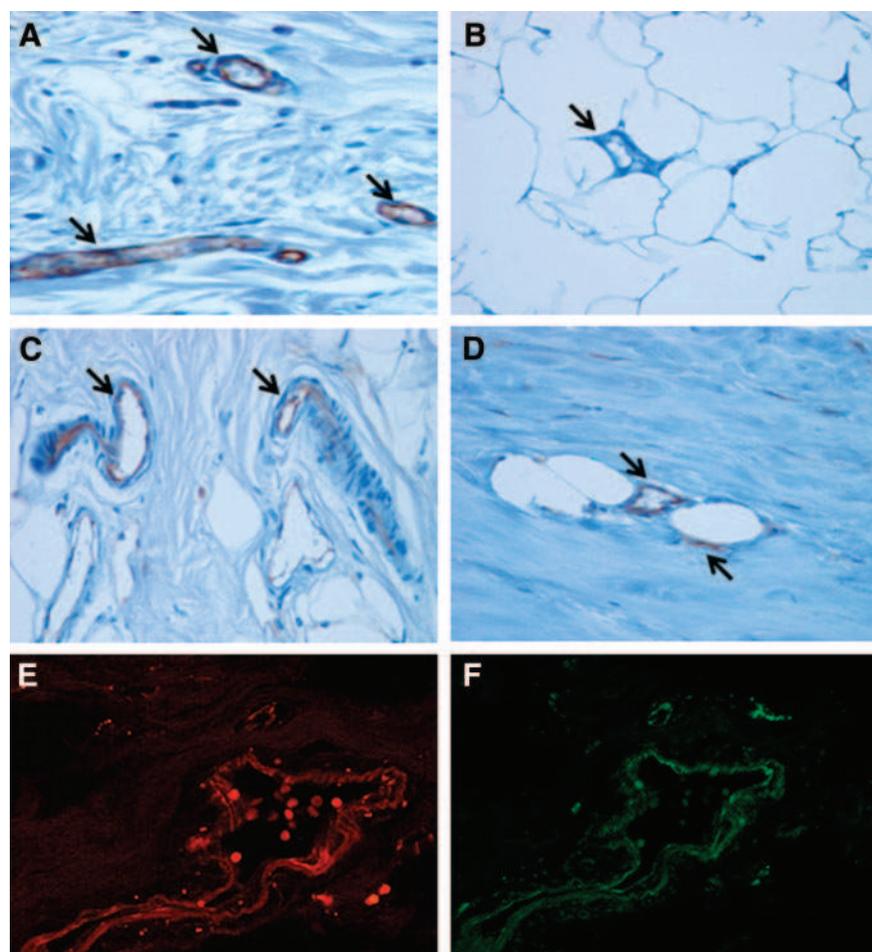
To explore the role of DKK1 in breast tumor vascularization, we quantified the expression of DKK1, VEGFR2, CXCR4, and SDF-1 by real-time RT-qPCR and the degree of neovascularization, quantified by von Willebrand factor (vWF) expression, in a well-characterized series of 62 estrogen receptor  $\alpha$ -positive human breast tumors. We found that DKK1 expression was increased in breast cancer tissue compared with normal breast tissue (data not shown) and that DKK1 correlated positively with vWF content and with VEGFR2 and SDF-1 transcript levels (Spearman rank correlation test, Table).

The association between DKK1 expression and tumor vascularization was confirmed at the protein level by com-

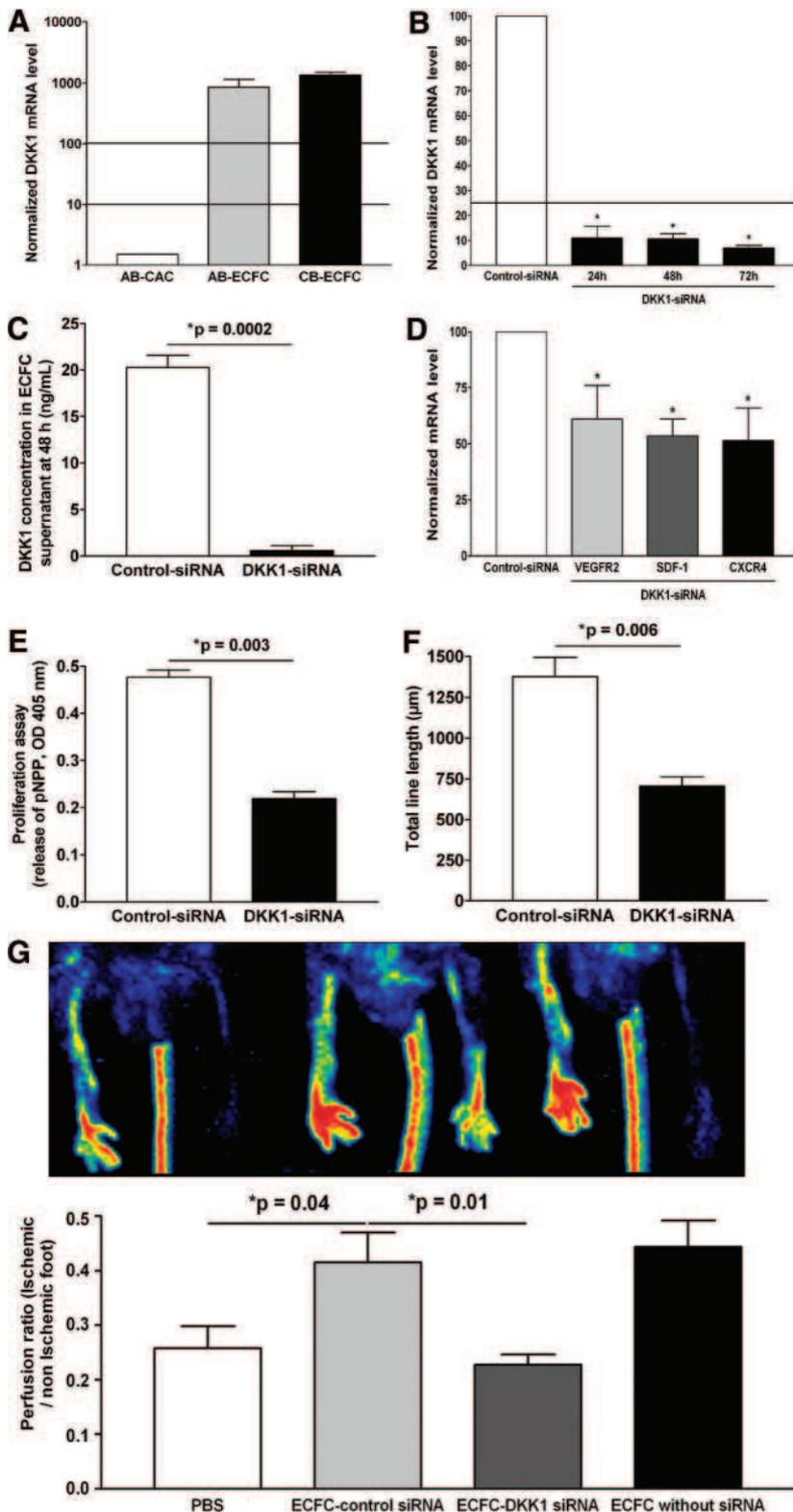
parative immunohistochemical analysis of tissue sections from human breast malignant tissues (n=5) and normal breast tissues (n=5). Vessels present in the tumor specimens and healthy breast tissues stained positive for CD31, whereas only tumor vessels stained positive for DKK1 (Figure 2A through 2D). Moreover, we quantified, by immunofluorescence analysis, the expression of CD31 (red, Figure 2E) and DKK1 (green, Figure 2F) and show a colocalization of CD31 and DKK1 in endothelial cells of human breast cancer (merge, supplemental Figure X).

### DKK1 Silencing in Cord Blood ECFCs Decreases Their Angiogenic Phenotype

EPCs are involved in cancer development and neovascularization, and the level of angiogenic activity in breast tumors is a prognostic factor.<sup>20</sup> Newly formed vessels that appear after treatment with bone marrow (BM)-MNCs in patients with critical leg ischemia have an ECFC phenotype,<sup>12</sup> confirming preclinical data from Yoder et al.<sup>11</sup> Herein, we found that ECFCs expressed DKK1 transcripts, contrary to CACs (Figure 3A). We then explored the effect of *DKK1* gene inhibition by RNA interference on ECFC angiogenic potential. We verified that DKK1 mRNA expression remained strongly inhibited by the specific small and interfering RNA (siRNA) during the days after transfection (Figure 3B) and confirmed that siRNA induces a strong decrease in DKK1 levels in ECFC supernatants ( $P=0.0002$ , Figure 3C). We then



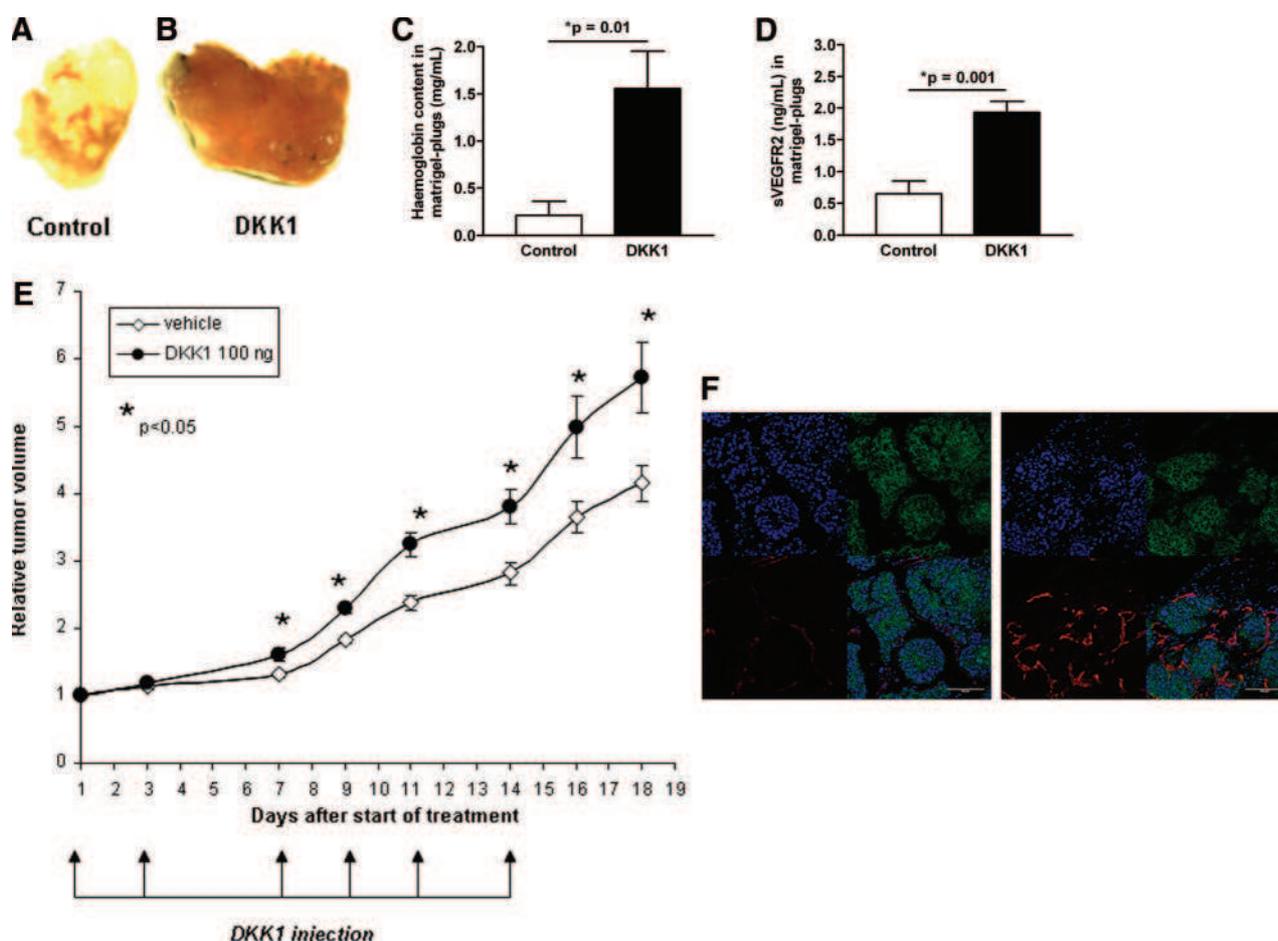
**Figure 2.** DKK1 is expressed in ECFCs and blood vessels from human breast cancer. A and B, Blood vessels from healthy breast tissue stain positive for CD31 (A) and negative for DKK1 (B). C and D, Tumor blood vessels of human breast cancer stain positive for CD31 (C) and DKK1 (D). Blood vessels are marked by arrows. E and F, Positivity of tumor blood vessels was confirmed by double labeling by immunofluorescence analysis (red, CD31; green, DKK1; original magnification  $\times 40$ ).



**Figure 3.** Inhibition of DKK1 in ECFC decreases their angiogenic potential in vivo. A, The *DKK1* gene is expressed by ECFCs, contrary to CACs. B, Quantitative analysis of DKK1 mRNA by RT-qPCR, after 24, 48, and 72 hours of transfection with control-siRNA and DKK1-siRNA. The mean±SEM of 3 experiments is shown.  $P<0.05$ . C, Quantitative analysis of DKK1 release over 24 hours in conditioned medium of ECFCs after 48 hours of transfection. The mean±SEM of 3 experiments is shown.  $P<0.05$ . D, Inhibition of DKK1 in ECFCs decreases expression of VEGFR2, SDF-1, and CXCR4 (RT-qPCR). Values are given as mean±SEM (n=3). E, Inhibition of DKK1 in ECFCs decreases proliferation potential of ECFCs, measured by pNPP release. Values are given as mean±SEM (n=3). F, Inhibition of DKK1 in ECFCs decreases pseudotube formation by ECFCs. Values are given as mean±SEM (n=3). G, Inhibition of DKK1 in ECFCs decreases their proangiogenic potential in hind limb ischemia. Values are given mean±SEM (n=10). Upper panel: left=PBS, middle=ECFC-control siRNA, right=ECFC-DKK1 siRNA. AB indicates adult peripheral blood; CB=cord blood. \* $P<0.05$ .

explored the effect of *DKK1* gene inhibition on the angiogenic properties of ECFCs in vivo. DKK1 inhibition resulted in decreased expression of SDF-1, CXCR4, and VEGFR2 (Figure 3D). These findings are in line with an autocrine effect of DKK1 on ECFCs, which partially reproduces the effect of exogenous DKK1. We then studied the effect of DKK1 inhibition on ECFC

angiogenic properties and found that DKK1-siRNA induced a strong decrease in proliferation and pseudotube formation (Figure 3E and 3F). Finally, we tested DKK1-inhibited ECFCs in a nude mouse model of hind limb ischemia and found a significant decrease of revascularization of DKK1-inhibited ECFCs compared with control ECFCs ( $P<0.05$ , Figure 3G).



**Figure 4.** DKK1 increases neovascularization in vivo. A, Matrigel plugs in C57/Bl6J wild-type mice with basic fibroblast growth factor (bFGF). B, Matrigel plugs in C57/Bl6J wild-type mice with bFGF and DKK1, 100 ng per plug. C, Quantification of hemoglobin content in plugs. D, Quantification of sVEGFR2 level in plugs. E, Tumor growth curves of HBCx-12 breast cancer xenograft as a function of time, peritumorally treated with DKK1 (100 ng) or control vehicle. F, Many mouse blood vessels at the tumor periphery stain positive for CD31 (red) in breast cancer xenografts treated with DKK1 (right) in contrast to a nontreated xenograft (left). The human carcinoma cell membrane is stained with EpCAM (green). The scale bar indicates 100  $\mu\text{m}$ .

### Effect of DKK1 on Angiogenesis In Vivo

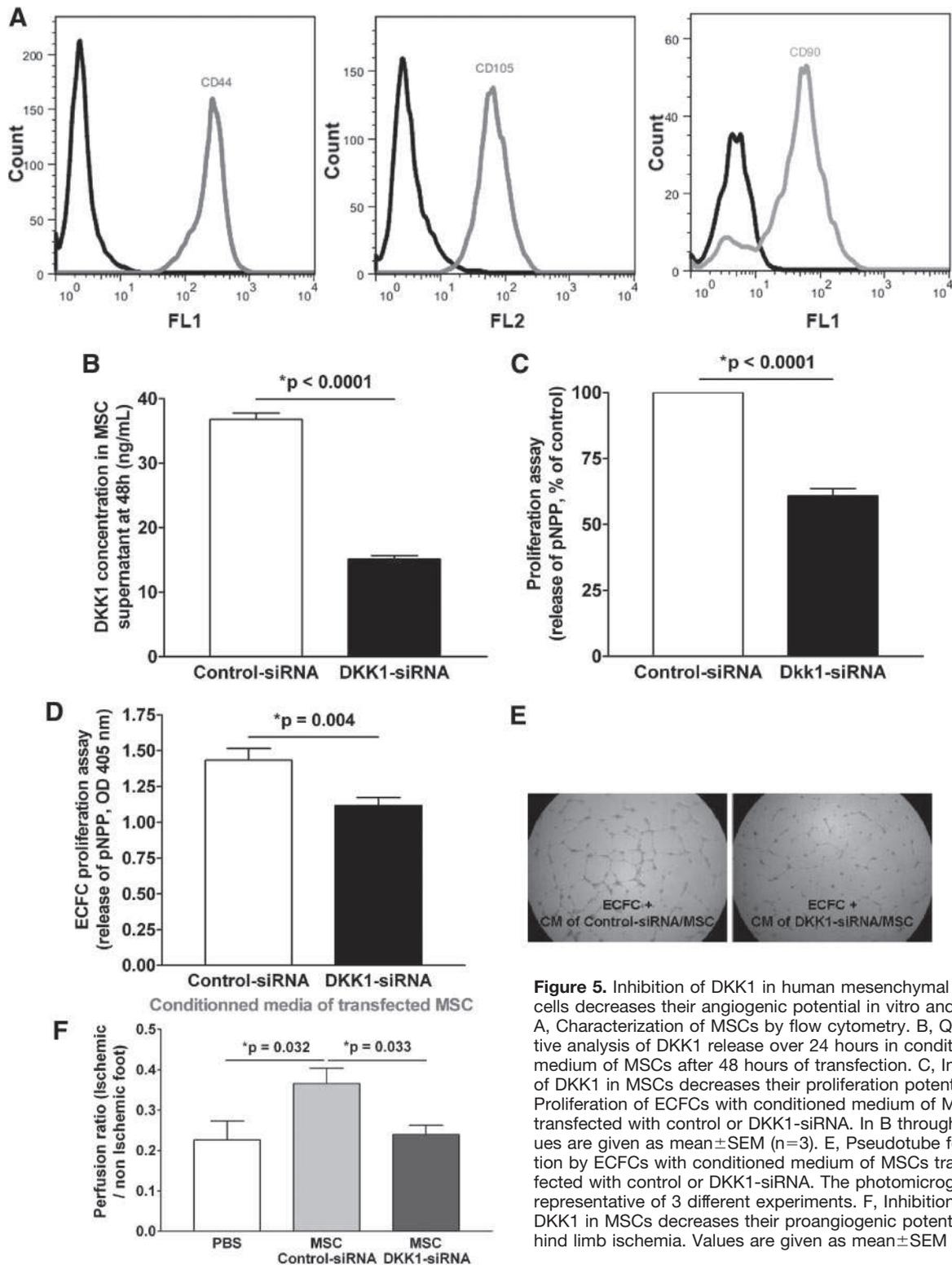
We used the Matrigel plug assay as a model of in vivo angiogenesis. Basic fibroblast growth factor-containing plugs, with and without DKK1 (100 or 1000 ng per plug, mouse recombinant DKK1, R&D Systems, Lille, France), were implanted subcutaneously in C57/Bl6J mice. The plugs were recovered 14 days later, and their blood vessel content was analyzed. DKK1 enhanced blood vessel formation in the plugs macroscopically (Figure 4A and 4B), as confirmed by measuring the hemoglobin content (Figure 4C and supplemental Figure XI) and the soluble VEGFR2 (sVEGFR2) content (Figure 4D).

To confirm in a second model the implication of DKK1 in neovascularization, we used a model of breast cancer xenograft in nude mice. When the tumor reached a volume of approximately 200  $\text{mm}^3$ , mice were injected peritumorally with 100 or 500 ng of DKK1 every 3 days over 14 days. Tumor development was monitored every 3 to 4 days using a caliper. As shown in Figure 4E, a significant tumor growth increase was obtained by the administration of 100 ng per mouse ( $P < 0.05$ ). Similar results were obtained with 500 ng

per animal (data not shown). Because these data suggested that neovascularization could have promoted tumor development, mice were euthanized at day 18 after the beginning of the treatment and tumors were collected for immunofluorescent assays. Anti-CD31 staining clearly revealed that xenografts treated with DKK1 displayed more blood vessels (Figure 4F, right panel) than those injected only with the vehicle (Figure 4F, left panel).

### DKK1 Silencing in Mesenchymal Stem Cells Decreases Their Angiogenic Potential

MSCs have been described in the tumor angiogenic process<sup>21</sup> and are a potential source of DKK1.<sup>22</sup> We used MSCs isolated from the bone marrow of patients with critical leg ischemia (Figure 5A) and inhibited DKK1 secretion by RNA interference (Figure 5B). Decreased DKK1 expression was associated with a decrease in MSC proliferation (Figure 5C). The conditioned medium of MSCs transfected with DKK1-siRNA or control-siRNA was used to activate ECFCs. We found that MSC-conditioned medium from DKK1-siRNA-transfected MSCs had a smaller effect on ECFC proliferation



**Figure 5.** Inhibition of DKK1 in human mesenchymal stem cells decreases their angiogenic potential in vitro and in vivo. **A**, Characterization of MSCs by flow cytometry. **B**, Quantitative analysis of DKK1 release over 24 hours in conditioned medium of MSCs after 48 hours of transfection. **C**, Inhibition of DKK1 in MSCs decreases their proliferation potential. **D**, Proliferation of ECFCs with conditioned medium of MSCs transfected with control or DKK1-siRNA. In **B** through **D**, values are given as mean±SEM (n=3). **E**, Pseudotube formation by ECFCs with conditioned medium of MSCs transfected with control or DKK1-siRNA. The photomicrograph is representative of 3 different experiments. **F**, Inhibition of DKK1 in MSCs decreases their proangiogenic potential in hind limb ischemia. Values are given as mean±SEM (n=10).

(Figure 5D) and pseudotube formation (Figure 5E) compared with control siRNA-transfected MSCs. Finally, MSCs transfected with DKK1-siRNA had lower angiogenic potential in ischemic nude mice (Figure 5F). These results suggest that MSCs have angiogenic potential in vitro on ECFCs and in vivo, probably, at least in part, because of their secretion of DKK1.

### Discussion

Recent studies<sup>1,19</sup> have suggested an important role of Wnt signaling in vascular development and cancer. Herein, we show that the Wnt antagonist DKK1 is an angiogenic factor for ECFCs, which participate in neovessel formation in human and preclinical models of lower-limb ischemia.<sup>11,12</sup> As a role of the Wnt canonical inhibitor, DKK1 has been

implicated in malignant neoplasms, a situation in which neoangiogenesis is strongly enhanced; we chose to explore the function of DKK1 in ECFCs. Physiologically, DKK1 mobilizes progenitor cells from the bone marrow endosteal stem cell niche.<sup>4</sup> In breast cancer, the DKK1 expression level correlates with the rate of progression.<sup>23</sup> In atherosclerosis, DKK1 is overexpressed in plaque and enhances the inflammatory interaction between platelets and endothelial cells.<sup>3</sup> However, little is known about the role of DKK1 in adult angiogenesis mediated by ECFCs.

Aicher et al<sup>4</sup> showed that DKK1 suppresses canonical Wnt signaling in bone marrow endosteal cells, suggesting a regulatory role for DKK1 in the bone marrow stem cell niche. Intriguingly, DKK1 mobilized vasculogenic progenitor cells without concomitant release of inflammatory cells.<sup>4</sup> CACs are committed to the endothelial lineage but retain monocyte markers. These cells could be considered as inflammatory cells because they are mobilized in this context.<sup>24</sup> One possible explanation for the lack of mobilization could be inadequate LRP5/LRP6 levels and  $\beta$ -catenin pathway activity in inflammatory cells, as observed in CACs.

Wnt signaling modulates the stem cell niche and directly modulates stem cell proliferation, expansion, and differentiation. Moreover, Wnt was recently shown to induce embryonic stem cell commitment to the endothelial lineage.<sup>19</sup> Therefore, DKK1 might diminish, rather than enhance, ECFC proliferation. The observed stimulation of ECFC proliferation by DKK1 may be explained by the fact that DKK1 can only affect progenitor cells with active Wnt signaling. Indeed, our experiments involved homogeneous populations raised from single EPCs. These findings suggest that DKK1 might have the potential to enhance vasculogenic cell therapy approaches.

Herein, we show that DKK1 added to the plugs enhances vascularization *in situ*. In the experiments conducted by Aicher et al,<sup>4</sup> DKK1 systemically administered induced a mobilization of stem cells from the bone marrow niche into the plugs. One limitation of our study is the difficulty in demonstrating that Wnt signaling is blocked in the presence of DKK1 in the vessels within the Matrigel plugs *in vivo*. Moreover, we cannot exclude any effect of DKK1 on a wide variety of cells (eg, leukocytes, which may be recruited [or prevented from being recruited] into the Matrigel plugs). These cells might produce angiogenic factors and could directly affect local endothelium. However, we explored DKK1 effect on human umbilical vein endothelial cells and found that, in this mature cell type, DKK1 had no influence on proliferation.

DKK1 was recently reported to be involved in cardiovascular lineage commitment.<sup>25</sup> However, therapies based on DKK1 may result in increased mobilization of vasculogenic progenitor cells and, subsequently, in increased local neovascularization processes that might burst tumor progression. In atherosclerosis, a recent study<sup>3</sup> showed that platelets are an important source of DKK1 and that DKK1 influences platelet-mediated endothelial cell activation and atherosclerotic lesions. Given the importance of platelets as a source of both angiogenic factors, such as VEGF, and DKK1, modulation of platelet secretion might represent a further means of control-

ling angiogenesis, especially during cancer. DKK1 blockade has recently been proposed as a therapeutic measure in multiple myeloma.<sup>26</sup> Our findings that DKK1 is involved in EPC-related neoangiogenesis and in breast tumor vascularization confirm DKK1 as a potential treatment target and also designate it as a potential new marker of proliferative or tumoral endothelium, in the same way as DKK3.<sup>7</sup> DKK1 serum levels are increased in breast cancer,<sup>5</sup> and ECFCs appear to contribute to tumor neovascularization and dissemination.<sup>14</sup> Herein, we show that DKK1 enhances the angiogenic potential of ECFCs. DKK1 could act in concert with proangiogenic growth factors produced by tumor cells themselves or with the inflammatory environment, thereby enhancing metastatic potential. We found a correlation between DKK1 expression and human breast tumor vascularity, quantified by vWF expression. Moreover, the DKK1 signaling pathway correlated with VEGFR2 and SDF-1 expression, as found in our *in vitro* cellular model of ECFCs. The lack of correlation between DKK1 and CXCR4 in these tumors suggests that a more complex mechanism operates *in vivo*, possibly involving endothelium-stroma-tumor interactions. One possibility is that CXCR4 is strongly expressed by breast cancer cells.<sup>27</sup>

Finally, we showed the angiogenic effects of DKK1 secreted by other cells known to be indirectly involved in angiogenesis, such as MSCs. Because MSCs have been described in the tumor angiogenic process<sup>21</sup> and are a potential source of DKK1,<sup>22</sup> we inhibited DKK1 in MSCs and showed, such as previously described for another Wnt inhibitor (ie, frizzled-related protein-1 [FRP1]),<sup>28,29</sup> that secreted DKK1 had an angiogenic effect on ECFCs. Moreover, DKK1-inhibited MSCs had a smaller therapeutic angiogenic effect *in vivo*.

In conclusion, we present evidence that the Wnt inhibitor, DKK1, modulates ECFC angiogenic *in vitro* and *in vivo* properties. DKK1 could exert its effects via the VEGFR2 and SDF-1 signaling pathways. The positive correlation between DKK1 expression and vWF, VEGFR2, and SDF-1 expression in breast tumors suggests that dysregulated or DKK1-stimulated EPCs might play an important role in breast cancer and neovascularization. As a specific angiogenic growth factor, DKK1 might serve to optimize regenerative cell therapy and as a therapeutic target for inhibiting neovascularization.

### Acknowledgments

We thank Chantal Martin and all technicians from the animal facility of IMTCE; and the maternity department of Begin hospitals for providing cord blood. Umbilical cord blood samples were collected from consenting mothers.

### Sources of Funding

This study was supported by a grant from Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) (Dr d'Audigier); a grant from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM); grant from Programme Hospitalier pour la Recherche Clinique (PHRC) Appel d'Offre Ministériel (AOM) n° 03 034, Optimization of Progenitor Endothelial Cells in the Treatment of Critical Leg Ischemia (OPTITEC) (sponsor Assistance Public des Hôpitaux de Paris); and grant 04CVD01 from the Leducq TransAtlantic Network of Excellence on Atherothrombosis Research.

## Disclosures

None.

## References

- Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR III, Nusse R. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*. 2003;423:448–452.
- Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci*. 2003;116:2627–2634.
- Ueland T, Otterdal K, Lekva T, Halvorsen B, Gabrielsen A, Sandberg WJ, Paulsson-Berne G, Pedersen TM, Folkersen L, Gullestad L, Oie E, Hansson GK, Aukrust P. Dickkopf-1 enhances inflammatory interaction between platelets and endothelial cells and shows increased expression in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:1228–1234.
- Aicher A, Kollet O, Heeschen C, Liebner S, Urbich C, Ihling C, Orlandi A, Lapidot T, Zeiher AM, Dimmeler S. The Wnt antagonist Dickkopf-1 mobilizes vasculogenic progenitor cells via activation of the bone marrow endosteal stem cell niche. *Circ Res*. 2008;103:796–803.
- Voorzanger-Rousselot N, Journe F, Doriath V, Body JJ, Garnero P. Assessment of circulating Dickkopf-1 with a new two-site immunoassay in healthy subjects and women with breast cancer and bone metastases. *Calcif Tissue Int*. 2009;84:348–354.
- St Croix B, Rago C, Velculescu V, Traverso G, Romans KE, Montgomery E, Lal A, Riggins GJ, Lengauer C, Vogelstein B, Kinzler KW. Genes expressed in human tumor endothelium. *Science*. 2000;289:1197–1202.
- Fong D, Hermann M, Untergasser G, Pirkebner D, Draxl A, Heitz M, Moser P, Margreiter R, Hengster P, Amberger A. Dkk-3 expression in the tumor endothelium: a novel prognostic marker of pancreatic adenocarcinomas. *Cancer Sci*. 2009;100:1414–1420.
- Davidoff AM, Ng CY, Brown P, Leary MA, Spurbeck WW, Zhou J, Horwitz E, Vanin EF, Nienhuis AW. Bone marrow-derived cells contribute to tumor neovasculature and, when modified to express an angiogenesis inhibitor, can restrict tumor growth in mice. *Clin Cancer Res*. 2001;7:2870–2879.
- Peters BA, Diaz LA, Polyak K, Meszler L, Romans K, Guinan EC, Antin JH, Myerson D, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW, Lengauer C. Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat Med*. 2005;11:261–262.
- Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Heibel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest*. 2000;105:71–77.
- Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, Krasich R, Temm CJ, Prchal JT, Ingram DA. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*. 2007;109:1801–1809.
- Smadja DM, Bieche I, Silvestre JS, Germain S, Cornet A, Laurendeau I, Duong-Van-Huyen JP, 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*. 2008;28:2137–2143.
- Untergasser G, Koeck R, Wolf D, Rumpold H, Ott H, Debbage P, Koppelstaetter C, Gunsilius E. CD34+/CD133– circulating endothelial precursor cells (CEP): characterization, senescence and in vivo application. *Exp Gerontol*. 2006;41:600–608.
- Gao D, Nolan D, McDonnell K, Vahdat L, Benezra R, Altorki N, Mittal V. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells contribute to the angiogenic switch in tumor growth and metastatic progression. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1796:33–40.
- Naik RP, Jin D, Chuang E, Gold EG, Tousimis EA, Moore AL, Christos PJ, de Dalmas T, Donovan D, Rafii S, Vahdat LT. Circulating endothelial progenitor cells correlate to stage in patients with invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;107:133–138.
- Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, Oh BH, Lee MM, Park YB. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:288–293.
- Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, Pollok K, Ferkowicz MJ, Gilley D, Yoder MC. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*. 2004;104:2752–2760.
- Marangoni E, Vincent-Salomon A, Auger N, Degeorges A, Assayag F, de Cremoux P, de Plater L, Guyader C, De Pinieux G, Judde JG, Rebutti M, Tran-Perennou C, Sastre-Garau X, Sigal-Zafrani B, Delattre O, Dieras V, Poupon MF. A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays. *Clin Cancer Res*. 2007;13:3989–3998.
- Wang H, Charles PC, Wu Y, Ren R, Pi X, Moser M, Barshishat-Kupper M, Rubin JS, Perou C, Bautch V, Patterson C. Gene expression profile signatures indicate a role for Wnt signaling in endothelial commitment from embryonic stem cells. *Circ Res*. 2006;98:1331–1339.
- Shivakumar S, Prabhakar BT, Jayashree K, Rajan MG, Salimath BP. Evaluation of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and microvessel density (MVD) as prognostic indicators in carcinoma breast. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009;135:627–636.
- Rhodes LV, Muir SE, Elliott S, Guillot LM, Antoon JW, Penforis P, Tilghman SL, Salvo VA, Fonseca JP, Lacey MR, Beckman BS, McLachlan JA, Rowan BG, Pochampally R, Burow ME. Adult human mesenchymal stem cells enhance breast tumorigenesis and promote hormone independence. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;121:293–300.
- Qiao L, Xu ZL, Zhao TJ, Ye LH, Zhang XD. Dkk-1 secreted by mesenchymal stem cells inhibits growth of breast cancer cells via depression of Wnt signalling. *Cancer Lett*. 2008;269:67–77.
- Mikheev AM, Mikheeva SA, Maxwell JP, Rivo JV, Rostomily R, Swisshelm K, Zarbl H. Dickkopf-1 mediated tumor suppression in human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;112:263–273.
- Smadja DM, Bieche 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*. 2009;13:2534–2546.
- Yang L, Soonpaa MH, Adler ED, Roepke TK, Kattman SJ, Kennedy M, Henckaerts E, Bonham K, Abbott GW, Linden RM, Field LJ, Keller GM. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature*. 2008;453:524–528.
- Fulciniti M, Tassone P, Hideshima T, Vallet S, Nanjappa P, Ettenberg SA, Shen Z, Patel N, Tai YT, Chauhan D, Mitsiades C, Prabhala R, Raje N, Anderson KC, Stover DR, Munshi NC. Anti-DKK1 mAb (BHQ880) as a potential therapeutic agent for multiple myeloma. *Blood*. 2009;114:371–379.
- Dewan MZ, Ahmed S, Iwasaki Y, Ohba K, Toi M, Yamamoto N. Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 receptor interaction in tumor growth and metastasis of breast cancer. *Biomed Pharmacother*. 2006;60:273–276.
- Dufourcq P, Descamps B, Tojais NF, Leroux L, Oses P, Daret D, Moreau C, Lamaziere JM, Couffignal T, Duplax C. Secreted frizzled-related protein-1 enhances mesenchymal stem cell function in angiogenesis and contributes to neovessel maturation. *Stem Cells*. 2008;26:2991–3001.
- Ezan J, Leroux L, Barandon L, Dufourcq P, Jaspard B, Moreau C, Allieres C, Daret D, Couffignal T, Duplax C. FrzA/sFRP-1, a secreted antagonist of the Wnt-Frizzled pathway, controls vascular cell proliferation in vitro and in vivo. *Cardiovasc Res*. 2004;63:731–738.

## **The Wnt antagonist Dickkopf-1 increases endothelial progenitor cell angiogenic potential**

David M. Smadja et al. Supplementary data

---

### **Materials and methods**

#### **Preparation of mononuclear cells (MNC)**

Cord or adult blood was diluted 1:1 with PBS, EDTA 0.2 M and overlaid on Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Cells were centrifuged at 1200 *g* for 20 min. MNC were collected and washed three times in PBS, EDTA 0.2 M.

#### **EPC culture and transfection**

CAC and ECFC were cultured and characterized as described in detail elsewhere <sup>1-5</sup>. Recombinant DKK1 from R&D Systems (Lille, France) was added to ECFC on the first day of culture and was present in all freshly added media. DKK1 has been tested on ECFC commitment in adult and cord blood, while angiogenic effect has been studied only in cord blood derived ECFC.

SiRNA silencing DKK1 (sc-37082, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) or Id2 (sc-38000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) was mixed with the Primefect reagent (LONZA) at 10  $\mu$ M to obtain transfection complexes, which were added to  $2 \times 10^5$  cord blood (CB) late EPC in 6-well plates containing complete EGM2 medium. Scrambled siRNA at 10  $\mu$ M (Allstars Neg. control siRNA, Qiagen, Cambridge, MA, USA) was used as control.

### **Real-time quantitative RT-PCR**

The theoretical and practical aspects of real-time quantitative RT-PCR on the ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Perkin-Elmer Applied Biosystems Courtaboeuf, France) are described in detail elsewhere.<sup>6</sup> Primers for *TBP* and the target genes (nucleotide sequences available on request) were chosen with the assistance of Oligo 5.0 software (National Biosciences, Plymouth, MN, USA).

### **Cell proliferation assay**

The effect of DKK1 and siRNA Id2 on ECFC proliferation was examined by measuring cell phosphatase activity based on the release of paranitrophenol (pNPP) (Sigma) measured at OD 405 nm (Fluostar optima; BMG labtech, Champigny-sur-Marne, France) after 72 h of incubation. EPC were activated in 5% FBS-EBM2 medium containing recombinant DKK1 (100 ng/mL, R&D systems).

### ***In vitro* Matrigel tube formation assay**

ECFC ( $3 \times 10^4$  cells/well) treated with 100 ng/ml DKK1 in 5% FBS-EBM2 medium were seeded on growth-factor-reduced Matrigel (200  $\mu$ l) (BD Biosciences) and cultured for 18 h at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. Capillary-like structures were observed by phase-contrast microscopy and networks formed by ECFC were quantified with Videomet software version 5.4.0.

### ***In vivo* Matrigel-plug assay**

As previously described<sup>7</sup>, Matrigel-plugs were prepared on ice by mixing Matrigel (BD Matrigel Matrix) with recombinant mouse bFGF (750 ng/mL, R&D systems) in the presence or absence of recombinant mouse DKK1 (200 ng per mL of Matrigel). The haemoglobin concentration was measured in the supernatants with Drabkin's reagent (Sigma, Saint Louis,

Mo, USA). The mouse sVEGFR2 concentration in the supernatant was determined with an ELISA method (R&D Systems), following the manufacturer's instructions.

### **Human breast carcinoma xenografts in mice**

Human breast carcinoma HBCx-12 xenograft has been previously described<sup>8</sup>. HBCx-12 xenograft fragments of 30 mm<sup>3</sup> were subcutaneously grafted into the interscapular fat pad of 4- to 6-week-old female athymic nude mice (Janvier, Le Genest St Isle, France).

When the tumors reached a volume of approximately 200 mm<sup>3</sup>, animals were ranked according to the tumor volume and divided into three groups (6 animals per group) such that the mean and median of tumor volume of the three groups were closely matched. Treatment was started on day 1 and given during 3 weeks. Mice were injected twice a week peritumorally with recombinant mouse DKK1 at a dosage of 100 ng or 500 ng /animal, or with PBS containing 0.1% Bovine Serum Albumine (MP Biomedicals, Illkirch, France) as vehicle control, in a total volume of 100 µL. Tumors were measured thrice per week with calipers and each volume (V) was calculated according to the following formula:  $V = a \times b^2 / 2$ , where a and b are the largest and smallest perpendicular tumor diameters. Relative tumor volumes (RTV) were calculated from the following formula:  $RTV = (V_x/V_1)$ , where  $V_x$  is the tumor volume on day x and  $V_1$  is the tumor volume at initiation of treatment (day 1). Statistical significance of differences observed between the individual RTVs corresponding to the treated mice and control groups was calculated by the paired Student's t test.

### **Tissue processing and immunofluorescence**

For confocal microscopy, HBCx-12 tumors were fixed overnight in 4% paraformaldehyde at 4°C, cryoprotected in 15% sucrose before freezing in cryomatrix (Thermo Shandon, Cergy Pontoise, France) with liquid nitrogen-cooled isopentane. Cryosections of embedded tumors

were cut at 10- $\mu$ m thickness, air-dried, and treated with 50 mmol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in PBS for 15 minutes. Sections were then solubilized with 0.2% Triton X-100 for 15 minutes and blocked with PBS containing 1% BSA and 10% goat serum for 1h. Tumors sections were stained at room temperature for 1h with anti-human EpCAM (clone HEA-125) fluorescein isothiocyanate (Miltenyi-Biotec SAS, Paris, France) and anti-mouse CD31 (BD Pharmingen, Evry, France) in PBS followed by an incubation with anti-rat Alexa-Fluor<sup>®</sup>555 secondary antibody (Invitrogen-Molecular Probes, Cergy Pontoise, France) for 30 minutes. The DNA marker, TOPRO-3 (Invitrogen-Molecular Probes) was then applied for 10 min at room temperature. Sections were mounted in glycerol/PBS (90/10: v/v) and images were recorded on a Leica TCS SP2 confocal microscope.

### **Patients with ER $\alpha$ -positive breast tumors**

To identify correlations between mRNA levels of the genes of interest *in vivo*, we analyzed a well-characterized series of 62 ER $\alpha$ -positive breast tumors excised at René Huguenin Hospital (St Cloud, France). Immediately after surgery the tumor samples were placed in liquid nitrogen until RNA extraction. The patients met the following criteria: primary unilateral non metastatic breast carcinoma; complete clinical, histological and biological information available; no radiotherapy or chemotherapy before surgery; and full follow-up at this institution. Estrogen receptor alpha status was determined at the protein level by enzyme immunoassay and confirmed by ER $\alpha$  mRNA real-time quantitative RT-PCR assay<sup>9</sup>.

### **Immunohistochemistry of human breast tissue**

Paraffin-embedded tissue sections were deparaffinized and hydrated in xylene and graded alcohol series. Antigen retrieval was achieved by microwave treatment in citrate buffer (10 mM, pH 6.0), and endogenous peroxidase activity was blocked with 5%  $\text{H}_2\text{O}_2$ /methanol.

Sections were incubated in blocking solution containing 10% bovine calf serum (Dako Cytomation) for 45 min and then stained for 1 h with primary antiserum (rabbit anti-human DKK1 polyclonal, ab61034, Abcam<sup>®</sup>, Cambridge, UK). Serial sections were also incubated with a mouse anti-human CD31 monoclonal (1:40, Dako Cytomation). Immunohistochemistry (IHC) slide were performed the NexES System's automated technology (Ventana<sup>®</sup>).

### **Statistical analysis**

Data are shown as means  $\pm$  SEM. Significant differences were identified by ANOVA followed by Fisher's protected least-significant-difference test. Correlations between DKK1 and target tumoral gene expression (continuous variables) were tested with Spearman's non parametric rank correlation test. Differences were considered significant at confidence levels greater than 95% ( $p < 0.05$ ). The Stat View software package (SAS, Cary, NC, USA) was used for all statistical tests.

## **Supplementary Results:**

### **Effect of DKK1 on ECFC commitment**

#### **(Figure 1A, 1B and supplementary Figure V)**

As shown in figure 1A, adding DKK1 the first week of culture did not modify the number of ECFC colonies obtained with MNC from either cord blood or adult blood ( $p = 0.31$  and  $p = 0.23$  for cord and adult blood, respectively). These results were obtained with 10 cord blood samples and 8 adult blood samples. We also underline differences in ECFC numbers according to the origin of blood: counts were 25-fold higher in cord blood (median 2 colonies per  $5 \times 10^6$  MNC) than in adult blood (0.08 colony). As previously described by Yoder's group, ECFC emerged more rapidly from cord blood (median 7 days) than from adult blood (17.5 days), and DKK1 did not modify the length of this period (Figure 1B,  $p = 0.22$  for cord blood,  $p = 0.92$  for adult blood). Moreover, we observed a more important size of colonies observed at day 14 of culture (supplementary Figure V).

### **Reversal of DKK1-induced cytokine expression and angiogenesis by Id2 silencing (supplementary figure XII)**

To understand mechanism of DKK1 induced angiogenesis, we also focused our attention on two well-known Wnt-inducible genes, MSX2 and Id2<sup>10-12</sup>. While no MSX-2 modification was observed, the level of Id2 mRNA increased rapidly (after 1 hour) after DKK1 treatment (100 ng/mL) of ECFC. Id2 mRNA level was inhibited by an average of 92%, 48 h after ECFC transfection with specific siRNA at 10  $\mu$ M. Id2-siRNA-transfected ECFC were incubated with 100 ng/mL DKK1. Id2 silencing roughly halved VEGFR2 expression compared to cells transfected with the control-siRNA, and completely abolished basal CXCR4 and SDF-1

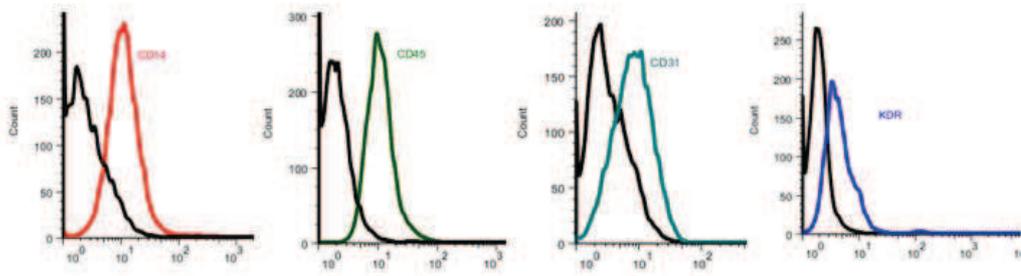
mRNA levels. DKK1 no longer exerted its stimulatory effect on VEGFR2, CXCR4 and SDF-1 expression.

To confirm the role of VEGFR2, CXCR4 and SDF-1 via Id2, we quantified proliferation and tube formation by Id2-siRNA-transfected cells in basal conditions and after DKK1 activation. DKK1 activation of Id2-siRNA-transfected ECFC induced no proliferation or tubule formation, confirming the importance of Id2 activation in DKK1-induced ECFC angiogenesis *in vitro*.

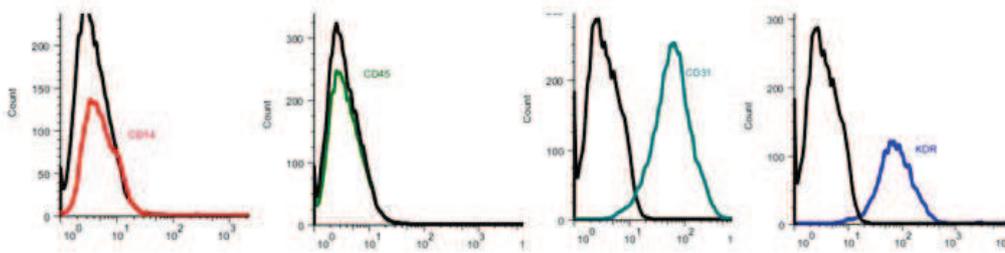
DKK1 effects are at least partly mediated by Id2, which upregulates KDR/VEGFR2, SDF-1 and CXCR4 gene expression. Other teams have obtained similar results in different biological settings, indicating that VEGF pathway is a target of the Wnt signaling pathway in neoplasia<sup>13</sup>. Id2 is a Wnt-inducible gene<sup>10, 11</sup> with an important role in angiogenesis during embryonic development and angiogenesis<sup>14</sup>. The Id family consists of four members (Id1-4) that inhibit the activity of basic helix loop helix transcription factors by hindering their DNA binding. Loss of the Id1 gene in bone marrow leads to impaired tumor angiogenesis, through a failure of hematopoietic stem cells (Lin-) to differentiate towards the endothelial lineage<sup>15</sup>. Furthermore, Id knock-out mice display vascular abnormalities in the forebrain and do not support the growth of xenografted tumors, probably owing to inadequate neovascularization.<sup>16</sup> Sustained Id expression delays the onset of senescence in human endothelial cells<sup>17</sup> and stimulates tube formation and migration by endothelial cells<sup>18</sup>. Id2 induces the VEGF and SDF-1 pathways<sup>19, 20</sup>. We found that Id2 silencing abolished DKK1 activation of the VEGF and SDF-1 pathways. As VEGF and SDF-1 are two cytokines strongly involved in ECFC-induced neoangiogenesis<sup>21</sup>, it is conceivable that neovascularization would be potently induced in ischemic disease by cell or gene therapy, locally stimulating Id production.

**Supplementary Figure I. Characterization of CAC and ECFC.**

**A. CAC**



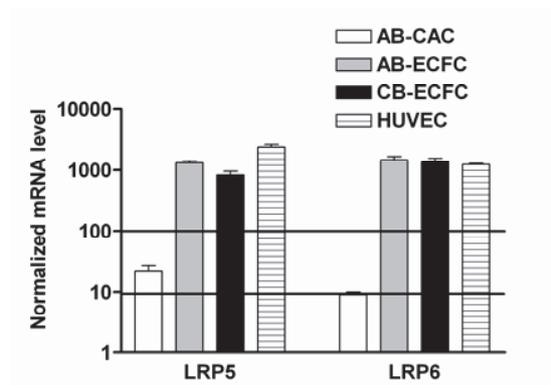
**B. ECFC**



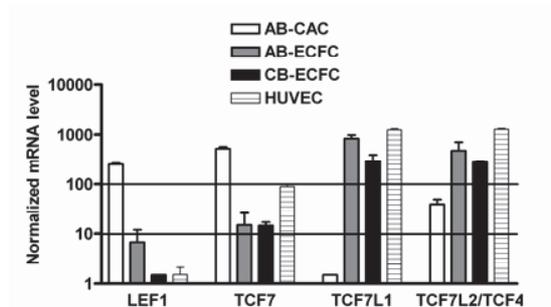
**Supplementary Figure II. Wnt canonical pathway in CAC and ECFC.**

**A/B.** Comparative LRP-5 and -6 and lymphoid enhancer factor/T-cell factor (LEF/TCF) transcription factor expression by AB-CAC and AB/CB-ECFC by RT-QPCR. mRNA levels were normalized to the *TBP* gene and to the lowest quantifiable level (i.e. 1 on the left ordinate, corresponding to a gene target  $C_t$  value of 35).

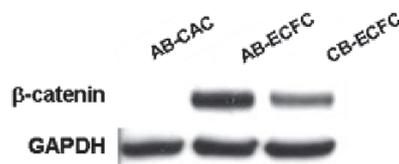
**A.**



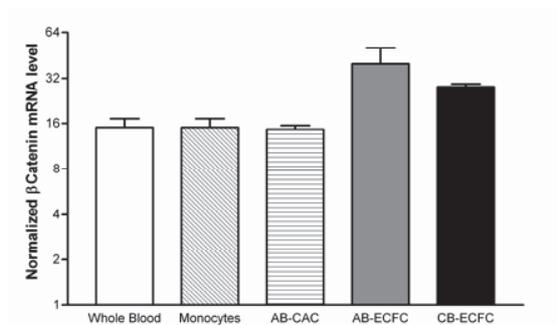
**B.**



**C.** Western blots of  $\beta$ -catenin in AB-CAC, AB-ECFC and CB-ECFC.

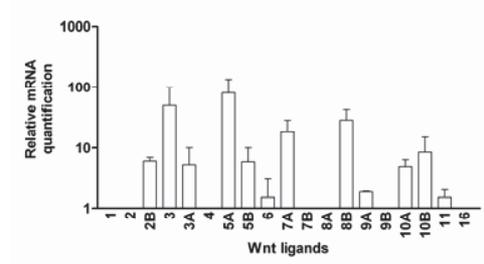


**Supplementary Figure III.  $\beta$ catenin mRNA levels in CAC and ECFC.**

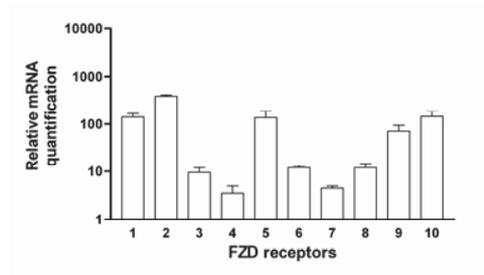


**Supplementary Figure IV. Expression of Wnt ligands and receptor in CAC**

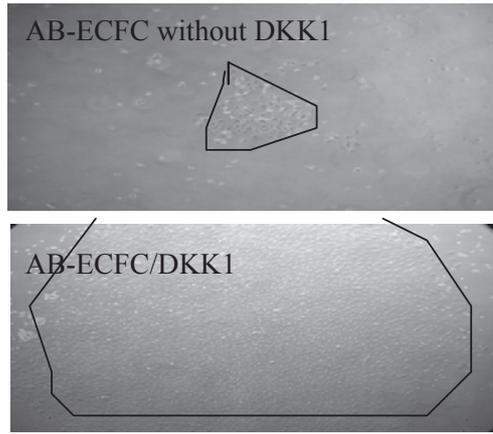
**A.**



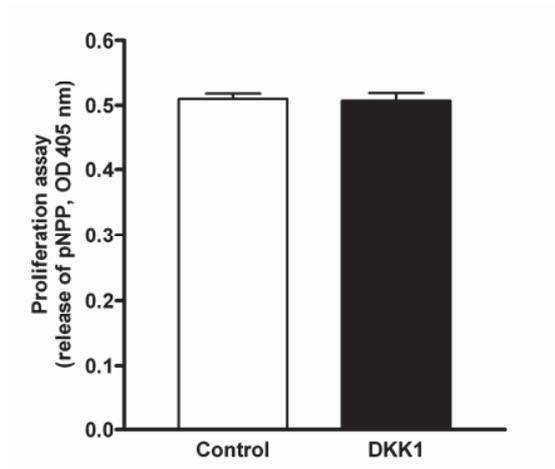
**B.**



**Supplementary Figure V. Photomicrograph of a representative colony of adult ECFC without DKK1 in culture at 14 days of culture.**

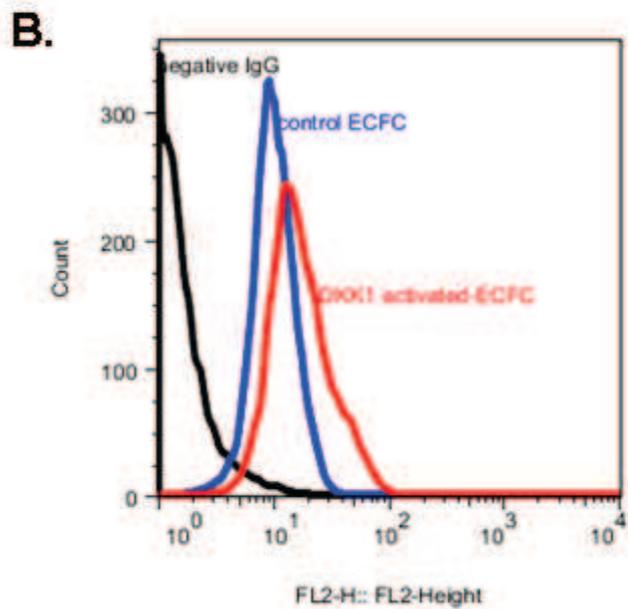
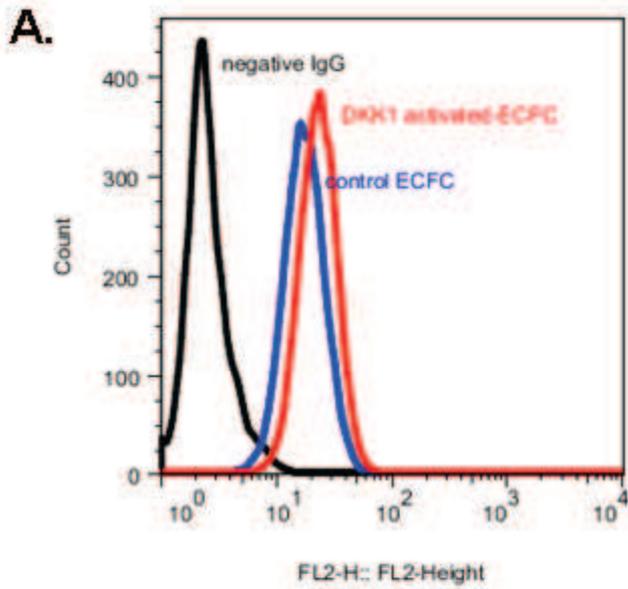


**Supplementary Figure VI. DKK1 did not modify HUVEC proliferation**



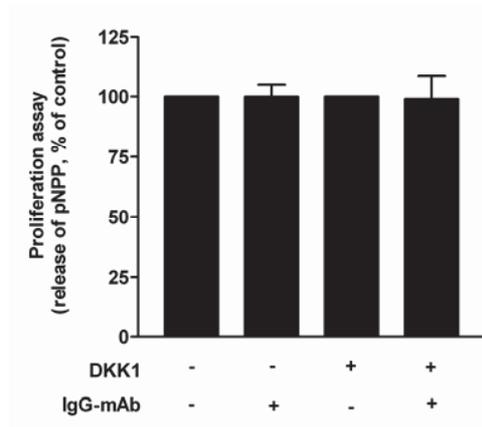
**Supplementary Figure VII. Flow cytometry analysis of CXCR4 and VEGFR2 expression**

Expression of KDR (A) and CXCR4 (B) by flow cytometry is increased after a 48 hours of DKK1 stimulation.

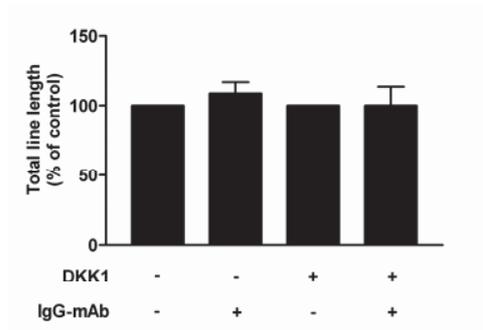


**Supplementary Figure VIII: Effect of control antibody on ECFC proliferation and pseudotubes formation with and without DKK1 stimulation.**

A- Control IgG mAb does not modify ECFC proliferation.

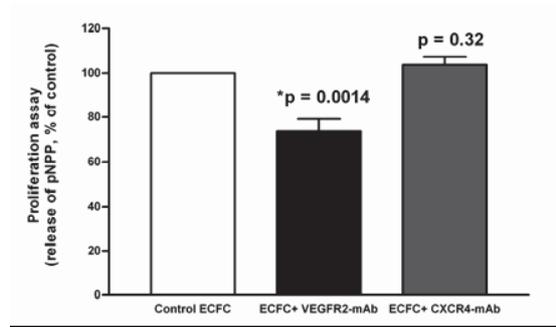


B- Control IgG mAb does not modify ECFC pseudotube formation.

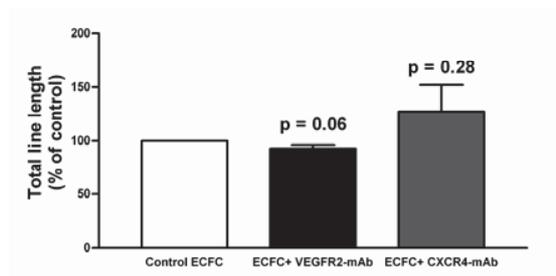


**Supplementary Figure IX: Effect of specific blocking antibodies on ECFC proliferation and pseudotubes formation with and without DKK1 stimulation.**

A- anti-VEGFR2 decrease ECFC proliferation in contrary to anti-CXCR4 in EBM, 5%SVF

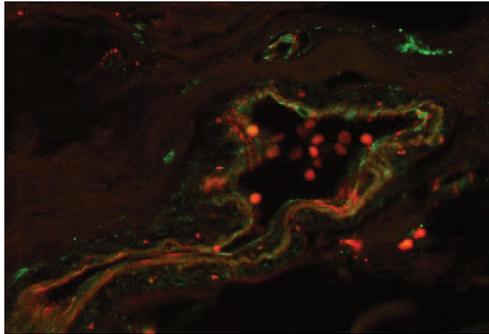


B- anti-VEGFR2 and anti-CXCR4 do not modify ECFC pseudotubes formation in contrary to in EBM, 5%SVF.

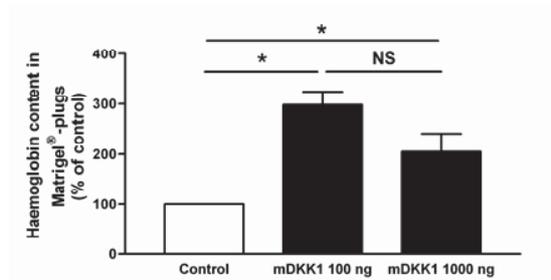


**Supplementary Figure X. DKK1 is expressed in ECFC and in blood vessels from human breast cancer.**

Positivity of tumor blood vessels was confirmed by double labeling by immunofluorescence analysis (Merge, red: CD31, green: DKK1)

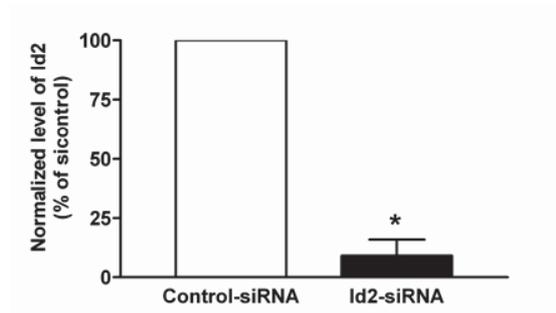


**Supplementary Figure XI. Mouse DKK1 at 100 and 1000 ng/ml increases neovascularization in vivo**

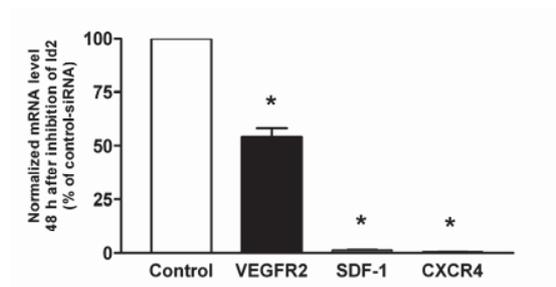


**Supplementary Figure XII. Id2 gene silencing by siRNA in ECFC abolishes DKK1 enhancement of proliferation and differentiation.**

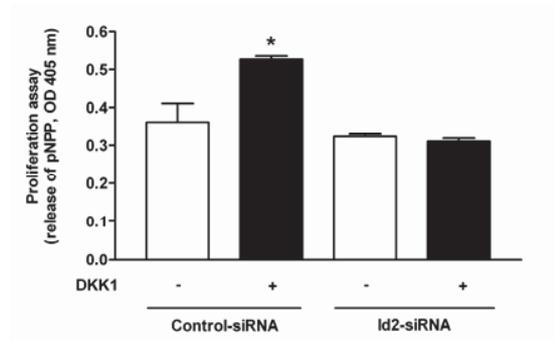
A. Analysis of Id2 expression by RT-qPCR on ECFC, 48 hours after transfection with si scramble (All Star negative control, Qiagen®) and siId2 (Santacruz Biotechnologies®) using Primefect® (LONZA). \* $P < 0.05$



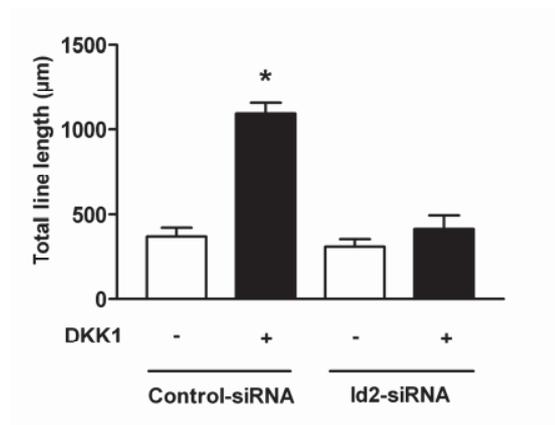
B. Inhibition of VEGFR2, SDF-1 and CXCR4 expression in siId2 transfected cells in basal conditions. The mean  $\pm$  SEM of at least three experiments are shown. \* $P < 0.05$



C. Inhibition of Id2 in ECFC abolishes DKK1 activation of proliferation measured by pNPP release.



D. Inhibition of Id2 in ECFC abolishes DKK1 activation of pseudotube formation measured with Videomet software®.



### Supplementary Table 1. Effect of DKK1 on mRNA levels of major growth

#### factors involved in ECFC-induced angiogenesis.

ECFC were stimulated with DKK1 (100 ng/mL) for 15 min, 1, 4 and 24 hours after 16 hours of serum and growth-factor privation. mRNAs were measured by real-time quantitative RT-PCR, normalized to TBP mRNA and compared to unstimulated ECFC (= 1).

	Fold increase after ECFC activation with DKK1					
	15 min	1 hour	4 hours	8 hours	12 hours	24hours
<b>VEGF-A</b>	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1 ± 0.2	0.9 ± 0.2
<b>VEGFR1</b>	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.6 ± 0.2	1.1 ± 0.03	1.1 ± 0.2	1.0 ± 0.4
<b>VEGFR2</b>	1.8 ± 1.1	1.8 ± 0.8	2.2 ± 1.8	<b>1.3 ± 0.02</b>	<b>1.5 ± 0.05</b>	<b>5.2 ± 1.9</b>
<b>ANG-2</b>	0.7 ± 0.3	2.9 ± 2.8	0.4 ± 0.2	1.1 ± 0.5	1 ± 0.2	2.2 ± 1.9
<b>TIE-2</b>	1.1 ± 0.3	0.8 ± 0.3	2.0 ± 1.3	1.2 ± 0.5	1.1 ± 0.3	1.1 ± 0.3
<b>SDF-1</b>	1.4 ± 0.3	1. ± 0.2	0.8 ± 0.2	<b>1.4 ± 0.05</b>	<b>1.3 ± 0.1</b>	<b>5.8 ± 2.2</b>
<b>CXCR4</b>	1.0 ± 0	1.5 ± 0.5	1.2 ± 0.2	<b>2.3 ± 0.1</b>	<b>1.8 ± 0.1</b>	<b>6.2 ± 3.6</b>

#### References

1. Smadja DM, Bieche 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. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:2321-2327.
2. Smadja DM, Bieche 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.* 2007;11:1149-1161.
3. Smadja DM, 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.* 2006;4:2051-2058.
4. Smadja DM, Basire A, Amelot A, Conte A, Bieche I, Le Bonniec BF, Aiach M, Gaussem P. Thrombin bound to a fibrin clot confers angiogenic and hemostatic properties on endothelial progenitor cells. *J Cell Mol Med.* 2007.
5. Smadja DM, Bieche 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.* 2008;in press.
6. Bieche I, Onody P, Laurendeau I, Olivi M, Vidaud D, Lidereau R, Vidaud M. Real-time reverse transcription-PCR assay for future management of ERBB2-based clinical applications. *Clin Chem.* 1999;45:1148-1156.
7. Smadja DM, Bieche I, Silvestre JS, Germain S, Cornet A, Laurendeau I, Duong-Van-Huyen JP, 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.* 2008;28:2137-2143.

8. Marangoni E, Vincent-Salomon A, Auger N, Degeorges A, Assayag F, de Cremoux P, de Plater L, Guyader C, De Pinieux G, Judde JG, Rebucci M, Tran-Perennou C, Sastre-Garau X, Sigal-Zafrani B, Delattre O, Dieras V, Poupon MF. A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays. *Clin Cancer Res.* 2007;13:3989-3998.
9. Bieche I, Parfait B, Laurendeau I, Girault I, Vidaud M, Lidereau R. Quantification of estrogen receptor alpha and beta expression in sporadic breast cancer. *Oncogene.* 2001;20:8109-8115.
10. Katoh M. Transcriptional regulation of WNT2B based on the balance of Hedgehog, Notch, BMP and WNT signals. *Int J Oncol.* 2009;34:1411-1415.
11. Willert J, Epping M, Pollack JR, Brown PO, Nusse R. A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells. *BMC Dev Biol.* 2002;2:8.
12. Schwartz DR, Wu R, Kardia SL, Levin AM, Huang CC, Shedden KA, Kuick R, Misek DE, Hanash SM, Taylor JM, Reed H, Hendrix N, Zhai Y, Fearon ER, Cho KR. Novel candidate targets of beta-catenin/T-cell factor signaling identified by gene expression profiling of ovarian endometrioid adenocarcinomas. *Cancer Res.* 2003;63:2913-2922.
13. Zhang X, Gaspard JP, Chung DC. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res.* 2001;61:6050-6054.
14. Benezra R, Rafii S, Lyden D. The Id proteins and angiogenesis. *Oncogene.* 2001;20:8334-8341.
15. Ciarrocchi A, Jankovic V, Shaked Y, Nolan DJ, Mittal V, Kerbel RS, Nimer SD, Benezra R. Id1 restrains p21 expression to control endothelial progenitor cell formation. *PLoS ONE.* 2007;2:e1338.
16. Lyden D, Young AZ, Zagzag D, Yan W, Gerald W, O'Reilly R, Bader BL, Hynes RO, Zhuang Y, Manova K, Benezra R. Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature.* 1999;401:670-677.
17. Tang J, Gordon GM, Nickoloff BJ, Foreman KE. The helix-loop-helix protein id-1 delays onset of replicative senescence in human endothelial cells. *Lab Invest.* 2002;82:1073-1079.
18. Zebedee Z, Hara E. Id proteins in cell cycle control and cellular senescence. *Oncogene.* 2001;20:8317-8325.
19. Lasorella A, Rothschild G, Yokota Y, Russell RG, Iavarone A. Id2 mediates tumor initiation, proliferation, and angiogenesis in Rb mutant mice. *Mol Cell Biol.* 2005;25:3563-3574.
20. Chong SW, Nguyet LM, Jiang YJ, Korzh V. The chemokine Sdf-1 and its receptor Cxcr4 are required for formation of muscle in zebrafish. *BMC Dev Biol.* 2007;7:54.
21. Smadja DM, Cornet A, Emmerich J, Aiach M, Gaussem P. Endothelial progenitor cells: Characterization, in vitro expansion, and prospects for autologous cell therapy. *Cell Biol Toxicol.* 2007;23:223-239.



# Treprostinil increases the number and angiogenic potential of endothelial progenitor cells in children with pulmonary hypertension

David M. Smadja · Laetitia Mauge · Pascale Gaussem · Clément d'Audigier · Dominique Israel-Biet · David S. Celermajer · Damien Bonnet · Marilyne Lévy

Received: 10 September 2010 / Accepted: 19 October 2010 / Published online: 4 November 2010  
© The Author(s) 2010. This article is published with open access at Springerlink.com

## Abstract

**Background** Pulmonary vasodilators in general and prostacyclin therapy in particular, have markedly improved the outcome of patients with pulmonary arterial hypertension (PAH). As endothelial dysfunction is a key feature of PAH, and as endothelial progenitor cells (EPC) may contribute to vascular repair in PAH, we suspected that prostacyclin therapy might enhance EPC numbers and functions. In the present study, objectives were to determine whether EPC may contribute to vasodilator treatment efficacy in PAH.

D. M. Smadja (✉) · L. Mauge · P. Gaussem · C. d'Audigier · D. Israel-Biet · D. Bonnet · M. Lévy  
Université Paris Descartes, Paris, France  
e-mail: david.smadja@egp.aphp.fr

D. M. Smadja · L. Mauge · P. Gaussem · C. d'Audigier  
Inserm Unité 765, Faculté de Pharmacie, and AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Haematology Department, 20 rue leblanc, 75015 Paris, France

D. Israel-Biet  
AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Pneumology Department, Paris, France

D. M. Smadja  
Vascular Biology Program, Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

D. Israel-Biet · M. Lévy  
UPRES EA4068, UFR Biomédicale des Saints Pères, Paris, France

D. S. Celermajer  
Sydney Medical School, University of Sydney, Sydney, NSW 2006, Australia

D. Bonnet · M. Lévy  
AP-HP, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France

**Methods** We quantified CD34+ cells, CFU-Hill and ECFC (endothelial colony forming cells) in peripheral blood from children with idiopathic PAH ( $n = 27$ ) or PAH secondary to congenital heart disease ( $n = 52$ ). CD34+ were enumerated by flow cytometry, CFU-Hill and ECFC by a culture assay. ECFC grown ex vivo were tested for their angiogenic capacities before and after prostacyclin analog therapy (subcutaneous treprostinil).

**Results** ECFC counts were significantly enhanced in the 8 children treated with treprostinil, while no change was observed in children receiving oral therapy with endothelin antagonists and/or PDE5 inhibitors. CD34+ cell and CFU-Hill counts were unaffected. ECFC from patients treated with treprostinil had a hyperproliferative phenotype and showed enhanced angiogenic potential in a nude mouse preclinical model of limb ischemia.

**Conclusions** ECFC may partly mediate the clinical benefits of prostanoids in pulmonary arterial hypertension.

**Keywords** Pulmonary hypertension · Congenital heart disease · Vasodilator treatment · Treprostinil · EPC

## Introduction

Pulmonary vascular disease (PVD) can cause pulmonary arterial hypertension (PAH), usually leading to right heart failure and death if left untreated [1]. Endothelial cell dysfunction is a hallmark of both idiopathic PAH and PAH secondary to congenital heart disease [2–4].

A role of endothelial progenitor cells (EPC) in vascular repair and new vessel formation has been described [5–7]. EPC mobilized from bone marrow and/or resident locally in the lung, are thought to be important in maintaining vascular homeostasis; and there is a growing interest in the

potential therapeutic or diagnostic use of EPC during PAH. Experimental and clinical studies have examined the possible contribution of EPC to the pathogenesis of PAH, but reported EPC counts in patients with pulmonary hypertension have been inconsistent [8–11]. Several types of EPC are defined, depending on the method used (flow cytometry or culture) and their characteristics. At least two populations of EPC have been described [5, 12]. “Early” EPC are spindle-shaped and express both endothelial and leukocyte markers. Quantification of this cell population, as described by Hill, utilizes a commercial kit that identifies so-called “CFU-Hill” [13]. The number of CFU-Hill in peripheral blood has been reported to correlate inversely with cardiovascular risk factors [13]. “Late” EPC, also called endothelial colony-forming cells (ECFC) [7, 14], develop after 1–3 weeks of culture and have the characteristics of precursor cells committed to the endothelial lineage. Both EPC subtypes have therapeutic potential but in vivo, cells that merge into neovessels have an ECFC phenotype [6, 7].

EPC transplantation was recently shown to improve pulmonary hypertension in a rat model [15, 16], while Wang et al. [17] found that EPC transplantation improved exercise capacity and pulmonary hemodynamics in patients with idiopathic PAH, and a contemporary open-label, non-randomized pilot trial showed that EPC transplantation led to significant improvements in exercise capacity, New York Heart Association functional class, and pulmonary hemodynamics in children with idiopathic PAH [18].

“Pulmonary vasodilator” therapy has greatly improved the prognosis of patients with PAH [19, 20]. In particular, parenteral prostacyclin improves the outcome of patients with PVD, not only by inducing pulmonary vasodilation but also by altering pulmonary vascular structure and function during long-term administration. Intravenous prostacyclin is currently recommended for patients of all ages with WHO functional class IV disease, and as add-on therapy for patients remaining in class III despite correctly dosed treatment with endothelin-receptor antagonists (ERA) and phosphodiesterase-5 inhibitors (PDE5) [19, 20]. Subcutaneous treprostinil, a parenteral prostanoid, is

sometimes preferred to an intravenous prostacyclin in children, especially to avoid the long-term risks associated with chronic intravenous therapy.

Given the possible relationship between EPC and treatment efficacy, we therefore examined the impact of treprostinil therapy on the number and functional capacity of EPC in children with advanced PAH.

## Patients and methods

### Study population (Table 1)

This prospectively designed study was aimed at determining the numbers and functional capacities of EPC before and after vasodilator treatment, and especially after treprostinil therapy. Blood samples were collected during outpatient visits from patients already on single- or dual-agent therapy. In the 8 treprostinil-treated patients, EPC were studied before treatment initiation, 2 and 5 days later and monthly thereafter.

The study was approved by the institutional ethics committee of Necker-Enfants Malades hospital, and the parents gave their signed informed consent. Fifty-two consecutive patients with CHD and PAH, and 27 consecutive patients with idiopathic PAH (Table 1) were enrolled between February 2008 and 2010. The 27 patients with idiopathic PAH had a median age of 6 years. Among the patients with CHD, 28 (median age 2 years) had reversible PAH, as defined by normal pulmonary pressure 6 months after surgery, while 24 (median age 8 years) had irreversible PAH, based on persistently elevated pulmonary artery pressure and pulmonary vascular resistance. Children with irreversible PAH were older than children with reversible and idiopathic PAH ( $P = 0.01$  and  $P = 0.06$ , respectively) and had lower oxygen saturation values ( $P = 0.02$  and  $P = 0.0008$ , respectively). Pulmonary artery pressure was similar in the three groups (Table 1). Patients with familial PAH associated with *BMPR2* mutations were not included in this study, because of a possible impact of BMP on EPC angiogenic properties [6, 21, 22].

**Table 1** Characteristics of the patients

	Reversible PAH ( <i>n</i> = 28)	Irreversible PAH ( <i>n</i> = 22)	Idiopathic PAH ( <i>n</i> = 27)	<i>P</i> value reversible versus irreversible PAH	<i>P</i> value reversible versus Idiopathic PAH	<i>P</i> value irreversible versus Idiopathic PAH
Age (y)	2 (2.7–6.5)	8 (6.1–16.4)	6 (4.5–8.4)	0.01*	0.16	0.06
Saturation (%)	96 (89.2–95.3)	86 (79.8–91.3)	97.5 (93.5–98.4)	0.02*	0.07	0.0008*
Mean PAP	55 (50–66.2)	60 (50.3–66.5)	53 (46–56.5)	0.13	0.15	0.95

Data are expressed as medians and confidence intervals (95%CI). Baseline characteristics were compared with Wilcoxon’s rank sum test for non normally distributed variables (age) and Student’s unpaired test otherwise

\*  $P < 0.05$ , reversible versus irreversible PAH

Indeed, BMPR2 mutations have been reported to affect both early [23] and late EPC, the latter showing a hyperproliferative phenotype and an impaired capacity to form vascular networks [22]. Because of adverse effects reported with IV epoprostenol and inhaled prostanoids, subcutaneous treprostinil was used as first-line add-on therapy for 8 young children who deteriorated while receiving combined oral therapy with an endothelin receptor agonist and a PDE5 inhibitor. Three of them had idiopathic PAH and five patients had PAH associated with a congenital heart defect. The decision to add subcutaneous treprostinil was based on their clinical status (change in functional class), including right ventricular dysfunction (hepatomegaly, increase in tricuspid regurgitation volume, dilation of hepatic veins and the inferior vena cava) in seven patients. Two of them also had syncope. One patient in functional class II had severe complications associated with the central venous line used to deliver epoprostenol. All the patients had right heart catheterization prior to treprostinil treatment. Treprostinil administration was initiated at hospital, through a subcutaneous catheter in the outer leg. All the patients initially received a fixed dose of 1.25 ng/kg/min. The dose was then daily increased by 1.25 ng/kg/min, reaching an average of 20 ng/kg/min at hospital discharge. During treprostinil treatment, site pain was evaluated every 6 h using standard pain scales adapted to age. After hospital discharge the treprostinil dose was adjusted at monthly out-patient visits and reached an average of 40 ng/kg/min. Technical assistance was provided at home by specialized nurses trained in the management of parenteral prostanoid therapy in PAH patients. All patients had experienced a clinical improvement performed, for oldest children by 6MWT, and they all showed an improvement in oxygen saturation and functional status, as they were all in functional class I or II. In five patients who had right heart catheterization after treprostinil, pulmonary arterial pressure did not change but cardiac output increased and pulmonary vascular resistance decreased.

#### Flow cytometric quantification of CD34+ hematopoietic progenitor cells (HPC)

Circulating CD34+ cells were counted by flow cytometry (FC500 Cytometer; Beckman Coulter, Villepinte, France) after staining of whole blood with a fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled monoclonal mouse antihuman CD45 antibody, a phycoerythrin (PE)-labeled monoclonal mouse antihuman-CD34 antibody, and 7AAD (Stemkit<sup>®</sup>; Beckman Coulter). Absolute numbers of CD34+ cells  $\mu\text{l}^{-1}$  were determined by using calibration beads, as recommended by the manufacturer.

#### EPC quantification by cell culture

Blood was diluted 1:1 with PBS, 0.2 M EDTA and overlaid on Histopaque-1077 (Sigma–Aldrich, Saint-Quentin

Fallavier, France). Cells were centrifuged at 100g for 20 min. Mononuclear cells (MNC) were collected and washed 3 times in PBS, 0.2 M EDTA. CFU-Hill were cultured with the EndoCult<sup>®</sup> Liquid Medium kit (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) according to the manufacturer's instructions. Briefly, MNC were resuspended in complete EndoCult<sup>®</sup> medium and seeded at  $5 \times 10^6$  cells/well in fibronectin-coated tissue culture plates (BD, Becton–Dickinson Biosciences). After 48 h, to obtain CFU-Hill, nonadherent cells were collected and plated in Endocult<sup>®</sup> buffer at  $10^6$  cells/well in 24-well fibronectin-coated plates. CFU-Hill colonies were counted after another 3 days, as recommended by the manufacturer. As previously described [7, 13, 24], these cells did not replicate in vitro and gradually disappeared 20 days after plating (Fig. 1b). To obtain ECFC, adherent cells at 48 h were kept in 6-well fibronectin-coated plates in EGM2 medium (Lonza, Saint-Beauzire, France) composed of endothelial cell basal medium-2 (EBM2), 5% fetal bovine serum (FBS) and growth factors. ECFC appeared between 7 and 30 days of culture and consisted of well-circumscribed cobblestone monolayers (Fig. 1d). Colonies were counted with an inverted microscope at  $\times 20$  magnification. The colonies were then harvested, trypsinized and reseeded in 6-well plates for complementary studies.

#### ECFC proliferation assay

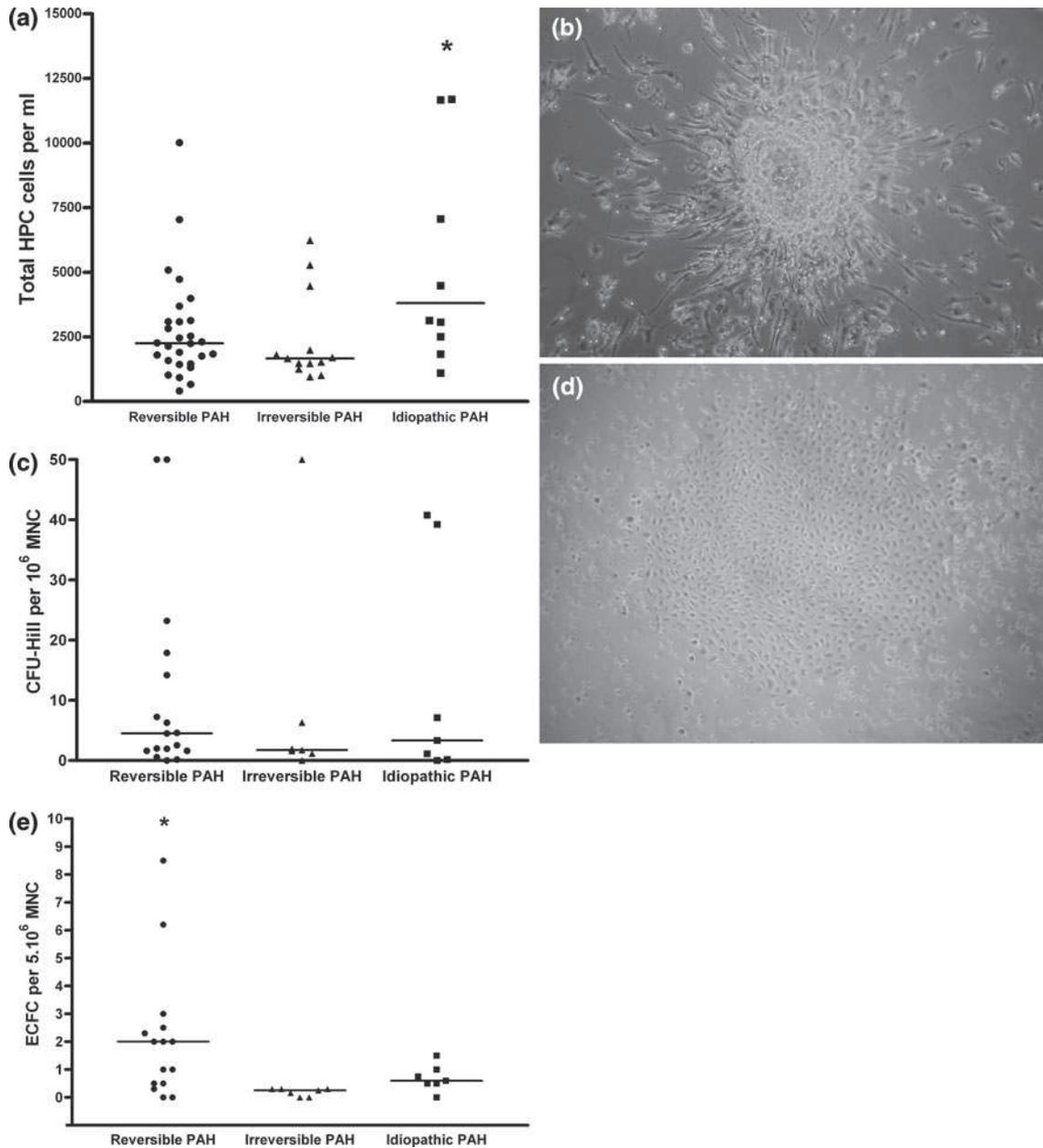
After 16 h of serum and growth-factor privation, ECFC were incubated for 48 h in EBM medium, 5% FBS. Proliferation was examined after 48 h by measuring cell phosphatase activity based on the release of paranitrophenol (pNPP) (Sigma) measured at OD 405 nm (Fluostar optima; BMG labtech, Champigny-sur-Marne, France). Control cells were ECFC from cord blood [6, 25–27].

#### In vitro matrigel tube formation assay

After 16 h of serum and growth-factor privation, ECFC ( $3 \times 10^4$  cells/well) were seeded on growth factor-reduced Matrigel (200  $\mu\text{l}$ ) (BD Biosciences) in EBM2 medium and cultured for 18 h at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. Capillary-like structures were observed by phase-contrast microscopy and networks formed by ECFC were quantified with Videomet software version 5.4.0.

#### Wound healing assay

A reproducible circular “wound” was made with a tip in confluent monolayers of ECFC cultured in 12-well plates. The surface area of the wound was measured at  $\times 20$  magnification under an inverted microscope, then the medium was removed and the cells were further incubated for 4 or 18 h with EBM, 5% FBS and VEGF 50 ng/ml. Wound repair



**Fig. 1** Basal HPC, CFU-Hill and ECFC counts in the children with PAH. **a** NUMBER of CD34+ hematopoietic progenitor cells (HPC) determined by FACS analysis. HPC is significantly higher in idiopathic PAH group. **b** Representative phase-contrast photomicrograph of CFU-Hill colony obtained with Endocult<sup>®</sup>. Note the central core of rounded cells with spindle-shaped cells sprouting through the

periphery. **c** Number of CFU-Hill counted with cell culture Endocult<sup>®</sup> assay. No difference was observed between the different patient groups. **d** Representative phase-contrast photomicrograph of an ECFC colony (mag.  $\times 20$ ). **e** Number of ECFC by cell culture. ECFC is significantly higher in the reversible PAH group

activity was calculated by expressing the area of the wound after 4 or 18 h of incubation as a percentage of the initial area.

ECFC angiogenic potential in a mouse model of hind-limb ischemia

Nude mice underwent surgery to induce unilateral hind-limb ischemia as described elsewhere [6, 28] and were

randomized to receive an intravenous injection of  $1 \times 10^5$  ECFC derived from the two treated patient groups or  $1 \times 10^5$  ECFC derived from cord blood. Two independent groups of 20 mice were realized with, in each experiment, 5 mice injected with PBS, 5 mice with cord blood ECFC, 5 mice with ECFC from patients with oral therapy and 5 mice with ECFC from patients with SC-treprostini. After 2 weeks, the ischemic/normal limb

blood flow ratio was determined with a laser Doppler perfusion imaging system.

Statistical analysis

Baseline characteristics were compared between the groups by using Wilcoxon's rank sum test for non normally distributed variables and Student's unpaired test otherwise. Student's paired t test was used to compare progenitor cells from the same subjects before and after vasodilator treatment. Independent-samples t tests were used to compare late EPC functional capacity in vitro and in mice. StatView or SAS statistical software (Cary, NC 27513, USA) was used for all statistical analyses, and 2-tailed *P* values below 0.05 were considered to denote significant differences.

Results

HPC, CFU-Hill and ECFC counts before treatment

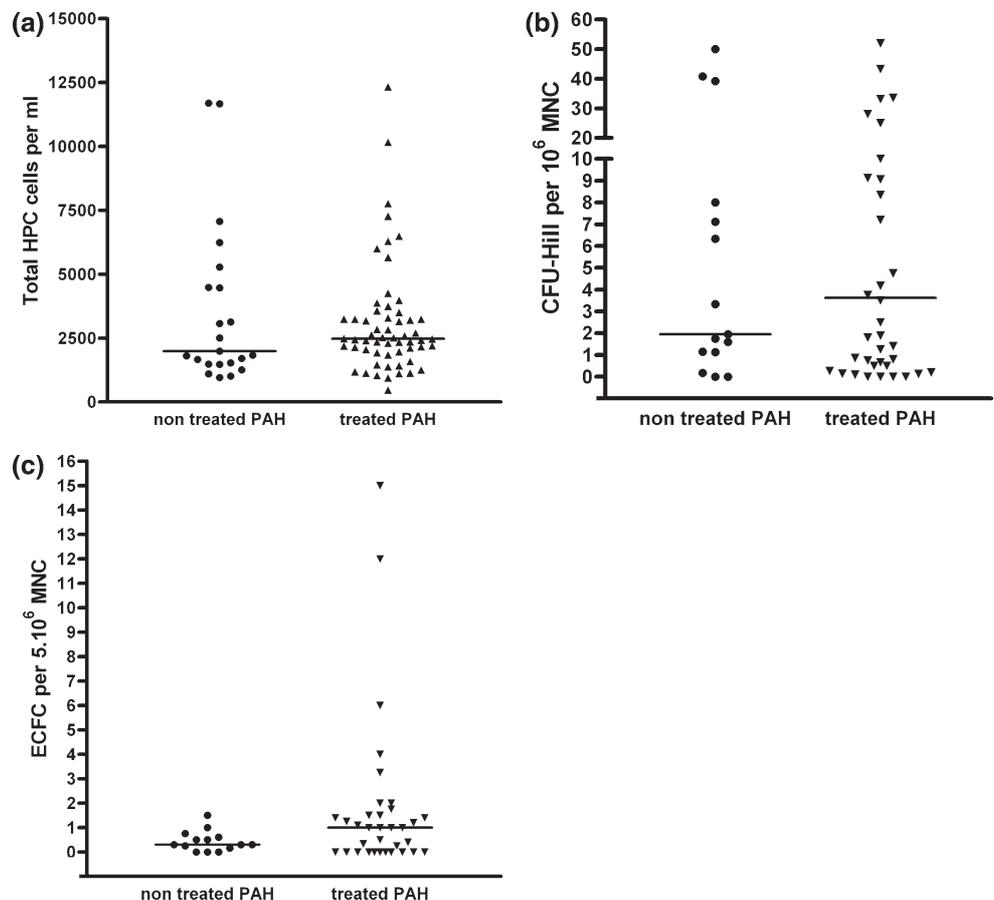
We found no difference in HPC counts between patients with reversible and irreversible PAH secondary to CHD

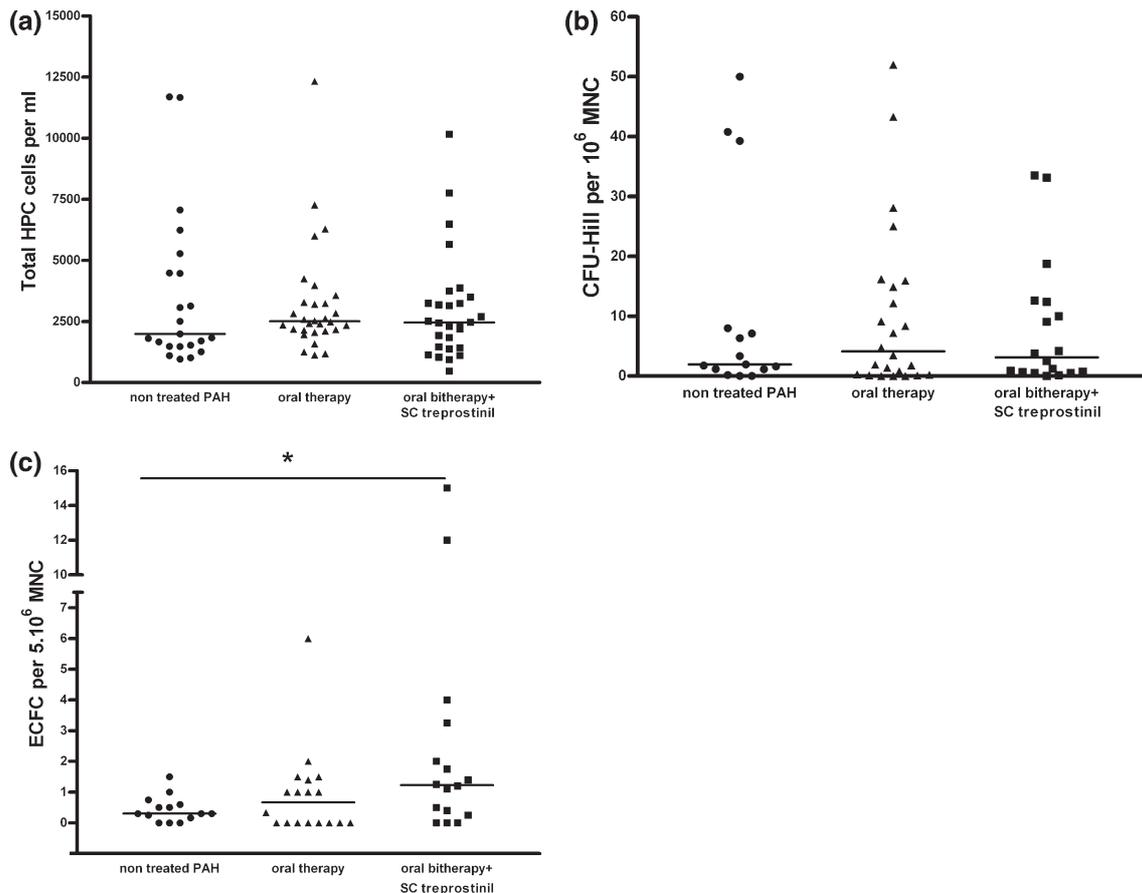
[29], while HPC counts were significantly higher in patients with idiopathic PAH (Fig. 1a) (*P* = 0.02 vs. patients with reversible PAH and 0.01 vs. patients with irreversible PAH) in agreement with the data published by Diller et al. [10]. CFU-Hill counts after 5 days of culture did not differ across the three patient groups (Fig. 1c). By contrast, ECFC counts were significantly higher in reversible PAH than in irreversible and idiopathic PAH (Fig. 1e).

ECFC numbers are increased by prostanoid treatment

No significant change in HPC, CFU-Hill and ECFC were observed when all treated patients versus non treated patients were compared (Fig. 2a, b, c respectively, with *P* = 0.80, 0.89 and 0.15). Oral treatment (monotherapy or bitherapy) did not modify HPC, CFU-Hill and ECFC counts count (respectively, *P* = 0.52, 0.64 and 0.22, Fig. 3). No change in HPC or CFU-Hill counts (*P* = 0.76 and *P* = 0.19, respectively, Fig. 3a, b) were observed after prostanoid therapy (SC treprostinil), while in contrast, this led to a significant increase in ECFC counts (*P* = 0.04, Fig. 3c).

**Fig. 2** HPC, CFU-Hill and ECFC counts in peripheral venous blood of patients with pulmonary hypertension, with and without treatment. **a** Number of CD34+ hematopoietic progenitor cells (HPC) determined by FACS analysis according to patient group. No difference is observed between the treated and non treated patients (*P* = 0.80). **b** Number of CFU-Hill colonies determined by cell culture according to patient group. No difference is observed between the treated and non treated patients (*P* = 0.89). **c** Number of ECFC determined by cell culture according to patient group. No difference is observed between the treated and non treated patients (*P* = 0.15)





**Fig. 3** HPC, CFU-Hill and ECFC counts in peripheral venous blood of patients with pulmonary hypertension according to treatment subtype. **a** No difference is observed in HPC according to treatment subtype (oral *mono and/or bitherapy* with or without subcutaneous treprostinil with respectively, a  $P = 0.52$  and  $0.76$  vs. not treated PAH). **b** No difference is observed in CFU-Hill colonies determined

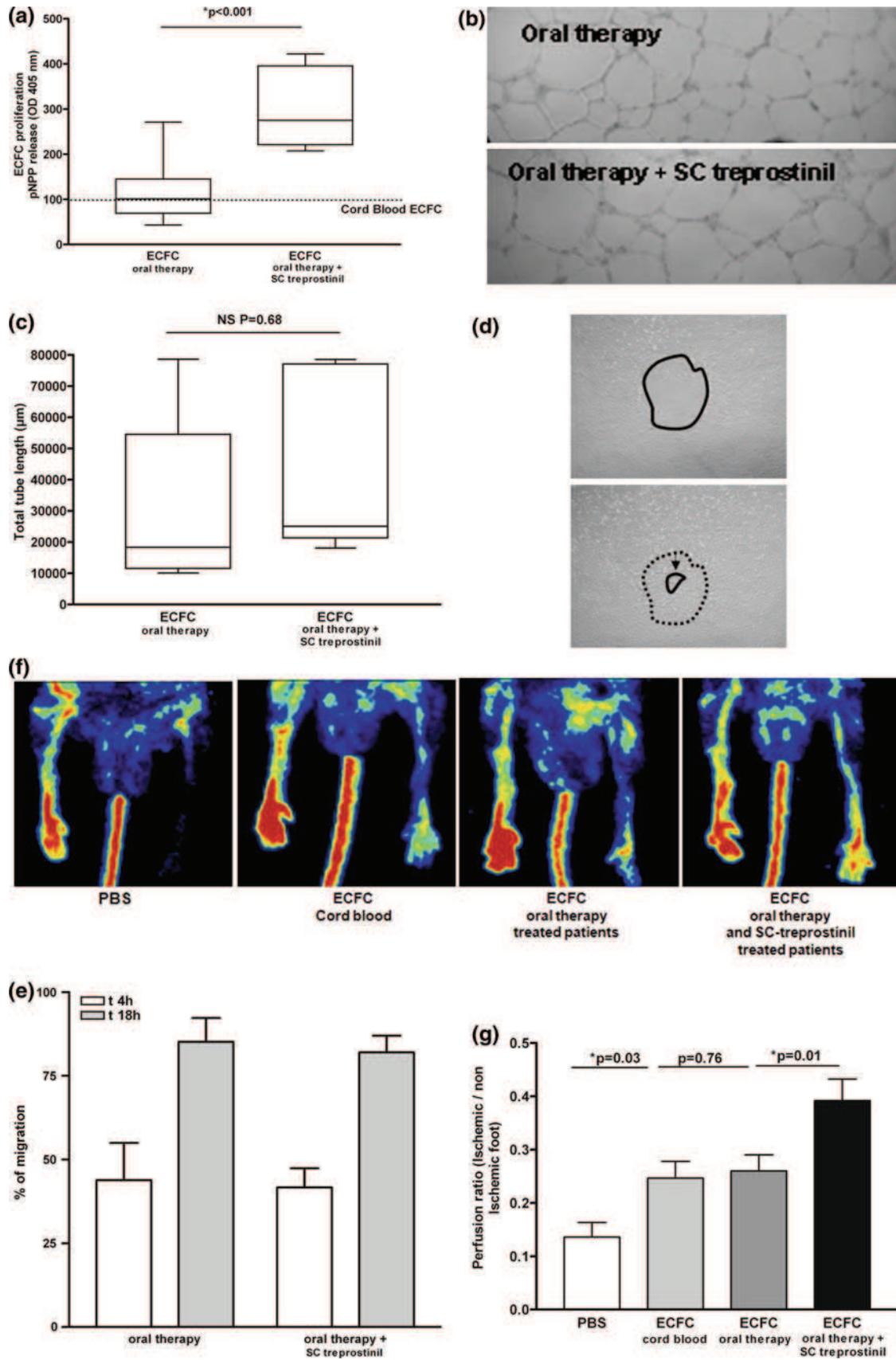
by cell culture according to treatment subtype (oral *mono and/or bitherapy* with or without subcutaneous treprostinil with respectively, a  $P = 0.64$  and  $0.19$  vs. not treated PAH). **c** No difference is observed in ECFC determined by cell culture after oral *mono and/or bitherapy* ( $P = 0.22$ ) while a significant increase in ECFC was observed with subcutaneous treprostinil treatment (\*  $P = 0.04$ )

Treprostinil enhances the proangiogenic potential of ECFC

ECFC from patients receiving oral therapy, with or without SC treprostinil, were grown to confluence from single colonies. They retained the characteristic cobblestone aspect through numerous passages and stained positive for typical endothelial markers CD34, CD146, CD144, PAR-1 thrombin receptor and von Willebrand factor (data not shown). During the first 30 days of culture, cells cultured from patients receiving oral therapy plus SC treprostinil showed enhanced proliferation in EBM, 5% FBS compared to cells from patients receiving only oral therapy (Fig. 4a). In vitro vascular network formation in Matrigel was similar with ECFC from patients treated with or without treprostinil (Fig. 4b, c), as was VEGF-induced migration in the wound healing assay (Fig. 4d, e).

In the preclinical model of hindlimb ischemia,  $1 \times 10^5$  ECFC from each treatment group were injected

**Fig. 4** Angiogenic potential of ECFC isolated from patients with pulmonary hypertension receiving vasodilator treatment. Each patient-derived ECFC were individually analyzed for proliferative and angiogenic properties in vitro and in vivo. At least 4 different patients derived-ECFC were used in each case. **a** Cells from patients receiving oral therapy and SC treprostinil showed an increased proliferative potential (in EBM, 5% FBS) compared to those from patients receiving oral therapy. Results are presented normalized to ECFC from cord blood (100%). The mean and SEM of three experiments are shown  $P < 0.05$ . **b, c** ECFC isolated from patients receiving oral therapy, with or without SC treprostinil, form intact vascular networks with similar efficiency. The mean and SEM of three experiments are shown. **d, e** VEGF-stimulated migration of ECFC in vitro in a wound healing assay was similar in patients receiving oral therapy with or without SC treprostinil. The mean and SEM of three experiments are shown. **f, g** ECFC from patients receiving oral therapy, with or without SC treprostinil, were injected intravenously into nude mice having undergone femoral artery ligation. Injection of ECFC from patients receiving oral therapy only improved foot perfusion on day 14 to the same extent as control ECFC isolated from cord blood. ECFC from patients receiving oral therapy plus SC treprostinil improved foot perfusion on day 14 by 25% more than ECFC from patients receiving oral therapy alone ( $P = 0.012$ ) and ECFC isolated from cord blood ( $P = 0.019$ )



intravenously into nude mice with femoral artery ligation. Injection of ECFC from patients on oral therapy or from cord blood improved foot perfusion to a similar extent on day 14, while ECFC from treprostinil-treated patients improved foot perfusion on day 14 compared to ECFC from patients on oral therapy without SC treprostinil ( $P = 0.012$ ) and ECFC from cord blood ( $P = 0.019$ , Fig. 4f, g).

## Discussion

Subcutaneous treprostinil markedly enhanced the number and functional capacity of ECFC isolated from children with severe PAH. As these cells are involved in angiogenesis and endothelial repair, this finding provides important insights into the mechanism of action of prostacyclin therapy in this setting.

The endothelium plays a central role in pulmonary vascular regulation, and endothelial dysfunction is increasingly viewed as critical for disease initiation and progression [3, 30]. We suspected that pharmacological treatment efficacy could be due, at least in part, to the endothelial repair capacity of ECFC. Irreversible and idiopathic PAH are associated with vascular remodeling and with smooth muscle and endothelial cell proliferation. Plexiform lesions have a similar histological aspect in idiopathic and irreversible PAH. We recently observed neoangiogenesis in lung surgical biopsy samples from patients with irreversible PAH due to CHD. This was associated to a proliferative endothelial phenotype with resistance to apoptosis [4]. These findings are consistent with a compensatory adaptive response to increased pulmonary blood flow and arterial pressure [31, 32], in which ECFC are likely to play an important role. Standard methods used to assess endothelial function in the pulmonary circulation are invasive and complex [33], but recently developed *ex vivo* evaluations of endothelial biology have the potential to provide important insights [34].

In the past 20 years, pulmonary “vasodilator” therapy has greatly improved the prognosis of patients with PAH [19, 20], it is now clear that these agents do more than simply dilate pulmonary arterioles. Indeed, such treatments have been found to enhance revascularization and/or EPC recruitment in preclinical studies [35–37] and more recently in patients with critical limb ischemia [38]. Although phosphodiesterase 5 (PDE5) inhibitors [39–41] and endothelin receptor antagonists (ERA) [42–44] improve hemodynamic parameters, they have not been shown to significantly reduce mortality of PAH patients, contrary to prostanoids.

This difference between prostanoid, PDE5 inhibitors and ERA therapy in terms of mortality could result, at least in part, from a prostanoid-induced enhancement of EPC

numbers and functional capacity, leading to improved vascular repair and/or new vessel formation. Two clinical studies recently showed that transplantation of angiogenic cells improved exercise capacity and pulmonary hemodynamics in adults and children with idiopathic pulmonary hypertension [17, 18]. In patients with critical leg ischemia, we recently showed that bone marrow mononuclear cell therapy induced the formation of new vessels containing endothelial cells with a ECFC phenotype [6]. Moreover, Yoder et al. [7] have shown that transplanted ECFC acquire a complete endothelial phenotype, maintain a high proliferative potential, and participate in endothelial healing and angiogenesis. In this study, we showed an increase of foot perfusion in the preclinical model of hindlimb ischemia of ECFC isolated from patients treated with treprostinil. Since human cells are hardly detectable in the muscle vasculature, we cannot exclude a paracrine effect of ECFC isolated from patients receiving treprostinil. Indeed, ECFC have been described to secrete several angiogenic pathways that modulate their ability to increase foot perfusion in this preclinical model [27].

The main result of our study is that prostanoid therapy (contrary to PDE5 inhibitors and ERA therapy) increased the numbers and proliferative capacity of ECFC. ECFC have been shown to possess all the characteristics of true endothelial progenitors, based on the clonal relation between EPC and hematopoietic stem cells in patients with myeloproliferative disorders. Indeed, ECFC lack disease markers expressed by early EPC (CFU-Hill or CFU-EC), supporting the concept that CFU-Hill belong to the hematopoietic lineage. This suggests that, in patients with chronic myeloproliferative disorders, ECFC have an origin distinct from that of the hematopoietic malignant clone [7, 45], and probably have true vasculogenic potential [7]. Here we explored ECFC in prostanoid-treated and -untreated patients with PAH, a well-characterized vascular disorder, and found that only ECFC were modified by prostanoid treatment, the only therapy shown to reduce mortality among adults and children with PAH [46–49]. Our results confirm importance of ECFC in PAH. Indeed, Toshner et al. [22] describe in patients with PAH and *BMPRII* mutations that ECFC had a hyperproliferative phenotype and an impaired capacity to form vascular networks, despite an absence of difference in ECFC numbers.

In the present study, CFU-Hill numbers did not differ between the three groups of patients, and did not change during treatment. Results of early-EPC or CFU-Hill counts in PAH are controversial. Asosingh et al. [8] found significantly increased numbers of early EPC in PAH patients compared with controls. In contrast, Junhui et al. [9] found reduced numbers of early EPC, with functional defects, in idiopathic PAH patients compared with controls, a finding confirmed by Diller et al. [10].

One limitation of our study is that we did not study the functional status of ECFC from healthy children. In addition, we did not attempt to confirm our findings with another prostanoid, such as IV prostacyclin, that has also been shown to improve survival in this setting.

The higher counts and enhanced angiogenic properties of ECFC in children treated with treprostinil indicate that these cells could contribute to the compensatory adaptive response to increased pulmonary blood flow and/or pressure. It is thus tempting to speculate that ECFC expanded ex vivo might be beneficial in pediatric PAH, especially given the higher counts and functional capacities of ECFC in children compared with adults. Indeed, despite the lack of data on normal ECFC values in children, we found that the ECFC yield in culture for the two older groups of children (with idiopathic and irreversible PAH) was similar to that found in adults [0.2 and 0.6 colonies per  $5 \times 10^6$  MNC, respectively, in irreversible and idiopathic PAH, vs 2.0 in reversible PAH and 0.3 in healthy adults (*D. Smadja, personal data*)]. These results are in line with those of Yoder's group, who observed a hierarchy of proliferative potential between cord blood and adult blood. This result can reasonably be extrapolated to children less than 5 years old, as was the case of our patients with reversible PAH (median age 2 years).

In conclusion, this study suggests that prostanoids enhance the number and proliferative capacities of ECFC in children with pulmonary hypertension, an effect that may contribute to endothelial repair and/or new vessel formation and, thus, to the observed clinical benefits. The potential interest of ECFC count as a surrogate marker of prostanoid treatment efficacy is currently being investigated.

**Acknowledgments** We thank Isabelle Zezepanski, Blandine Dizier, Sébastien Bertil, Florence Desvard, Yolande Daigneau, Florence Dao, Yann Burnel and Evelyne Galtier for their excellent technical assistance. This work was supported by research grants from the Leducq TransAtlantic Network of Excellence on Atherothrombosis Research (Grant 04CVD01), Leg Poix (Paris, France) and ARCFA (association pour la recherche en cardiologie du foetus à l'adulte).

**Conflict of interest** None.

**Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

## References

- Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, Elliott CG, Gaine SP, Gladwin MT, Jing ZC, Krowka MJ, Langleben D, Nakanishi N, Souza R (2009) Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 54:S43–S54
- Izikki M, Guignabert C, Fadel E, Humbert M, Tu L, Zadigue P, Darteville P, Simonneau G, Adnot S, Maitre B, Raffestin B, Eddahibi S (2009) Endothelial-derived FGF2 contributes to the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents. *J Clin Invest* 119:512–523
- Humbert M, Montani D, Perros F, Dorfmüller P, Adnot S, Eddahibi S (2008) Endothelial cell dysfunction and cross talk between endothelium and smooth muscle cells in pulmonary arterial hypertension. *Vascul Pharmacol* 49:113–118
- Levy M, Maurey C, Celermajer DS, Vouhe PR, Danel C, Bonnet D, Israel-Biet D (2007) Impaired apoptosis of pulmonary endothelial cells is associated with intimal proliferation and irreversibility of pulmonary hypertension in congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* 49:803–810
- Sieveking DP, Buckle A, Celermajer DS, Ng MK (2008) Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: insights from a novel human angiogenesis assay. *J Am Coll Cardiol* 51:660–668
- Smadja DM, Bieche I, Silvestre JS, Germain S, Cornet A, Laurendeau I, Duong-Van-Huyen JP, Emmerich J, Vidaud M, Aiach M, Gaussem P (2008) Bone morphogenetic proteins 2 and 4 are selectively expressed by late outgrowth endothelial progenitor cells and promote neoangiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:2137–2143
- Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, Krasich R, Temm CJ, Prchal JT, Ingram DA (2007) Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* 109:1801–1809
- Asosingh K, Aldred MA, Vasanthi A, Drazba J, Sharp J, Farver C, Comhair SA, Xu W, Licina L, Huang L, Anand-Apte B, Yoder MC, Tudor RM, Erzurum SC (2008) Circulating angiogenic precursors in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Pathol* 172:615–627
- Junhui Z, Xingxiang W, Guosheng F, Yunpeng S, Furong Z, Junzhu C (2008) Reduced number and activity of circulating endothelial progenitor cells in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respir Med* 102:1073–1079
- Diller GP, van Eijl S, Okonko DO, Howard LS, Ali O, Thum T, Wort SJ, Bedard E, Gibbs JS, Bauersachs J, Hobbs AJ, Wilkins MR, Gatzoulis MA, Wharton J (2008) Circulating endothelial progenitor cells in patients with Eisenmenger syndrome and idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 117:3020–3030
- Smadja DM, Mauge L, Sanchez O, Silvestre JS, Guerin C, Godier A, Henno P, Gaussem P, Israel-Biet D (2010) Distinct patterns of circulating endothelial cells in pulmonary hypertension. *Eur Respir J* (in press)
- Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, Oh BH, Lee MM, Park YB (2004) Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:288–293
- Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T (2003) Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 348:593–600
- Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, Pollok K, Ferkowicz MJ, Gilley D, Yoder MC (2004) Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 104:2752–2760
- Nagaya N, Kangawa K, Kanda M, Uematsu M, Horio T, Fukuyama N, Hino J, Harada-Shiba M, Okumura H, Tabata Y, Mochizuki N, Chiba Y, Nishioka K, Miyatake K, Asahara T, Hara H, Mori H (2003) Hybrid cell-gene therapy for pulmonary

- hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells. *Circulation* 108:889–895
16. Zhao YD, Courtman DW, Deng Y, Kugathasan L, Zhang Q, Stewart DJ (2005) Rescue of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension using bone marrow-derived endothelial-like progenitor cells: efficacy of combined cell and eNOS gene therapy in established disease. *Circ Res* 96:442–450
  17. Wang XX, Zhang FR, Shang YP, Zhu JH, Xie XD, Tao QM, Chen JZ (2007) Transplantation of autologous endothelial progenitor cells may be beneficial in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension: a pilot randomized controlled trial. *J Am Coll Cardiol* 49:1566–1571
  18. Zhu JH, Wang XX, Zhang FR, Shang YP, Tao QM, Zhu JH, Chen JZ (2008) Safety and efficacy of autologous endothelial progenitor cells transplantation in children with idiopathic pulmonary arterial hypertension: open-label pilot study. *Pediatr Transplant* 12:650–655
  19. Galie N, Hooper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery JL, Barbera JA, Beghetti M, Corris P, Gaine S, Gibbs JS, Gomez-Sanchez MA, Jondeau G, Klepetko W, Opitz C, Peacock A, Rubin L, Zellweger M, Simonneau G (2009) Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 34:1219–1263
  20. Galie N, Hooper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery JL, Barbera JA, Beghetti M, Corris P, Gaine S, Gibbs JS, Gomez-Sanchez MA, Jondeau G, Klepetko W, Opitz C, Peacock A, Rubin L, Zellweger M, Simonneau G, Vahanian A, Auricchio A, Bax J, Cecconi C, Dean V, Filippatos G, Funck-Brentano C, Hobbs R, Kearney P, McDonagh T, McGregor K, Popescu BA, Reiner Z, Sechtem U, Sirnes PA, Tendera M, Vardas P, Widimsky P, Sechtem U, Al Attar N, Andreotti F, Aschermann M, Asteggiano R, Benza R, Berger R, Bonnet D, Delcroix M, Howard L, Kitsiou AN, Lang I, Maggioni A, Nielsen-Kudsk JE, Park M, Perrone-Filardi P, Price S, Domenech MT, Vonk-Noordegraaf A, Zamorano JL (2009) Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the task force for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J* 30:2493–2537
  21. Dewachter L, Adnot S, Guignabert C, Tu L, Marcos E, Fadel E, Humbert M, Dartevielle P, Simonneau G, Naeije R, Eddahibi S (2009) Bone morphogenetic protein signalling in heritable versus idiopathic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 34:1100–1110
  22. Toshner M, Voswinckel R, Southwood M, Al-Lamki R, Howard LS, Marchesan D, Yang J, Suntharalingam J, Soon E, Exley A, Stewart S, Hecker M, Zhu Z, Gehling U, Seeger W, Pepke-Zaba J, Morrell NW (2009) Evidence of dysfunction of endothelial progenitors in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 180:780–787
  23. Teichert-Kuliszewska K, Kutryk MJ, Kuliszewski MA, Karoubi G, Courtman DW, Zucco L, Granton J, Stewart DJ (2006) Bone morphogenetic protein receptor-2 signaling promotes pulmonary arterial endothelial cell survival: implications for loss-of-function mutations in the pathogenesis of pulmonary hypertension. *Circ Res* 98:209–217
  24. Smadja DM, Bieche I, Susen S, Mauge L, Laurendeau I, d'Audigier C, Grelac F, Emmerich J, Aiach M, Gaussem P (2009) Interleukin 8 is differently expressed and modulated by PAR-1 activation in early and late endothelial progenitor cells. *J Cell Mol Med* 13:2534–2546
  25. Smadja DM, Bieche I, Helley D, Laurendeau I, Simonin G, Muller L, Aiach M, Gaussem P (2007) 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* 11:1149–1161
  26. Smadja DM, Bieche I, Uzan G, Bompais H, Muller L, Boisson-Vidal C, Vidaud M, Aiach M, Gaussem P (2005) PAR-1 activation on human late endothelial progenitor cells enhances angiogenesis in vitro with upregulation of the SDF-1/CXCR4 system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:2321–2327
  27. Smadja DM, d'Audigier C, Weiswald LB, Badoual C, Dangles-Marie V, Mauge L, Evrard S, Laurendeau I, Lallemand F, Germain S, Grelac F, Dizier B, Vidaud M, Bieche I, Gaussem P (2010) The Wnt antagonist Dickkopf-1 increases endothelial progenitor cell angiogenic potential. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (in press)
  28. Foubert P, Silvestre JS, Souttou B, Barateau V, Martin C, Ebrahimiyan TG, Lere-Dean C, Contreres JO, Sulpice E, Levy BI, Plouet J, Tobelem G, Le Ricousse-Roussanne S (2007) PSGL-1-mediated activation of EphB4 increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells. *J Clin Invest* 117:1527–1537
  29. Smadja DM, Gaussem P, Mauge L, Israel-Biet D, Dignat-George F, Peyrard S, Agnoletti G, Vouhe PR, Bonnet D, Levy M (2009) Circulating endothelial cells: a new candidate biomarker of irreversible pulmonary hypertension secondary to congenital heart disease. *Circulation* 119:374–381
  30. Hassoun PM, Mouthon L, Barbera JA, Eddahibi S, Flores SC, Grimminger F, Jones PL, Maitland ML, Michelakis ED, Morrell NW, Newman JH, Rabinovitch M, Schermuly R, Stenmark KR, Voelkel NF, Yuan JX, Humbert M (2009) Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *J Am Coll Cardiol* 54:S10–S19
  31. Lam CF, Peterson TE, Croatt AJ, Nath KA, Katusic ZS (2005) Functional adaptation and remodeling of pulmonary artery in flow-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H2334–H2341
  32. Black SM, Fineman JR, Steinhorn RH, Bristow J, Soifer SJ (1998) Increased endothelial NOS in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 275:H1643–H1651
  33. Celermajer DS, Cullen S, Deanfield JE (1993) Impairment of endothelium-dependent pulmonary artery relaxation in children with congenital heart disease and abnormal pulmonary hemodynamics. *Circulation* 87:440–446
  34. Fadini GP, Avogaro A, Ferraccioli G, Agostini C (2010) Endothelial progenitors in pulmonary hypertension: new pathophysiology and therapeutic implications. *Eur Respir J* 35:418–425
  35. Dussault S, Maingrette F, Menard C, Michaud SE, Haddad P, Groleau J, Turgeon J, Perez G, Rivard A (2009) Sildenafil increases endothelial progenitor cell function and improves ischemia-induced neovascularization in hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice. *Hypertension* 54:1043–1049
  36. Iglarz M, Silvestre JS, Duriez M, Henrion D, Levy BI (2001) Chronic blockade of endothelin receptors improves ischemia-induced angiogenesis in rat hindlimbs through activation of vascular endothelial growth factor-no pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1598–1603
  37. Sun CK, Lee FY, Sheu JJ, Yuen CM, Chua S, Chung SY, Chai HT, Chen YT, Kao YH, Chang LT, Yip HK (2009) Early combined treatment with cilostazol and bone marrow-derived endothelial progenitor cells markedly attenuates pulmonary arterial hypertension in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 330:718–726
  38. Di Stefano R, Barsotti MC, Melillo E, Iorio M, Santoni T, Armani C, Dell'omodarme M, Ristori C, De Caterina R, Balbarini A (2008) The prostacyclin analogue iloprost increases circulating endothelial progenitor cells in patients with critical limb ischemia. *Thromb Haemost* 100:871–877
  39. Galie N, Ghofrani HA, Torbicki A, Barst RJ, Rubin LJ, Badesch D, Fleming T, Parpia T, Burgess G, Branzi A, Grimminger F, Kurzyna M, Simonneau G (2005) Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 353:2148–2157

40. Galie N, Brundage BH, Ghofrani HA, Oudiz RJ, Simonneau G, Safdar Z, Shapiro S, White RJ, Chan M, Beardsworth A, Frumkin L, Barst RJ (2009) Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 119:2894–2903
41. Simonneau G, Rubin LJ, Galie N, Barst RJ, Fleming TR, Frost AE, Engel PJ, Kramer MR, Burgess G, Collings L, Cossons N, Sitbon O, Badesch DB (2008) Addition of sildenafil to long-term intravenous epoprostenol therapy in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized trial. *Ann Intern Med* 149:521–530
42. Galie N, Olschewski H, Oudiz RJ, Torres F, Frost A, Ghofrani HA, Badesch DB, McGoon MD, McLaughlin VV, Roecker EB, Gerber MJ, Dufton C, Wiens BL, Rubin LJ (2008) Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension: results of the ambrisentan in pulmonary arterial hypertension, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, efficacy (ARIES) study 1 and 2. *Circulation* 117:3010–3019
43. Channick RN, Simonneau G, Sitbon O, Robbins IM, Frost A, Tapson VF, Badesch DB, Roux S, Rainisio M, Bodin F, Rubin LJ (2001) Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet* 358:1119–1123
44. Humbert M, Barst RJ, Robbins IM, Channick RN, Galie N, Bonstra A, Rubin LJ, Horn EM, Manes A, Simonneau G (2004) Combination of bosentan with epoprostenol in pulmonary arterial hypertension: BREATHE-2. *Eur Respir J* 24:353–359
45. Piaggio G, Rosti V, Corselli M, Bertolotti F, Bergamaschi G, Pozzi S, Imperiale D, Chiavarina B, Bonetti E, Novara F, Sessarego M, Villani L, Garuti A, Massa M, Ghio R, Campanelli R, Bacigalupo A, Pecci A, Viarengo G, Zuffardi O, Frassoni F, Barosi G (2009) Endothelial colony forming cells (ECFCs) from patients with chronic myeloproliferative disorders lack the disease-specific molecular clonality marker. *Blood* 114:3127–3130
46. Barst RJ, Rubin LJ, Long WA, McGoon MD, Rich S, Badesch DB, Groves BM, Tapson VF, Bourge RC, Brundage BH et al (1996) A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. The primary pulmonary hypertension study group. *N Engl J Med* 334:296–302
47. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Vizza CD, Kneussl M, Manes A, Sitbon O, Torbicki A, Delcroix M, Naeije R, Hoepfer M, Chaouat A, Morand S, Besse B, Simonneau G (2002) Effects of beraprost sodium, an oral prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Am Coll Cardiol* 39:1496–1502
48. Simonneau G, Barst RJ, Galie N, Naeije R, Rich S, Bourge RC, Keogh A, Oudiz R, Frost A, Blackburn SD, Crow JW, Rubin LJ (2002) Continuous subcutaneous infusion of treprostinil, a prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 165:800–804
49. Olschewski H, Simonneau G, Galie N, Higenbottam T, Naeije R, Rubin LJ, Nikkho S, Speich R, Hoepfer MM, Behr J, Winkler J, Sitbon O, Popov W, Ghofrani HA, Manes A, Kiely DG, Ewert R, Meyer A, Corris PA, Delcroix M, Gomez-Sanchez M, Siedentop H, Seeger W (2002) Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 347:322–329



## LETTER TO THE EDITOR

# Angiogenic potential of BM MSCs derived from patients with critical leg ischemia

*Bone Marrow Transplantation* advance online publication, 10 October 2011; doi:10.1038/bmt.2011.196

Critical leg ischemia (CLI) is the most severe form of peripheral arterial disease and is characterized by the inability of arterial blood flow to meet the metabolic demands of resting muscle or tissue, resulting in rest pain and/or tissue necrosis, and frequently necessitating amputation. As a result of the discovery of the angiogenic potential of BM mononuclear cells (BM-MNCs), cell therapy has been proposed to treat peripheral arterial disease. The therapeutic angiogenesis by cell transplantation (TACT) study was the first trial to demonstrate a significant improvement after i.m. injection of total autologous BM-MNCs.<sup>1</sup> In the French OPTIPEC trial (Clinical trial registration: NCT00377897), we have shown the development of a proliferative angiogenic process in the distal part of the legs in amputation specimens from patients with CLI who had received local therapeutic injections of BM-MNCs.<sup>2</sup> Strong data from preclinical models strongly suggest that BM-MNCs do not differentiate into endothelial cells, and that their paracrine effect is most likely responsible for the angiogenic process.<sup>3</sup> However, BM-MNCs isolated from patients with cardiovascular disease have a significantly reduced neovascularization capacity *in vivo*, despite similar content of hematopoietic stem cells.<sup>4</sup> Notably, BM-MNCs contain a complex assortment of angiogenic cells, including hematopoietic progenitors as well as MSCs.

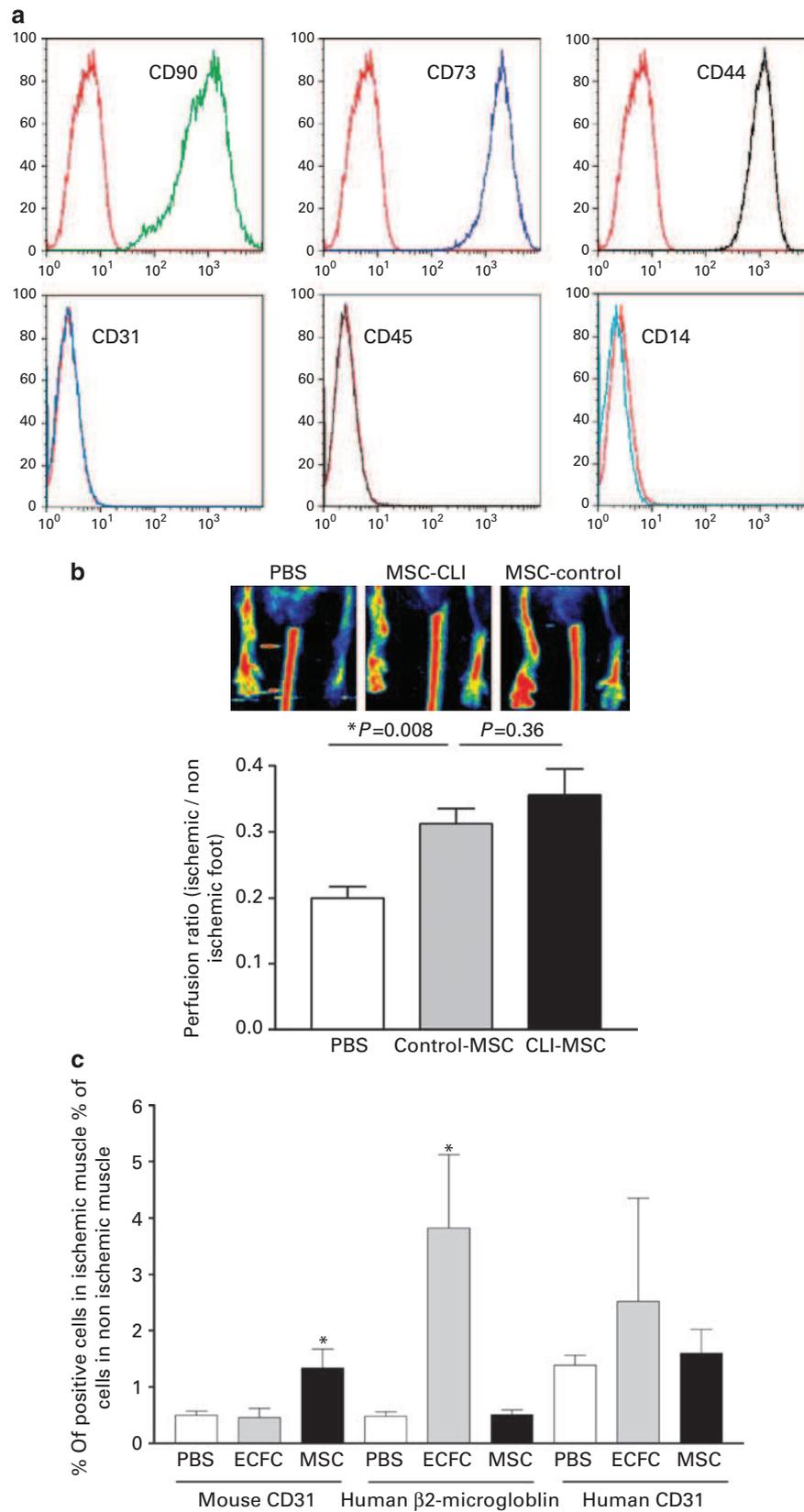
An important issue is to define, among BM-MNCs, what is the sub-population of pro-angiogenic cells that could be further isolated and expanded to develop an autologous and efficient cell therapy product. Among these cell types, MSCs, which are easily obtained in culture from BM, are potential candidates. MSCs are multipotent stem cells with the ability to differentiate into mesoderm-derived cells that exhibit immunoregulatory properties, improve hematopoietic engraftment, prevent graft failure, and reduce the incidence or severity of acute GVHD. Given their capacity to secrete angiogenic growth factors, MSCs have been proposed to improve angiogenesis, but their endothelial differentiation potential is a matter of debate. Furthermore, no data exist on the angiogenic potential of MSCs isolated from patients with peripheral arterial disease.

We studied 11 CLI patients enrolled in the OPTIPEC clinical trial, which is a multicenter phase I non-randomized study (median age: 65 years). As described elsewhere,<sup>2</sup> the cell therapy protocol was similar to those

initially published by Tateishi-Yuyama *et al.*<sup>1</sup> For this biological study, we used 3 mL of the concentrated BM-MNCs that are used as the cell therapy product. We successfully isolated MSCs from BM-MNCs in all the 11 patients enrolled. These cells displayed a typical MSC phenotype (positive for CD90, CD73 and CD44, negative for CD14, 45 and 31, Figure 1a). We tested their ability to increase blood flow recovery in a nude mouse model of hindlimb ischemia.<sup>5</sup> MSCs from CLI patients showed an effect comparable to that of MSCs isolated from four control patients of the same age, diagnosed for a peripheral thrombocytopenia with no peripheral arterial disease or cardiovascular disease (Figure 1b). These data demonstrate that MSCs, isolated from the BM-MNCs in patients with CLI, have a strong ability to promote neovascularization in nude mice after induction of hindlimb ischemia ( $P < 0.05$  for control MSCs and MSCs from CLI patients vs PBS patients;  $P = 0.36$  between control MSCs and MSCs from CLI patients; Mann and Whitney test).

To decipher the mechanism of the angiogenic effect of MSCs, we tested the ability of MSCs to promote neovascularization in our model versus endothelial progenitor cells (endothelial colony forming cells: ECFCs) isolated from cord blood. Indeed, ECFCs have been proposed as the active cell type in vasculogenic processes.<sup>6</sup> To identify the species origin of cells in the neo-vessels 14 days after surgery, ischemic and non-ischemic muscles from mice that received MSCs, ECFCs or PBS were harvested, and human as well as murine cells were enumerated. We found that MSC administration promoted the infiltration of murine CD31-positive cells, in contrast to ECFCs that increased human  $\beta$ 2-microglobulin and CD31-positive cells (Figure 1c). These results are in agreement with the concept of a paracrine angiogenic effect of MSCs on local murine endothelial cells, whereas ECFCs are able to build vessels by themselves.

A future challenge will be to develop an autologous cell therapy product dedicated to treat CLI. To date, no homogeneous cell preparation has been proposed and the angiogenic potential of MSCs isolated from patients with peripheral arterial disease has never been tested. We have hereby shown the unaltered angiogenic capacity of MSCs from CLI patients compared with control adults. This result contrasts with the decreased angiogenic potential of MNCs observed in patients with cardiovascular disease.<sup>4</sup> The angiogenic potential of MSCs seems to be preserved, despite cumulative cardiovascular risk factors in CLI that make this cell population really attractive for the development of an autologous cell therapy product. Interestingly, rat MSCs have been shown to have better angiogenic



potential than MNCs.<sup>7</sup> This result combined with the efficacy of MSCs from CLI patients is in favor of their use as a cell therapy product instead of MNCs. The present

study was designed as a pilot and feasibility trial. The functional characteristics of MSCs need to be confirmed in large and randomized trials, which are currently ongoing.

**Figure 1** MSCs induce blood flow recovery in hindlimb ischemia model. (a) MSC characterization. We isolated MSCs from BM-MNCs collected from ficoll gradient. MNCs were seeded in 0.2% gelatin-coated six-well plates containing 2 mL fetal bovine serum (FBS) medium composed of endothelial basal medium-2 (Cambrex Bio Science, Walkersville, MD, USA) plus 1% penicillin/streptomycin (pen-strep), 10% FBS and basic fibroblast growth factor (1 ng/mL; R&D Systems, Lille, France). After 48 h, non-adherent cells were removed and medium was changed. Cultures were fed every 2 or 3 days until confluence. Subsequently, the medium was changed twice a week. When the adherent cells in the flasks were confluent, cells were harvested by incubation with trypsin. Expansion after the first passage was realized in complete endothelial cell growth medium-2. During culture, morphological changes were followed visually by phase-contrast microscopy. MSCs isolated from patients with CLI have a classic phenotype of MSCs with an expression of CD90, CD73 and CD44, whereas no expression of haematopoietic or endothelial lineage marker is found (CD14, CD45 or CD31). (b) MSCs increased blood flow recovery in the same manner as that of control MSCs. Seven-week old male nu/nu mice (Harlan, Gannat, France and Janvier, Le-Genest-Saint-Isle, France) were housed in a controlled environment with free access to water and standard diet, and underwent surgery to induce unilateral hindlimb ischemia. Animals were anesthetized by inhalation of isoflurane. The ligation was performed on the right femoral artery, 0.5 cm proximal to the bifurcation of the saphenous and popliteal arteries. Mice (18 animals per group) received cell injection 5 h after occlusion.  $1 \times 10^5$  cells were randomly administered by i.v. injection in the eye for Doppler analysis. Functional analyses were performed 14 days after the onset of ischemia. (c) Increased mouse CD31-expression in muscles after MSC injection, in contrast to ECFC injection. Ischemic and non-ischemic gastrocnemius muscles were weighed, minced and digested in 450 U/mL Collagenase I, 125 U/mL Collagenase XI, 60 U/mL DNase I and 60 U/mL hyaluronidase (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) for 1 h at 37 °C. Cells were counted and stained using anti-mouse CD31 PE (Becton Dickinson, Le Pont-de-Claix, France), anti-human CD31 PE-Dy 590 (Exbio, Vestec, Czech Republic) and anti-human  $\beta$ 2-microglobulin FITC (Biolegend, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) or the corresponding isotypes, and analyzed on a LSRFortessa Flow Cytometer (Becton Dickinson) with the FACS Diva software (Becton Dickinson). Analysis was performed with FlowJo software (Treestar, Ashland, OR, USA). At 14 days after MSC injection, an increased percentage of mouse CD31-positive cells were found in ischemic muscle, whereas ECFC injection resulted in an increase of total human cells (quantified with  $\beta$ 2-microglobulin) and human CD31-positive cells.

In case of failure to isolate/cultivate MSCs from a given CLI patient, the use of MSC banks would be a therapeutic option, given the lack of HLA class II Ag on MSCs.

To our knowledge, our study is the first one to test MSCs from CLI patients in a preclinical model. Autologous human MSCs, previously tested in a heart model of revascularization and clinically approved for other indications, have been administered in four patients with Buerger disease, a non atherosclerotic ischemic disease. Efficacy has been tested in hindlimb ischemia model and cells seemed to be efficient in patient healing and in the hind limb preclinical model of ischemia.<sup>8</sup> One patient with systemic sclerosis has received autologous MSCs.<sup>9</sup> Causality cannot be established by a single case, but i.v. infusion of expanded autologous MSCs may foster the recovery of the vascular network, restore blood flow and reduce skin necrosis. Recently, MSCs isolated from iPS cell lines have been used and showed to attenuate limb ischemia in mice.<sup>10</sup>

In conclusion, the MSCs isolated from the BM of CLI patients are able to induce blood flow recovery *in vivo* to the same degree as controls, in contrast to the reduced ability that has been described for BM-MNCs and endothelial progenitor cells from patients with cardiovascular disorders. The prior existence of clinical trials and safety procedures applicable for this cell type would facilitate the rapid testing of MSCs as an autologous cell therapy product.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### Acknowledgements

C d'Audigier was supported by the Fondation pour la recherche medicale (FRM). We thank Kayle Shapiro for helpful comments and proofreading of our manuscript. This work was supported by research grants from AP-HP PHRC Optipec (03-034), Fondation pour la recherche medicale (FRM) and Fondation de France.

*Author contributions:* DMS designed the study, performed the research and wrote the letter. Cd'A, CLG, LM and BD performed the research. JSS designed research protocols. LDC prepared BM-MNCs. PG and JE designed the OPTIPEC study, harvested BM from CLI patients and wrote the letter.

DM Smadja<sup>1,2,3,4</sup>, C d'Audigier<sup>1,2,3</sup>, CL Guerin<sup>1,2,5</sup>,  
L Mauge<sup>1,2,3,6</sup>, B Dizier<sup>2</sup>, J-S Silvestre<sup>1,5</sup>,  
L Dal Cortivo<sup>6</sup>, P Gaussem<sup>1,2,3</sup> and J Emmerich<sup>1,2,7</sup>

<sup>1</sup>Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité,  
Paris, France;

<sup>2</sup>INSERM UMRS 765, Faculté de Pharmacie,  
Paris, France;

<sup>3</sup>AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou,  
Service d'Hématologie Biologique, Paris, France;

<sup>4</sup>Vascular Biology Program and Surgery department,  
Children's Hospital, Harvard Medical School,  
Boston, MA, USA;

<sup>5</sup>INSERM UMRS 970, Paris Cardiovascular  
Research Center—PARCC, Paris, France;

<sup>6</sup>AP-HP, Hôpital Necker, Service de Biothérapies,  
Paris, France and

<sup>7</sup>AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de  
Médecine Vasculaire, Paris, France

E-mail: david.smadja@egp.aphp.fr or  
david.smadja@childrens.harvard.edu

### References

- 1 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**: 427–435.
- 2 Duong-Van-Huyen JP, Smadja DM, Bruneval P, Gaussem P, Dal-Cortivo L, Julia P *et al*. Bone marrow-derived mononuclear cell therapy induces distal angiogenesis after local injection in critical leg ischemia. *Mod Pathol* 2008; **21**: 837–846.
- 3 Dudley AC, Udagawa T, Melero-Martin JM, Shih SC, Curatolo A, Moses MA *et al*. Bone marrow is a reservoir for proangiogenic myelomonocytic cells but not endothelial cells in spontaneous tumors. *Blood* 2010; **116**: 3367–3371.

- 4 Heeschen C, Lehmann R, Honold J, Assmus B, Aicher A, Walter DH *et al.* Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation* 2004; **109**: 1615–1622.
- 5 Couffinhal T, Silver M, Zheng LP, Kearney M, Witzensichler B, Isner JM. Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol* 1998; **152**: 1667–1679.
- 6 Smadja DM, Bieche I, Silvestre JS, Germain S, Cornet A, Laurendeau I *et al.* Bone morphogenetic proteins 2 and 4 are selectively expressed by late outgrowth endothelial progenitor cells and promote neoangiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; **28**: 2137–2143.
- 7 Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Murakami S, Matsumoto T *et al.* Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. *Cardiovasc Res* 2005; **66**: 543–551.
- 8 Kim SW, Han H, Chae GT, Lee SH, Bo S, Yoon JH *et al.* 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.
- 9 Guiducci S, Porta F, Saccardi R, Guidi S, Ibbá-Manneschi L, Manetti M *et al.* Autologous mesenchymal stem cells foster revascularization of ischemic limbs in systemic sclerosis: a case report. *Ann Intern Med* 2010; **153**: 650–654.
- 10 Lian Q, Zhang Y, Zhang J, Zhang HK, Wu X, Lam FF *et al.* Functional mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells attenuate limb ischemia in mice. *Circulation* 2010; **121**: 1113–1123.

# Imbalance of circulating endothelial cells and progenitors in idiopathic pulmonary fibrosis

David M. Smadja · Laetitia Mauge · Hilario Nunes · Clément d'Audigier ·  
Karine Juvin · Raphael Borie · Zohra Carton · Sébastien Bertil · Anne Blanchard ·  
Bruno Crestani · Dominique Valeyre · Pascale Gaussem · Dominique Israel-Biet

Received: 21 February 2012 / Accepted: 28 August 2012 / Published online: 16 September 2012  
© Springer Science+Business Media B.V. 2012

## Abstract

**Background** Fibrogenesis during idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is strongly associated with abnormal vascular remodeling. Respective abundance of circulating endothelial cells (CEC) and endothelial progenitor cells (EPC) might reflect the balance between vascular injury and repair and potentially serve as biomarkers of the disease. **Objectives and Methods** We postulated that CEC and EPC subtypes might be differently modulated in IPF. Sixty-four consecutive patients with newly diagnosed IPF were prospectively enrolled and compared to thirteen healthy volunteers. CEC were counted with immunomagnetic CD146-coated beads; progenitors CD34<sup>+</sup>45<sup>dim</sup>/CD34<sup>+</sup>133<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> were assessed through flow cytometry and EPC (colony-forming-units-Endothelial Cells, CFU-EC, and endothelial colonies

forming cells, ECFC) were quantified by cell culture assays.

**Results** IPF patients were characterized by a marked increase in CEC associated to an EPC defect: both CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> cells and CFU-EC were decreased versus controls. Moreover, in IPF subjects with a low diffusing capacity of the lung for carbon monoxide (DL<sub>CO</sub>) < 40 %, CFU-EC and ECFC were higher compared to those with DL<sub>CO</sub> > 40 %. Finally, ECFC were negatively correlated with DL<sub>CO</sub>. During an 18 month follow up, CEC levels increased in patients with exacerbation, including those who died during follow up. Finally, ECFC from patients with exacerbation proliferative potential was strongly increased. **Conclusion** IPF is basically associated with both a vascular injury and a repair defect. This study highlights an

D. M. Smadja (✉)  
Hematology Department, European Georges Pompidou Hospital,  
Université Paris Descartes, 20 rue Leblanc, 75015 Paris, France  
e-mail: david.smadja@egp.aphp.fr

D. M. Smadja · L. Mauge · C. d'Audigier · P. Gaussem ·  
D. Israel-Biet  
Inserm UMRS 765, Faculté de Pharmacie, Paris, France

D. M. Smadja · L. Mauge · C. d'Audigier · S. Bertil ·  
P. Gaussem  
AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou,  
Service d'Hématologie Biologique, Paris, France

D. M. Smadja  
Vascular Biology Program and Surgery Department,  
Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

L. Mauge · C. d'Audigier · P. Gaussem  
Hematology Department, European Georges Pompidou Hospital,  
Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 20 rue Leblanc,  
75015 Paris, France

H. Nunes · Z. Carton · D. Valeyre  
AP-HP, Hôpital Avicenne, Service de Pneumologie, Bobigny,  
France

K. Juvin · D. Israel-Biet  
Pneumology Department, European Georges Pompidou  
Hospital, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité,  
20 rue Leblanc, 75015 Paris, France

R. Borie · B. Crestani  
AP-HP, Hôpital Bichat, Service de Pneumologie, Paris, France

A. Blanchard  
AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou,  
Centre d'investigation clinique Inserm Centre, 9201 Paris,  
France

adaptative process of EPC mobilization in the most severe forms of IPF, that could reflect enhanced homing to the pulmonary vasculature, which clinical consequences remain to be determined.

**Keywords** Angiogenesis · Biomarkers · Endothelial progenitor cells · Circulating endothelial cells · Idiopathic pulmonary fibrosis

## Introduction

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a devastating lung disease characterized by progressive obliteration of normal alveolar architecture and replacement by fibrotic tissue. The result is declining lung function, progressive dyspnea and ultimately death within 3–5 years of diagnosis. Besides Pirfenidone in selected patients [1] there is presently no efficient drug for this disease. Patients should be referred to a lung transplant evaluation early in the course of their disease. It is also highly recommended to enroll patients with IPF in therapeutic clinical trials [1, 2]. Precise pathogenic mechanisms are still largely debated but they involve a progressive accumulation of scar tissue and myofibroblasts activation following epithelial injury of an unknown nature. IPF is associated with a major pulmonary vascular remodeling and an aberrant angiogenesis, with a net vascular ablation and redistribution of blood vessels in areas of interstitial thickening, likely to largely contribute to gas exchange impairment [3, 4]. Fibrotic areas have a decreased vascular density but are associated with adjacent highly vascularized non fibrotic tissues. This aberrant vascular architecture close to fibrotic areas [3] has been explained, at least in part, by an imbalance between pro- and anti-angiogenic growth factors but these results remain controversial [4–7]. These abnormalities appear crucial to the development of pulmonary fibrosis. Indeed, the systemic administration of the angiostatic CXCL11 in bleomycin-exposed mice inhibits pulmonary fibrosis through altering the aberrant vascular remodeling [8]. On the other hand, these vascular derangements may pave the way for the development of pulmonary hypertension (PH) as a result of irreversible vascular remodeling and increase in vascular resistances [4]. PH is common in IPF even in subjects with no significant functional impairment [9]. It is associated with an increased risk of death [10] and with primary graft dysfunction in transplanted patients [11]. The mechanisms which underlie these vascular abnormalities are still largely unknown. Endothelium dysfunctions might play a crucial role among them. In human IPF, the pulmonary endothelium is largely remodeled with highly proliferative cells in juxtaposition with apoptotic ones [3]. In animals, microvascular endothelial cells clearly promote

fibrogenesis [12]. For all these reasons, gaining access to endothelial cell populations in IPF might be a crucial step to a better understanding of the vascular pathophysiology which characterizes this disease.

In this context, circulating endothelial cells (CEC) have proved to be an important marker of vascular remodeling associated to pulmonary hypertension (PH) [13–15]. Endothelial progenitor cells (EPC), mobilized from bone marrow and/or resident structures in the lung, seem to be critical to the maintenance of vasculature homeostasis [16, 17]. Their modulation in chronic pulmonary diseases is controversial [18]. EPC might be reduced [19, 20], or not [21], in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) as well as in hypoxemic patients with severe restrictive lung diseases [19, 22]. Experimental and clinical studies have examined the potential contribution of EPC to the pathogenesis of pulmonary hypertension whether idiopathic or secondary, but again, results have been so far inconsistent [16]. One possible explanation for these discrepancies is related to technical aspects. In fact, there is presently no consensus as to the definition of endothelial progenitors and several types of EPC are referred to in the literature, depending on the method used to assess them, flow cytometry or culture. The former allows a reliable quantification of pure cell populations but no phenotypic profile is presently specific for EPC. Moreover, the correlation between flow cytometry-detected EPC and a vasculogenic potential is elusive. On the other hand, cell culture methods allow the detection of at least two EPC populations. “Early” EPC, so-called “colony-forming-unit-endothelial cells, CFU-EC”, express both endothelial and leukocyte markers [23, 24]. Their number in peripheral blood inversely correlates with cardiovascular risk factors [25]. “Late” EPC, also called endothelial colony-forming cells (ECFC), have the characteristics of precursor cells committed to the endothelial lineage. Both EPC subtypes have a therapeutic potential [23] but cells that merge *in vivo* into neovessels have an ECFC phenotype [24, 26].

As the pulmonary vasculature and the endothelial phenotype are strongly modified in IPF, we postulated that the circulating endothelial compartment, *i.e.* CEC and EPC as well as progenitor cells, might reflect these changes and give us hints to the pathogenesis of IPF-associated vascular remodeling. To obtain the most comprehensive evaluation of this aspect we assessed EPC level using both flow cytometry and cell culture methods.

## Patients and methods

### Study population (Table 1)

A French prospective and multicentric cohort of IPF was established, starting in 2008. Inclusion criteria comprised a

**Table 1** Demographics of the patients

	IPF patients n = 64
Sex ratio (M/F)	45/19
Age, Years	71 (31–87)
TLC, % predicted	70 (34–102)
FVC, % predicted	77 (27–132)
DL <sub>CO</sub> (%)	40 (13–88)
Pa, O <sub>2</sub> mmHg	81 (38–102)

Data are presented as median (range). TLC total lung capacity, FVC forced vital capacity, DL<sub>CO</sub> diffusing capacity of the lung for carbon monoxide, Pa, O<sub>2</sub> arterial oxygen tension

diagnosis of IPF based upon either surgical biopsy or a characteristic Usual interstitial pneumonia Computed Tomography (UIP CT) scan pattern according to the ATS/ERS consensus [2]. The first imaging allowing the diagnosis of IPF had to date back to a maximum of 9 months prior to inclusion. All demographic, comorbidity, clinical and functional data were prospectively and serially recorded. Three teaching hospitals in the Ile de France area participated in a study based upon the assessment of the circulating endothelial compartment in these patients. This study got a specific approval from the Ethics committee of Ile de France II (registry number 2006-108). For this study, blood samples were collected at entry into the IPF cohort from 64 subjects prospectively recruited between March 2008 and May 2010. As shown in Table 1, exhibiting their demographic and clinical characteristics, their median age was 70 years (range 31–87). Patients were compared to 13 healthy control subjects (60–70 year old), that corresponds to mean age of other clinical trial in IPF previously published [27, 28] free of cancer and with no known lung disease, cardiovascular disease and/or risk factors (ClinicalTrials.gov NCT 01038700).

#### CEC isolation and counting

Peripheral venous blood samples were collected on EDTA. Blood collection for CEC quantification was performed after having discarded the first milliliters of blood to avoid presence of endothelial cells dislodged by puncture. CEC were counted by an operator who was unaware of the patients' clinical status. CEC in whole blood were immunocaptured at 4 °C with magnetic beads (Dynabeads M-450, Dynal<sup>®</sup>, Invitrogen, Cergy-pontoise, France) coated with a monoclonal antibody against the endothelial antigen CD146 as previously described [14, 15]. To avoid non specific leukocyte binding to the beads, the cell suspensions were flushed vigorously through the pipette tip during the washing steps and then suspended in acridine orange (3 µg/mL in PBS; Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Saint-Quentin Fallavier, France) before counting under a fluorescence microscope

( $\lambda_{exc} = 490$  nm). CEC were identified as >20-µm cells bearing >10 beads, or as cells with <10 beads but with a well-preserved and recognizable morphology (clear nucleus in a well-defined cytoplasm, and a size compatible with that of endothelial cells). The number of cells in aggregates was determined from the number of nuclei or spherical rosette features. The endothelial nature of the cells thus isolated was confirmed by measuring lectin UEA1 expression.

#### Measurement of soluble E-selectin

Peripheral venous blood was collected in tubes containing 0.105 M sodium citrate (1:9 v/v). Plasma was obtained by double centrifugation at 2,300g for 10 min and was immediately placed at –80 °C until use. Plasma levels of soluble E-selectin were measured with highly sensitive ELISAs as recommended by the manufacturer (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

#### Flow cytometric quantification of progenitor cells

We firstly used monoclonal antibodies and fluorescence activated cell sorting (FACS) analysis to enumerate EPC and progenitors in circulating blood of IPF patients. Antibodies against CD34, the hematopoietic stem cell (HSC) marker CD133, VEGF receptor 2 (KDR) and the common leukocyte antigen CD45 or any combination of those are commonly used to enumerate EPC in human subjects. While CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> cells in human adult peripheral blood may function as EPC in postnatal vascular repair, CD133 probably denotes a hematopoietic cell subpopulation with angiogenic properties (reviewed in [29–31]).

Circulating hematopoietic progenitors CD34<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>45<sup>dim</sup> cells were counted by flow cytometry (FC500 Cytometer; Beckman Coulter, Villepinte, France) according to ISHAGE (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering) protocol [32] after staining of whole blood with a fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled monoclonal mouse anti-human CD45 antibody, a phycoerythrin (PE)-labeled monoclonal mouse antihuman-CD34 antibody and 7AAD (Stemkit<sup>®</sup>; Beckman Coulter) to assess cell viability. Absolute numbers of CD34<sup>+</sup> cells. µL<sup>-1</sup> were determined by using calibration beads, as recommended by the manufacturer. CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> cells were counted among peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated by density gradient centrifugation with lymphocyte separation medium (Histopaque, Sigma) and were labeled with 7AAD Viability Dye (Beckman Coulter, Miami, FL, USA), FITC-conjugated anti-CD34 antibody (Beckman Coulter) and PE-conjugated anti-CD133 antibody (Miltenyi Biotec, Paris, France) or PE-conjugated anti-KDR antibody (R&D Systems, UK). Cells were analyzed in a FC 500 flow

cytometer equipped with RXP software (Beckman Coulter). After selection of 7AAD negative viable cells, progenitor cells were identified within CD34<sup>+</sup> cells displaying FS/SSC characteristics corresponding to the lymphocyte cluster. The percentages of CD133<sup>+</sup> and KDR<sup>+</sup> cells among CD34<sup>+</sup> were determined.

#### EPC quantification by cell culture

Blood was diluted 1:1 with PBS, 0.2 M EDTA and overlaid on Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Cells were centrifuged at 100g for 20 min. Mononuclear cells (MNC) were collected and washed 3 times in PBS, 0.2 M EDTA. CFU-EC were cultured with the EndoCult<sup>®</sup> Liquid Medium kit (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) according to the manufacturer's instructions. Briefly, MNC were resuspended in complete EndoCult<sup>®</sup> medium and seeded at  $5 \times 10^6$  cells/well in fibronectin-coated tissue culture plates (BD, Becton–Dickinson Biosciences). After 48 h, to obtain CFU-EC, nonadherent cells were collected and plated in EndoCult<sup>®</sup> buffer at  $10^6$  cells/well in 24-well fibronectin-coated plates. CFU-ECs were counted after another 3 days, as recommended by the manufacturer. As previously described [24, 33], these cells did not replicate in vitro and gradually disappeared 20 days after plating. To obtain ECFC, adherent cells at 48 h were kept in 6-well fibronectin-coated plates in EGM2 medium (Lonza, Saint-Beauzire, France) composed of endothelial cell basal medium-2 (EBM2), 5 % fetal bovine serum (FBS) and growth factors. ECFC appeared between 7 and 30 days of culture and consisted of well-circumscribed cobblestone monolayers. Colonies were counted with an inverted microscope at  $\times 20$  magnification [33].

#### ECFC proliferation assay

After 16 h of serum and growth-factor privation, ECFC were incubated for 48 h in EBM2 medium, 5 % FBS. Proliferation was examined after 48 h by measuring cell phosphatase activity based on the release of paranitrophenol (pNPP) (Sigma) measured at OD 405 nm (Fluostar optima; BMG labtech, Champigny-sur-Marne, France). Positive control cells were ECFC from cord blood [26], because of their similar phenotype but best proliferative properties [34, 35].

#### Statistical analysis

All data presented in results section are presented as median (range). StatView software (Cary, NC 27513, USA) was used for all statistical analyses, and 2-tailed

*p* values below 0.05 were considered to denote significant differences. Baseline characteristics were compared between the clinical groups by using Wilcoxon's rank sum test for none normally distributed variables and Student's unpaired *t* test otherwise. Comparisons between groups were analyzed using the Student's *t* test or the Mann–Whitney *U*-test. Correlations between progenitor counts and numeric variables were obtained using Spearman's correlation coefficients.

Significance is noticed on Figures: \* when  $p < 0.05$ , \*\* when  $p < 0.01$  and \*\*\* when  $p < 0.001$ .

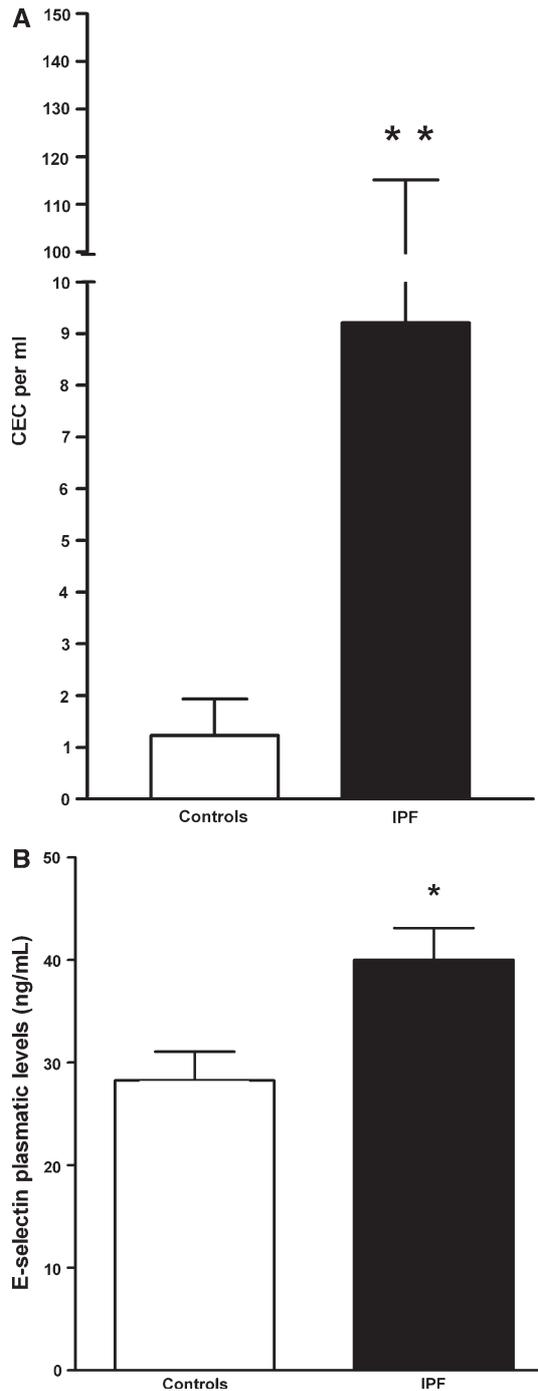
## Results

### Circulating endothelial cells levels are increased during idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)

Immunomagnetically isolated CEC were counted after staining with the fluorescent probe acridin orange or Ulex europaeus agglutinin I, considered currently as the gold standard assay [14, 36]. CEC counts in IPF were sevenfold higher vs controls: 9.2 (0–155) and 1.3 (0–9) cells per mL, respectively,  $p = 0.004$  (Fig. 1a). In line, higher levels of plasmatic sE-selectin were found in IPF patients compared to controls (\* $p = 0.02$ , Fig. 1b), suggesting an increase of endothelial lesion and/or activation process in IPF patients.

### Circulating progenitor cell numbers are decreased in IPF

When using flow cytometry, no significant differences were observed between IPF and controls in terms of CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>45<sup>dim</sup> and CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> counts (Table 2). In contrast, the CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> EPC containing-population was largely decreased in IPF (0.11 % of total CD34<sup>+</sup> (0–4.7) and 1.2 % (0–6.5) in IPF and controls, respectively,  $p = 0.005$ ) (Table 2). Regarding CFU-EC as quantified by a 5-day culture assay, they were also significantly decreased in IPF vs controls (7.5 (0–97) and 13.4 (7.5–28.5) per  $10^6$  mononuclear cells plated, respectively,  $p = 0.0008$ ) (Fig. 2a). Finally, ECFC detected through long term culture also tended to be decreased in IPF (0.4 (0–4) and 0.6 (0–6) per  $5 \cdot 10^6$  mononuclear cells plated/well, in IPF and controls, respectively), without reaching statistical significance ( $p = 0.09$ , Fig. 2b). To further characterize these IPF-associated ECFC, we compared, whenever possible, some of their characteristics to those of controls. Firstly, ECFC recovered in IPF and grown to confluence from single colonies had an endothelial characteristic cobblestone aspect through numerous



**Fig. 1** CEC are increased in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). **a** CEC counts in peripheral venous blood of IPF patients in contrast to healthy controls of 60–70 years old. CEC counts were significantly increased in IPF ( $p = 0.004$ ). **b** Plasma levels of sE-selectin (ng/mL) in IPF were measured with ELISA. sE-selectin were increased in IPF ( $*p = 0.02$ )

passages similar to that of controls. In addition, ECFC recovered from both IPF subjects and controls exhibited a comparable proliferation potential (Fig. 2c).

### Relationships between circulating endothelial compartment and IPF characteristics

Differences in endothelial cells and progenitors were not associated to the smoking status as it has been shown in other models [37] or with medications with a potential impact on these cells [38] (data not shown). In contrast, they were markedly associated with the Diffusing capacity of the lung for carbon monoxide ( $DL_{CO}$ ). The latter is a reliable guide to outcome and values of less than 40 % predicted are generally indicative of advanced disease. Accordingly, a  $DL_{CO}$  cut-off of 40 % predicted discriminated our study population into two groups ( $DL_{CO} >$  or  $<$  40 %) which markedly differed in their functional parameters (Total lung capacity, TLC; Forced vital capacity, FVC and arterial oxygen tension, PaO<sub>2</sub> levels). All of these parameters were lower in subjects with a  $DL_{CO} <$  40 % predicted ( $p = 0.0007$ , 0.03 and 0.005, respectively, for TLC, FVC and PaO<sub>2</sub>, data not shown). We found no difference between these 2 groups in terms of CEC (2 (0–155) and 2 (0–38) cells per mL, for  $DL_{CO} <$  40 % and  $>$ 40 %, respectively,  $p = 0.97$ ). Regarding progenitors, EPC assessed through flow cytometry did not differ either between the 2 groups (Table 3). There was no correlation between  $DL_{CO}$  values and CEC,  $CD34^+$ ,  $CD34^+45^{dim}$ ,  $CD34^+CD133^+$ ,  $CD34^+KDR^+$  and CFU-EC counts (with respectively a  $p = 0.13$ , 0.6, 0.38, 0.14, 0.9 and 0.06). In contrast, progenitors recovered through culture markedly differed according to the  $DL_{CO}$  threshold. Indeed, subjects with a  $DL_{CO} <$  40 % predicted, i.e. the most severe ones, exhibited a significant increase in both CFU-EC and ECFC counts compared to those with a  $DL_{CO} >$  40 % predicted (Fig. 3). CFU-EC were 2.5-fold increased in the former group (11.4 (0–97) and 4.4 (0–37) per  $10^6$  mononuclear cells plated, in  $DL_{CO} <$  40 % and  $DL_{CO} >$  40 %, respectively (Fig. 3a,  $p = 0.04$ ). Similarly, ECFC were fivefold increased in the former group (0.5 (0–3.7) and 0.1 (0–2) per  $5.10^6$  mononuclear cells plated per well in  $DL_{CO} <$  40 % and  $>$  40 %, respectively,  $p = 0.01$ ) (Fig. 3b). Finally, there was a negative correlation between ECFC counts and  $DL_{CO}$  values in IPF as a whole (Spearman correlation test,  $p = 0.04$ ).

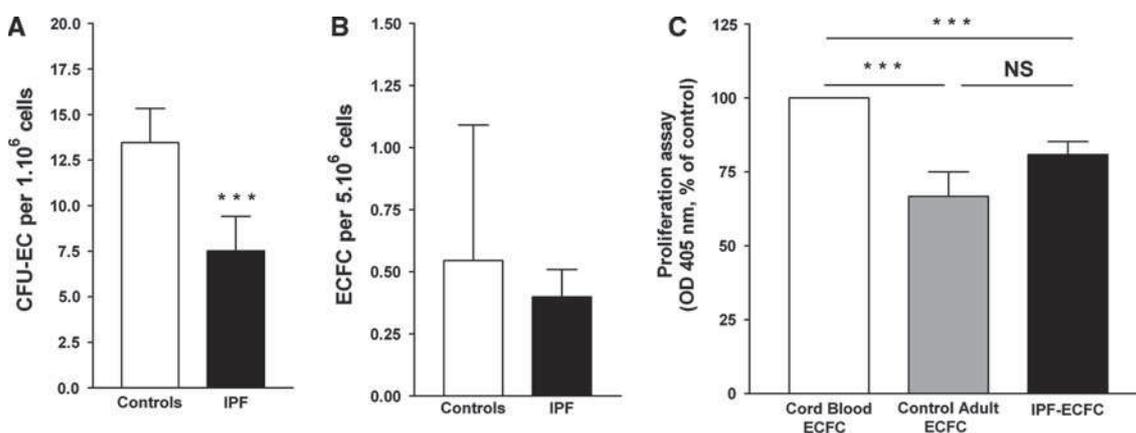
### Relationships between circulating endothelial compartment and IPF worsening

Among the 64 patients enrolled in this study, we have an 18-month follow up for 47 of them in terms of circulating endothelial cell (CEC) and endothelial progenitor cell (EPC) counts in culture. These patients have had 2–8 blood samples during this follow-up. No difference was observed for both EPC types (CFU-EC and ECFC), whether exacerbation occurred or if patients remained in stable IPF. However, CEC levels increased in patients with exacerbation (57.9 CEC per mL), including those who died

**Table 2** Progenitor cells quantified by flow cytometry in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and control subjects

	Controls	IPF	<i>p</i>
Total CD34+ (absolute count)	1690.9 (267–5569)	1747 (0–6541)	0.58
CD34+ 45dim (absolute count)	1320.2 (230–4758)	1544 (196–6466)	0.3
CD34+ 133+ (% of total CD34+)	68.6 (56.2–75.8)	71 (40.2–85)	0.4
CD34+ KDR+ (% of total CD34+)	1.2 (0–6.5)	0.11 (0–4.7)	0.005

Data are presented as median (range)



**Fig. 2** Quantification of EPC subtypes in IPF. **a** Numbers of CFU-EC in IPF, counted with Endocult<sup>®</sup> assay. Results are the number of adherent cell clusters per  $10^6$  mononuclear cells. Results are medians  $\pm$  SEM ( $p = 0.0008$ ). **b** Number of ECFC determined by cell culture according to patient group. A non significant trend is observed between IPF and healthy controls ( $p = 0.09$ ). **c** Proliferative potential of ECFC isolated from IPF patients. Each patient-derived ECFC were individually analyzed for proliferation and proliferative

properties in vitro. At least 4 different patient's derived-ECFCs were used. Cells from IPF patients showed the same proliferative potential (in EBM, 5 % FBS) compared with ECFC from healthy volunteers of the same age. Results are presented normalized to ECFC from cord blood (100 %) that is a good positive control of ECFC with same phenotype and a better proliferation potential [34, 35]. The mean and SEM of three experiments are shown

**Table 3** Comparison of pulmonary function test results, progenitor cells quantified by flow cytometry and circulating endothelial cells in patients according to  $DL_{CO}$ 

	$DL_{CO} < 40 \%$ , $n = 29$	$DL_{CO} < 40 \%$ , $n = 29$	<i>p</i>
Total CD34+ (absolute count)	$2136 \pm 249$	$2175 \pm 267$	0.88
CD34+ 45dim (absolute count)	$1795 \pm 215$	$2028 \pm 261$	0.81
CD34+ 133+ (% of total CD34+)	$70 \pm 1.5$	$70 \pm 2$	0.37
CD34+ KDR+ (% of total CD34+)	$0.73 \pm 0.3$	$0.4 \pm 0.1$	0.65
CEC per mL	$7.3 \pm 2.7$	$99 \pm 3.7$	0.92

Data are presented as median (range).  $DL_{CO}$  diffusing capacity of the lung for carbon monoxide,  $TLC$  total lung capacity,  $FVC$  forced vital capacity,  $Pa, O_2$  arterial oxygen tension

during follow up (41.8 CEC per mL), by contrast to stable IPF patients (10.6 CEC per mL) (Fig. 4a,  $p = 0.0005$  and 0.006 respectively for exacerbation and death compared to stable IPF patients without any worsening). No CEC increase was observed when IPF slowly progressed.

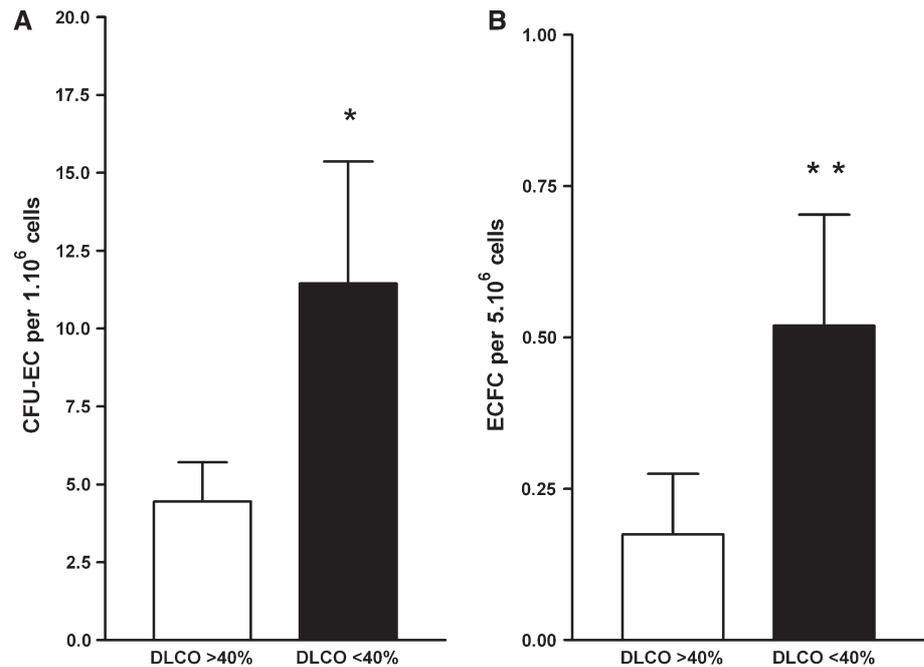
Moreover, we have compared in vitro phenotype and angiogenic properties of ECFC isolated from patients either in stable IPF ( $n = 6$ ) or in exacerbation process ( $n = 3$ ). While ECFC phenotype and pseudotube

formation ability in matrigel did not differ between groups, ECFC from patients with exacerbation proliferative potential was increased ( $p = 0.03$ , Fig. 4b).

## Discussion

We have demonstrated in this study that IPF is associated with an increase in endothelial lesion and/or activation as

**Fig. 3** EPC subtype quantification according to diffusing capacity of the lung for carbon monoxide in IPF. **a** Numbers of CFU-EC counted with Endocult<sup>®</sup> assay in IPF patients according to DL<sub>CO</sub> cut-off of 40 %. Results are medians  $\pm$  SEM ( $p = 0.04$ ). **b** Number of ECFC determined by cell culture in IPF patients according to DL<sub>CO</sub> cut-off of 40 %. Results are medians  $\pm$  SEM ( $p = 0.01$ )



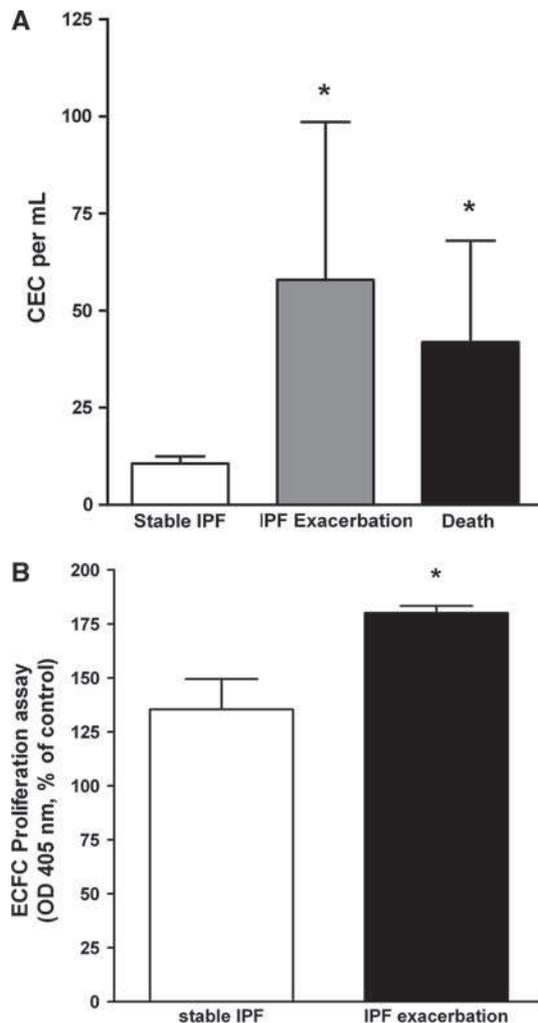
reflected by circulating endothelial cells (CEC) and with a defect in endothelial progenitor cells (EPC) whether characterized as CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> cells or through cell culture as CFU-EC and ECFC.

Idiopathic pulmonary fibrosis is associated with abnormal and heterogeneous vascular remodeling. This aberrant vascular architecture close to fibrotic areas [39] has been hypothesized to result from an imbalance between angiogenic growth factors but these results are controversial and the real implication of these factors is not clear [4, 40]. The endothelium plays a central role in pulmonary vascular regulation and endothelial dysfunction is increasingly viewed as critical for disease initiation and progression of IPF. We have shown in previous studies that circulating endothelial cells accurately reflected the activation status of pulmonary endothelium [14, 15]. To evaluate these data in the context of IPF, we assessed CEC and EPC in a consistent number ( $n = 64$ ) of newly diagnosed IPF in relation with their functional parameters. Such a comprehensive study of the circulating endothelial compartment has, to the best of our knowledge, never been carried out before in this context.

CEC are a novel marker of endothelial damage, and their numbers correlate with other markers of endothelial function, such as flow-mediated dilation, von Willebrand factor and tissue plasminogen activator levels [41]. CEC counts are increased in coronary heart disease, renal vascular disease [42] and transplantation [43], and are a marker of progression and survival in acute coronary disease [44]. Very few data are available on CEC counts in lung disease. We recently showed that CEC numbers distinguished two groups of children with PAH secondary to congenital heart disease [14], and also

increased in adult PAH in contrast to post thrombotic PH [15]. In both cases, no correlation between hemodynamic parameters and CEC was found [14, 15]. Our previous data in PAH suggest that high pulmonary pressures are not the main trigger of endothelial cell detachment from vessel walls and their subsequent circulation. Rather, the supernumerary CEC observed in PAH might result from increased vascular activation and/or remodeling more than lesion. Because, as proposed in PAH, CEC count did not correlate in IPF to pulmonary pressure, we believe that the observed increase in CEC numbers reflects endothelial activation. We have also quantified plasma soluble E-selectin, an adhesion molecule inducible on endothelial cells, of the 67 patients with stable IPF and found that E-selectin levels were significantly increased compared to healthy controls. Soluble E-selectin has also been linked to endothelial damage and/or activation. This elevated soluble E-selectin level in IPF, along with the excess of CEC, could reflect increased endothelial activation. To the best of our knowledge, markers of vascular injury in stable IPF patients are an original finding.

To get clues to the major vascular derangements known to be present in IPF, we went on to evaluate the balance between vascular injury and repair capacities in these subjects. Endothelial progenitor cells (EPC) are bone marrow-derived cells involved in endothelial homeostasis as well as in physiological and pathological angiogenesis. In restrictive lung disease, EPC are decreased in relation with altered DL<sub>CO</sub> [19]. More specifically in IPF, the depletion of EPC could be a link between fibrosis and pulmonary hypertension [22]. Moreover, in system diseases with pulmonary fibrosis, such as systemic sclerosis



**Fig. 4** Relationships between circulating endothelial compartment and IPF worsening. **a** CEC counts during the 18 month follow up in stable IPF patients without worsening in contrast to stable IPF patients with exacerbation or death. CEC counts were significantly increased in both situations with respectively a  $p = 0.0005$  and  $0.006$  for exacerbation and death compared to stable IPF patients without any worsening. **b** Proliferative potential of ECFC isolated from stable IPF patients in contrast to patients with exacerbation of IPF. Results are presented normalized to ECFC from adult blood of controls (100 %)

and rheumatoid, circulating endothelial compartment have been shown to be modulated [45]. Indeed, EPCs may contribute to the increased cardiovascular morbidity and mortality in rheumatoid arthritis [45] and correlate with disease severity [46]. Results available in systemic sclerosis are consistent with the hypothesis that EPCs are recruited during active disease [45, 47, 48].

Data are however very difficult to compare between these studies because of marked differences in the methods used to characterize them. EPC quantification is, in most of the studies, performed using flow cytometry whose results are notably known not to correlate with those of cell culture [49].

However, some studies have demonstrated reliable relationships between EPC phenotype and functions. We have recently shown for instance that in patients with critical leg ischemia, bone marrow mononuclear cell therapy induced the formation of new vessels containing endothelial cells with a ECFC phenotype [26, 50]. Yoder et al. [24] have also shown that transplanted ECFC are able to acquire a complete endothelial phenotype, to maintain a high proliferative potential and to participate in endothelial healing and angiogenesis. To rule out technical bias leading to a truncated interpretation of the EPC pool, we carried out a comprehensive evaluation of these cells using all the methods presently known to characterize them. We normalized the different EPC subpopulations quantified by flow cytometry to the CD34 positive cells. Indeed, CD34 antigen as a potential marker of circulating EPC has been largely used in the literature because it is expressed both on endothelial cells and on human hematopoietic stem and progenitor cells used for stem cell transplantation. However, most of the in vivo and in vitro studies have identified CD34 cells as the population that give rise to EPC, at least in vitro. The original description of cluster-forming cells appearing within 5 days after CD34+ cell plating in culture and showing endothelial characteristics were defined as putative EPC [51]. Thereafter, Ito and colleagues found same results by plating blood cells on fibronectin coated dishes [52]. Since these first descriptions, the cells coexpressing CD34, Flk-1 (KDR in human subjects) and CD133 have been commonly considered as EPC. The positivity of these antigens has continued to be used as surrogate markers for evaluating circulating cells with vascular reparative properties or to isolate them. Consequently, CD34 with CD133, and/or KDR expression have been used to identify human circulating EPC in thousands papers since 2000, and many of them have reported significant correlations between blood concentration of this putative EPC subset and a disease state (reviewed in [53]). Luminal endothelial CD34 staining was ubiquitous distributed in quiescent small blood vessels and capillaries in non-pathologic human tissues but also on endothelial cells in sites of active angiogenesis in some carcinoma models [54]. Thus, since vessels express CD34 marker, we cannot assert that CD34 is lost during vessel formation with progenitor cells such as previously described with fibrocytes [55], largely involved in IPF. However, one of the limitation of using CD34 is its widely expression on various other cells such as fibrocytes [55] but also mesenchymal [56], epithelial, and even cancer stem cells [30]. Thus, the use of CD34 as an EPC marker is questionable and the addition of specific markers would be useful to discriminate these different cellular lineages from the putative EPC. Nevertheless, Yoder's group has recently described a new approach to count EPC by flow cytometry, that correlated to in vitro phenotype in culture, and these cells stained positive for CD34 [57]. Therefore,

using CD34 marker is probably the less inexact manner to identify putative EPC.

As a whole, we found a significant defect of EPC in IPF. However although they remained lower than those from healthy controls in subjects with  $DL_{CO} < 40\%$ , CFU-EC and ECFC counts largely increased over those from subjects with  $DL_{CO} > 40\%$  indicating a strong mobilization from the bone marrow in this subgroup of patients. One potential explanation might be the release of non specific inflammatory stimuli during fibrogenesis with a role in EPC mobilization as it had been shown in bacterial pneumonia [58]. Alternatively, EPC might be actively mobilized in these most severe subjects to participate in the aberrant angiogenesis, which characterize severe IPF. Indeed, ECFC possess all the characteristics of true endothelial progenitors, based on the clonal relationship between EPC and hematopoietic stem cells in patients with myeloproliferative disorders [24]. In some conditions, ECFC exhibit an impaired capacity to form vascular networks [59] which could be, at least in part, restored by some drugs [33]. In IPF, ECFC from patients with exacerbation proliferative potential was strongly increased. This increased proliferative potential could result from the presence of immature cells or angiogenic progenitors mobilized to repair vessels. However, this remains to be confirmed in a larger cohort and correlated to angiogenic pathways involved in exacerbation of IPF as recently proposed in review of Farkas et al. [4]. Altogether, the increased mobilization of ECFC in the most severe forms of IPF might reflect their repair capacities and participation to an adaptive response to the net vascular ablation observed in severely fibrotic areas. However, contrasting to their repair capacities, the recruitment of EPC might be extremely deleterious to the lung as endothelial cells [60] and ECFC [61, 62] have been shown to be able to differentiate into mesenchymal cells and to contribute to intimal hyperplasia but also potentially to a real tissue remodeling, given the stemness of cells able to give rise to all mesenchymal lineages [60]. Circulating EPC might in this context serve as an extra-pulmonary source of fibroblasts further enhancing local fibrogenesis.

In conclusion, this study has shown a marked imbalance between biomarkers of endothelial injury/activation and endothelial progenitors in IPF. The role of EPC in vascular repair, in the development of pulmonary hypertension through excessive vascular remodeling or in increased fibrogenesis through an endothelium to mesenchymal transition cannot be anticipated so far. The serial assessment of CEC and EPC as biomarker of disease during the follow-up and appearance of more clinical events like PAH will give us hints to these questions.

**Acknowledgments** We thank maternity department of Begin hospitals for providing us cord blood. Umbilical cord bloods were collected from consenting mothers. The study was approved by local ethics committee of “Hôpital des Instructions et des Armées de Begin (France) (201008043234797) and protocol conformed to ethical guidelines of Declaration of Helsinki. We received research grants from the Chancellerie des Universités, Paris, France (Leg Poix).

**Conflict of interest** None.

## References

- Noble PW, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Glassberg MK, Kardatzke D, King TE Jr, Lancaster L, Sahn SA, Szwarcberg J, Valeyre D, du Bois RM (2011) Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials. *Lancet* 377:1760–1769
- Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, Colby TV, Cordier JF, Flaherty KR, Lasky JA, Lynch DA, Ryu JH, Swigris JJ, Wells AU, Ancochea J, Bouros D, Carvalho C, Costabel U, Ebina M, Hansell DM, Johkoh T, Kim DS, King TE Jr, Kondoh Y, Myers J, Muller NL, Nicholson AG, Richeldi L, Selman M, Dudden RF, Griss BS, Protzko SL, Schunemann HJ (2011) An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* 183:788–824
- Ebina M, Shimizukawa M, Shibata N, Kimura Y, Suzuki T, Endo M, Sasano H, Kondo T, Nukiwa T (2004) Heterogeneous increase in CD34-positive alveolar capillaries in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 169:1203–1208
- Farkas L, Gaudie J, Voelkel NF, Kolb M (2011) Pulmonary hypertension and idiopathic pulmonary fibrosis: a tale of angiogenesis, apoptosis, and growth factors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45:1–15
- Evrard SM, d’Audigier C, Mauge L, Israel-Biet D, Guerin CL, Bieche I, Kovacic JC, Fischer AM, Gaussem P, Smadja DM (2012) The profibrotic cytokine transforming growth factor-beta1 increases endothelial progenitor cell angiogenic properties. *J Thromb Haemost* 10:670–679
- Antoniou KM, Soufla G, Lymbouridou R, Economidou F, Lasithiotaki I, Manousakis M, Drositis I, Spandidos DA, Siafakas NM (2010) Expression analysis of angiogenic growth factors and biological axis CXCL12/CXCR4 axis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Connect Tissue Res* 51:71–80
- Margaritopoulos GA, Antoniou KM, Karagiannis K, Vassalou E, Lasithiotaki I, Lambiri I, Siafakas NM (2010) Investigation of angiogenetic axis Angiopoietin-1 and -2/Tie-2 in fibrotic lung diseases: a bronchoalveolar lavage study. *Int J Mol Med* 26:919–923
- Burdick MD, Murray LA, Keane MP, Xue YY, Zisman DA, Belperio JA, Strieter RM (2005) CXCL11 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibition of vascular remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 171:261–268
- Papakosta D, Pitsiou G, Daniil Z, Dimadi M, Stagaki E, Rapti A, Antoniou K, Tzouveleki A, Kontakiotis T, Tryfon S, Polychronopoulos V, Bouros D (2011) Prevalence of Pulmonary Hypertension in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Correlation with Physiological Parameters. *Lung* 189:391–399
- Ley B, Collard HR, King TE Jr (2011) Clinical course and prediction of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 183:431–440
- Fang A, Studer S, Kawut SM, Ahya VN, Lee J, Wille K, Lama V, Ware L, Orens J, Weinacker A, Palmer SM, Crespo M, Lederer

- DJ, Deutschman CS, Kohl BA, Bellamy S, Demissie E, Christie JD (2011) Elevated pulmonary artery pressure is a risk factor for primary graft dysfunction following lung transplantation for idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 139:782–787
12. Yin Q, Nan HY, Zhang WH, Yan LF, Cui GB, Huang XF, Wei JG (2011) Pulmonary microvascular endothelial cells from bleomycin-induced rats promote the transformation and collagen synthesis of fibroblasts. *J Cell Physiol* 226:2091–2102
  13. Bull TM, Golpon H, Heibel RP, Solovey A, Cool CD, Tudor RM, Geraci MW, Voelkel NF (2003) Circulating endothelial cells in pulmonary hypertension. *Thromb Haemost* 90:698–703
  14. Smadja DM, Gaussem P, Mauge L, Israel-Biet D, Dignat-George F, Peyrard S, Agnoletti G, Vouhe PR, Bonnet D, Levy M (2009) Circulating endothelial cells: a new candidate biomarker of irreversible pulmonary hypertension secondary to congenital heart disease. *Circulation* 119:374–381
  15. Smadja DM, Mauge L, Sanchez O, Silvestre JS, Guerin C, Godier A, Henno P, Gaussem P, Israel-Biet D (2010) Distinct patterns of circulating endothelial cells in pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 36:1284–1293
  16. Fadini GP, Avogaro A, Ferraccioli G, Agostini C (2010) Endothelial progenitors in pulmonary hypertension: new pathophysiology and therapeutic implications. *Eur Respir J* 35:418–425
  17. Duong HT, Erzurum SC, Asosingh K (2011) Pro-angiogenic hematopoietic progenitor cells and endothelial colony-forming cells in pathological angiogenesis of bronchial and pulmonary circulation. *Angiogenesis* 14:411–422
  18. Huertas A, Palange P (2011) Circulating endothelial progenitor cells and chronic pulmonary diseases. *Eur Respir J* 37:426–431
  19. Fadini GP, Schiavon M, Cantini M, Baesso I, Facco M, Miorin M, Tassinato M, de Kreutzenberg SV, Avogaro A, Agostini C (2006) Circulating progenitor cells are reduced in patients with severe lung disease. *Stem Cells* 24:1806–1813
  20. Palange P, Testa U, Huertas A, Calabro L, Antonucci R, Petrucci E, Pelosi E, Pasquini L, Satta A, Morici G, Vignola MA, Bonsignore MR (2006) Circulating haemopoietic and endothelial progenitor cells are decreased in COPD. *Eur Respir J* 27:529–541
  21. Caramori G, Rigolin GM, Mazzoni F, Leprotti S, Campioni P, Papi A (2011) Circulating endothelial stem cells are not decreased in pulmonary emphysema or COPD. *Thorax* 65:554–555
  22. Fadini GP, Schiavon M, Rea F, Avogaro A, Agostini C (2007) Depletion of endothelial progenitor cells may link pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 176:724–725; author reply 725
  23. Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, Oh BH, Lee MM, Park YB (2004) Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:288–293
  24. Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, Krasich R, Temm CJ, Prchal JT, Ingram DA (2007) Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* 109:1801–1809
  25. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T (2003) Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 348:593–600
  26. Smadja DM, Bieche I, Silvestre JS, Germain S, Cornet A, Laurendeau I, Duong-Van-Huyen JP, Emmerich J, Vidaud M, Aiach M, Gaussem P (2008) Bone morphogenetic proteins 2 and 4 are selectively expressed by late outgrowth endothelial progenitor cells and promote neoangiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:2137–2143
  27. Tcherakian C, Cottin V, Brillet PY, Freynet O, Naggara N, Carton Z, Cordier JF, Brauner M, Valeyre D, Nunes H (2011) Progression of idiopathic pulmonary fibrosis: lessons from asymmetrical disease. *Thorax* 66:226–231
  28. Lee SH, Shim HS, Cho SH, Kim SY, Lee SK, Son JY, Jung JY, Kim EY, Lim JE, Lee KJ, Park BH, Kang YA, Kim YS, Kim SK, Chang J, Park MS (2011) Prognostic factors for idiopathic pulmonary fibrosis: clinical, physiologic, pathologic, and molecular aspects. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 28:102–112
  29. Yoder MC, Ingram DA (2009) The definition of EPCs and other bone marrow cells contributing to neoangiogenesis and tumor growth: is there common ground for understanding the roles of numerous marrow-derived cells in the neoangiogenic process? *Biochim Biophys Acta* 1796:50–54
  30. Hirschi KK, Ingram DA, Yoder MC (2008) Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:1584–1595
  31. Yoder MC (2010) Is endothelium the origin of endothelial progenitor cells? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:1094–1103
  32. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I (1996) The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematology and Graft Engineering. *J Hematother* 5:213–226
  33. Smadja DM, Mauge L, Gaussem P, d'Audigier C, Israel-Biet D, Celermajer DS, Bonnet D, Levy M (2011) Treprostinil increases the number and angiogenic potential of endothelial progenitor cells in children with pulmonary hypertension. *Angiogenesis* 14:17–27
  34. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, Pollok K, Ferkowicz MJ, Gilley D, Yoder MC (2004) Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 104:2752–2760
  35. Smadja DM, Mauge L, Susen S, Bieche I, Gaussem P (2009) Blood outgrowth endothelial cells from cord blood and peripheral blood: angiogenesis-related characteristics in vitro: a rebuttal. *J Thromb Haemost* 7:504–506; author reply 506–508
  36. Woywodt A, Blann AD, Kirsch T, Erdbruegger U, Banzet N, Haubitz M, Dignat-George F (2006) Isolation and enumeration of circulating endothelial cells by immunomagnetic isolation: proposal of a definition and a consensus protocol. *J Thromb Haemost* 4:671–677
  37. Yue WS, Wang M, Yan GH, Yiu KH, Yin L, Lee SW, Siu CW, Tse HF (2010) Smoking is associated with depletion of circulating endothelial progenitor cells and elevated pulmonary artery systolic pressure in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 106:1248–1254
  38. Fadini GP, Albiero M, Boscaro E, Menegazzo L, Cabrelle A, Piliago T, Federici M, Agostini C, Avogaro A (2010) Rosuvastatin stimulates clonogenic potential and anti-inflammatory properties of endothelial progenitor cells. *Cell Biol Int* 34:709–715
  39. Renzoni EA, Walsh DA, Salmon M, Wells AU, Sestini P, Nicholson AG, Veeraraghavan S, Bishop AE, Romanska HM, Pantelidis P, Black CM, Du Bois RM (2003) Interstitial vascularity in fibrosing alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 167:438–443
  40. Evrard SM, d'Audigier C, Mauge L, Israel-Biet D, Guerin CL, Bieche I, Kovacic JC, Fischer AM, Gaussem P, Smadja DM (2012) Profibrotic cytokine TGF-beta1 increases endothelial progenitor cell angiogenic properties. *J Thromb Haemost* 10:670–679
  41. Boos CJ, Blann AD, Lip GY (2007) Assessment of endothelial damage/dysfunction: a focus on circulating endothelial cells. *Methods Mol Med* 139:211–224
  42. Yao G, Liu ZH, Zheng C, Zhang X, Chen H, Zeng C, Li LS (2008) Evaluation of renal vascular lesions using circulating endothelial cells in patients with lupus nephritis. *Rheumatology (Oxford)* 47:432–436

43. Widemann A, Sabatier F, Arnaud L, Bonello L, Al-Massarani G, Paganelli F, Poncelet P, Dignat-George F (2008) CD146-based immunomagnetic enrichment followed by multiparameter flow cytometry: a new approach to counting circulating endothelial cells. *J Thromb Haemost* 6:869–876
44. Lee KW, Lip GY, Tayebjee M, Foster W, Blann AD (2005) Circulating endothelial cells, von Willebrand factor, interleukin-6, and prognosis in patients with acute coronary syndromes. *Blood* 105:526–532
45. Avouac J, Uzan G, Kahan A, Boileau C, Allanore Y (2008) Endothelial progenitor cells and rheumatic disorders. *Joint Bone Spine* 75:131–137
46. Jodon de Villeroche V, Avouac J, Ponceau A, Ruiz B, Kahan A, Boileau C, Uzan G, Allanore Y (2010) Enhanced late-outgrowth circulating endothelial progenitor cell levels in rheumatoid arthritis and correlation with disease activity. *Arthritis Res Ther* 12:R27
47. Avouac J, Wipff J, Goldman O, Ruiz B, Couraud PO, Chiochia G, Kahan A, Boileau C, Uzan G, Allanore Y (2008) Angiogenesis in systemic sclerosis: impaired expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 in endothelial progenitor-derived cells under hypoxic conditions. *Arthritis Rheum* 58:3550–3561
48. Allanore Y, Batteux F, Avouac J, Assous N, Weill B, Kahan A (2007) Levels of circulating endothelial progenitor cells in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 25:60–66
49. George J, Shmilovich H, Deutsch V, Miller H, Keren G, Roth A (2006) Comparative analysis of methods for assessment of circulating endothelial progenitor cells. *Tissue Eng* 12:331–335
50. Smadja DM, Duong-van-Huyen JP, Dal Cortivo L, Blanchard A, Bruneval P, Emmerich J, Gaussem P (2012) Early endothelial progenitor cells in bone marrow are a biomarker of cell therapy success in patients with critical limb ischemia. *Cytotherapy* 14:232–239
51. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275:964–967
52. Ito H, Rovira II, Bloom ML, Takeda K, Ferrans VJ, Quyyumi AA, Finkel T (1999) Endothelial progenitor cells as putative targets for angiostatin. *Cancer Res* 59:5875–5877
53. Fadini GP, Losordo D, Dimmeler S (2012) Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circ Res* 110:624–637
54. Siemerink MJ, Klaassen I, Vogels IM, Griffioen AW, Van Noorden CJ, Schlingemann RO (2012) CD34 marks angiogenic tip cells in human vascular endothelial cell cultures. *Angiogenesis* 15:151–163
55. Moeller A, Gilpin SE, Ask K, Cox G, Cook D, Gaudie J, Margetts PJ, Farkas L, Dobranowski J, Boylan C, O’Byrne PM, Strieter RM, Kolb M (2009) Circulating fibrocytes are an indicator of poor prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 179:588–594
56. Antoniou KM, Papadaki HA, Soufla G, Kastrinaki MC, Damiadaki A, Koutala H, Spandidos DA, Siafakas NM (2010) Investigation of bone marrow mesenchymal stem cells (BM MSCs) involvement in Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF). *Respir Med* 104:1535–1542
57. Mund JA, Estes ML, Yoder MC, Ingram DA Jr, Case J (2012) Flow cytometric identification and functional characterization of immature and mature circulating endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32:1045–1053
58. Yamada M, Kubo H, Ishizawa K, Kobayashi S, Shinkawa M, Sasaki H (2005) Increased circulating endothelial progenitor cells in patients with bacterial pneumonia: evidence that bone marrow derived cells contribute to lung repair. *Thorax* 60:410–413
59. Toshner M, Voswinkel R, Southwood M, Al-Lamki R, Howard LS, Marchesan D, Yang J, Suntharalingam J, Soon E, Exley A, Stewart S, Hecker M, Zhu Z, Gehling U, Seeger W, Pepke-Zaba J, Morrell NW (2009) Evidence of dysfunction of endothelial progenitors in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 180:780–787
60. Medici D, Shore EM, Lounev VY, Kaplan FS, Kalluri R, Olsen BR (2010) Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells. *Nat Med* 16:1400–1406
61. Moonen JR, Krenning G, Brinker MG, Koerts JA, van Luyn MJ, Harmsen MC (2010) Endothelial progenitor cells give rise to pro-angiogenic smooth muscle-like progeny. *Cardiovasc Res* 86:506–515
62. Diez M, Musri MM, Ferrer E, Barbera JA, Peinado VI (2010) Endothelial progenitor cells undergo an endothelial-to-mesenchymal transition-like process mediated by TGFbetaRI. *Cardiovasc Res* 88:502–511



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



1. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003;9:653-660
2. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000;407:249-257
3. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature.* 2005;438:932-936
4. 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;275:964-967
5. Toshner M, Voswinckel R, Southwood M, Al-Lamki R, Howard LS, Marchesan D, Yang J, Suntharalingam J, Soon E, Exley A, Stewart S, Hecker M, Zhu Z, Gehling U, Seeger W, Pepke-Zaba J, Morrell NW. Evidence of dysfunction of endothelial progenitors in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180:780-787
6. Farkas L, Farkas D, Ask K, Moller A, Gaudie J, Margetts P, Inman M, Kolb M. Vegf ameliorates pulmonary hypertension through inhibition of endothelial apoptosis in experimental lung fibrosis in rats. *J Clin Invest.* 2009;119:1298-1311
7. Raghu G, Weycker D, Edelsberg J, Bradford WZ, Oster G. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174:810-816
8. Di Sario A, Bendia E, Svegliati Baroni G, Ridolfi F, Casini A, Ceni E, Saccomanno S, Marziani M, Trozzi L, Sterpetti P, Taffetani S, Benedetti A. Effect of pirfenidone on rat hepatic stellate cell proliferation and collagen production. *J Hepatol.* 2002;37:584-591
9. Lin X, Yu M, Wu K, Yuan H, Zhong H. Effects of pirfenidone on proliferation, migration, and collagen contraction of human tenon's fibroblasts in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50:3763-3770
10. Nakayama S, Mukae H, Sakamoto N, Kakugawa T, Yoshioka S, Soda H, Oku H, Urata Y, Kondo T, Kubota H, Nagata K, Kohno S. Pirfenidone inhibits the expression of hsp47 in tgf-beta1-stimulated human lung fibroblasts. *Life Sci.* 2008;82:210-217
11. Schaefer CJ, Ruhrmund DW, Pan L, Seiwert SD, Kossen K. Antifibrotic activities of pirfenidone in animal models. *Eur Respir Rev.* 2011;20:85-97
12. Richeldi L. Assessing the treatment effect from multiple trials in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir Rev.* 2012;21:147-151
13. Spagnolo P, Del Giovane C, Luppi F, Cerri S, Balduzzi S, Walters EH, D'Amico R, Richeldi L. Non-steroid agents for idiopathic pulmonary fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010:CD003134
14. Richeldi L, Costabel U, Selman M, Kim DS, Hansell DM, Nicholson AG, Brown KK, Flaherty KR, Noble PW, Raghu G, Brun M, Gupta A, Juhel N, Kluglich M, du Bois RM. Efficacy of a tyrosine kinase inhibitor in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 2011;365:1079-1087
15. Hiatt WR. Medical treatment of peripheral arterial disease and claudication. *N Engl J Med.* 2001;344:1608-1621
16. Allison MA, Ho E, Denenberg JO, Langer RD, Newman AB, Fabsitz RR, Criqui MH. Ethnic-specific prevalence of peripheral arterial disease in the united states. *Am J Prev Med.* 2007;32:328-333
17. Sagar SP, Brown PM, Zelt DT, Pickett WL, Tranmer JE. Further clinical validation of the walking impairment questionnaire for classification of walking performance in patients with peripheral artery disease. *Int J Vasc Med.* 2012;2012:190641
18. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* 1992;267:10931-10934
19. Risau W. Differentiation of endothelium. *Faseb J.* 1995;9:926-933
20. Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood.* 1998;92:362-367
21. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, 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
22. Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schafer B, Hossfeld DK, Fiedler W. In vitro differentiation of endothelial cells from ac133-positive progenitor cells. *Blood.* 2000;95:3106-3112
23. Bompais H, Chagraoui J, Canron X, Crisan M, Liu XH, 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
24. Delorme B, Basire A, Gentile C, Sabatier F, Monsonis F, Desouches C, Blot-Chabaud M, Uzan G, Sampil 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
25. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. Ac133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 1997;90:5002-5012
26. 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
27. Nieda M, Nicol A, Denning-Kendall P, Sweetenham J, Bradley B, Hows J. Endothelial cell precursors are normal components of human umbilical cord blood. *Br J Haematol.* 1997;98:775-777
28. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest.* 2000;105:71-77
29. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999;85:221-228
30. Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Hajjar KA, Manova K, Benezra R, Rafii S. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med.* 2001;7:1194-1201
31. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, Levine JP, Gurtner GC. Human endothelial progenitor cells from type ii diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation.* 2002;106:2781-2786
32. Li B, Sharpe EE, Maupin AB, Teleron AA, Pyle AL, Carmeliet P, Young PP. Vegf and plgf promote adult vasculogenesis by enhancing epc recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *Faseb J.* 2006;20:1495-1497
33. 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;107:1395-1402

34. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2001;103:2776-2779
35. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (topcare-ami). *Circulation*. 2002;106:3009-3017
36. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2003;348:593-600
37. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, Pollok K, Ferkowicz MJ, Gilley D, Yoder MC. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*. 2004;104:2752-2760
38. Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, Krasich R, Temm CJ, Prchal JT, Ingram DA. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*. 2007;109:1801-1809
39. Sieveking DP, Buckle A, Celermajer DS, Ng MK. Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: Insights from a novel human angiogenesis assay. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51:660-668
40. Somani A, Nguyen J, Milbauer LC, Solovey A, Sajja S, Hebbel RP. The establishment of murine blood outgrowth endothelial cells and observations relevant to gene therapy. *Transl Res*. 2007;150:30-39
41. Smadja DM, Bieche I, Silvestre JS, Germain S, Cornet A, Laurendeau I, Duong-Van-Huyen JP, 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*. 2008;28:2137-2143
42. Aranguren XL, Verfaillie CM, Luttun A. Emerging hurdles in stem cell therapy for peripheral vascular disease. *J Mol Med (Berl)*. 2009;87:3-16
43. Kung EF, Wang F, Schechner JS. In vivo perfusion of human skin substitutes with microvessels formed by adult circulating endothelial progenitor cells. *Dermatol Surg*. 2008;34:137-146
44. Fuchs S, Ghanaati S, Orth C, Barbeck M, Kolbe M, Hofmann A, Eblenkamp M, Gomes M, Reis RL, Kirkpatrick CJ. Contribution of outgrowth endothelial cells from human peripheral blood on in vivo vascularization of bone tissue engineered constructs based on starch polycaprolactone scaffolds. *Biomaterials*. 2009;30:526-534
45. Dudek AZ, Bodempudi V, Welsh BW, Jasinski P, Griffin RJ, Milbauer L, Hebbel RP. Systemic inhibition of tumour angiogenesis by endothelial cell-based gene therapy. *Br J Cancer*. 2007;97:513-522
46. Matsui H, Shibata M, Brown B, Labelle A, Hegadorn C, Andrews C, Hebbel RP, Galipeau J, Hough C, Lillicrap D. Ex vivo gene therapy for hemophilia a that enhances safe delivery and sustained in vivo factor viii expression from lentivirally engineered endothelial progenitors. *Stem Cells*. 2007;25:2660-2669
47. Timmermans F, Van Hauwermeiren F, De Smedt M, Raedt R, Plasschaert F, De Buyzere ML, Gillebert TC, 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
48. Liu Y, Dulchavsky DS, Gao X, Kwon D, Chopp M, Dulchavsky S, Gautam SC. Wound repair by bone marrow stromal cells through growth factor production. *J Surg Res*. 2006;136:336-341
49. Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, Oh BH, Lee MM, Park YB. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:288-293
50. Yoon CH, Hur J, Park KW, Kim JH, Lee CS, Oh IY, Kim TY, Cho HJ, Kang HJ, Chae IH, Yang HK, Oh BH, Park YB, Kim HS. 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;112:1618-1627
51. Majka SM, Jackson KA, Kienstra KA, Majesky MW, Goodell MA, Hirschi KK. Distinct progenitor populations in skeletal muscle are bone marrow derived and exhibit different cell fates during vascular regeneration. *J Clin Invest*. 2003;111:71-79
52. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre 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
53. Ingram DA, Mead LE, Moore DB, Woodard W, Fenoglio A, Yoder MC. Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood*. 2005;105:2783-2786
54. 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;5:434-438
55. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Gordon R, Tepper O, Gravereaux E, Pieczek A, Iwaguro H, Hayashi SI, Isner JM, Asahara T. Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ Res*. 2000;86:1198-1202
56. 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;97:3422-3427
57. 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;88:167-174
58. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through hif-1 induction of sdf-1. *Nat Med*. 2004;10:858-864
59. de Nigris F, Balestrieri ML, Williams-Ignarro S, D'Armiento FP, Lerman LO, Byrns R, Crimi E, Palagiano A, Fatigati G, Ignarro LJ, Napoli C. Therapeutic effects of autologous bone marrow cells and metabolic intervention in the ischemic hindlimb of spontaneously hypertensive rats involve reduced cell senescence and cxcr4/akt/enos pathways. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007;50:424-433
60. Takamiya M, Okigaki M, Jin D, Takai S, Nozawa Y, Adachi Y, Urao N, Tateishi K, Nomura T, Zen K, Ashihara E, Miyazaki M, Tatsumi T, Takahashi T, Matsubara H. Granulocyte colony-stimulating factor-mobilized circulating c-kit+/flk-1+ progenitor cells regenerate endothelium and inhibit neointimal hyperplasia after vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:751-757
61. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher AM, Dimmeler S. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med*. 2003;9:1370-1376

62. Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires mmp-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. 2002;109:625-637
63. 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;25:977-988
64. Maeng YS, Choi HJ, Kwon JY, Park YW, Choi KS, Min JK, Kim YH, Suh PG, Kang KS, Won MH, Kim YM, Kwon YG. Endothelial progenitor cell homing: Prominent role of the igf2-igf2r-plcbeta2 axis. *Blood*. 2009;113:233-243
65. Massberg S, Konrad I, Schurzinger K, Lorenz M, Schneider S, Zohlnhoefer D, Hoppe K, Schiemann M, Kennerknecht E, Sauer S, Schulz C, Kerstan S, Rudelius M, Seidl S, Sorge F, Langer H, Peluso M, Goyal P, Vestweber D, Emambokus NR, Busch DH, Frampton J, Gawaz M. Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *J Exp Med*. 2006;203:1221-1233
66. Italiano JE, Jr., Battinelli EM. Selective sorting of alpha-granule proteins. *J Thromb Haemost*. 2009;7 Suppl 1:173-176
67. Chironi G, Walch L, Pernellet MG, Gariepy J, Levenson J, Rendu F, Simon A. Decreased number of circulating cd34+kdrr+ cells in asymptomatic subjects with preclinical atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2007;191:115-120
68. Case J, Mead LE, Bessler WK, Prater D, White HA, Saadatzaeh MR, Bhavsar JR, Yoder MC, Haneline LS, Ingram DA. Human cd34+ac133+vegfr-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Exp Hematol*. 2007;35:1109-1118
69. Prokopi M, Pula G, Mayr U, Devue C, Gallagher J, Xiao Q, Boulanger CM, Westwood N, Urbich C, Willeit J, Steiner M, Breuss J, Xu Q, Kiechl S, Mayr M. Proteomic analysis reveals presence of platelet microparticles in endothelial progenitor cell cultures. *Blood*. 2009;114:723-732
70. Mahnke YD, Roederer M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clin Lab Med*. 2007;27:469-485, v
71. Estes ML, Mund JA, Ingram DA, Case J. Identification of endothelial cells and progenitor cell subsets in human peripheral blood. *Curr Protoc Cytom*. 2010;Chapter 9:Unit 9 33 31-11
72. Mund JA, Estes ML, Yoder MC, Ingram DA, Jr., Case J. Flow cytometric identification and functional characterization of immature and mature circulating endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:1045-1053
73. Duda DG, Cohen KS, Scadden DT, Jain RK. A protocol for phenotypic detection and enumeration of circulating endothelial cells and circulating progenitor cells in human blood. *Nat Protoc*. 2007;2:805-810
74. Estes ML, Mund JA, Mead LE, Prater DN, Cai S, Wang H, Pollok KE, Murphy MP, An CS, Srour EF, Ingram DA, Jr., Case J. Application of polychromatic flow cytometry to identify novel subsets of circulating cells with angiogenic potential. *Cytometry A*. 2010;77:831-839
75. Woywodt A, Blann AD, Kirsch T, Erdbruegger U, Banzet N, Haubitz M, Dignat-George F. Isolation and enumeration of circulating endothelial cells by immunomagnetic isolation: Proposal of a definition and a consensus protocol. *J Thromb Haemost*. 2006;4:671-677
76. Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, Chatterjee S, Shah V, Vile RG, Simari RD. Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Circ Res*. 2003;93:1023-1025
77. 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;107:1164-1169
78. Miller CL, Lai B. Human and mouse hematopoietic colony-forming cell assays. *Methods Mol Biol*. 2005;290:71-89
79. Hur J, Yang HM, Yoon CH, Lee CS, Park KW, Kim JH, Kim TY, Kim JY, Kang HJ, Chae IH, Oh BH, Park YB, Kim HS. Identification of a novel role of t cells in postnatal vasculogenesis: Characterization of endothelial progenitor cell colonies. *Circulation*. 2007;116:1671-1682
80. Zhang SJ, Zhang H, Hou M, Zheng Z, Zhou J, Su W, Wei Y, Hu S. Is it possible to obtain "true endothelial progenitor cells" by in vitro culture of bone marrow mononuclear cells? *Stem Cells Dev*. 2007;16:683-690
81. Davis GE, Senger DR. Endothelial extracellular matrix: Biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res*. 2005;97:1093-1107
82. Powell TM, Paul JD, Hill JM, Thompson M, Benjamin M, Rodrigo M, McCoy JP, Read EJ, Khuu HM, Leitman SF, Finkel T, Cannon RO, 3rd. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:296-301
83. Van Craenenbroeck EM, Conraads VM, Van Bockstaele DR, Haine SE, Vermeulen K, Van Tendeloo VF, Vrints CJ, Hoymans VY. Quantification of circulating endothelial progenitor cells: A methodological comparison of six flow cytometric approaches. *J Immunol Methods*. 2008;332:31-40
84. Povsic TJ, Zavodni KL, Vainorius E, Kherani JF, Goldschmidt-Clermont PJ, Peterson ED. Common endothelial progenitor cell assays identify discrete endothelial progenitor cell populations. *Am Heart J*. 2009;157:335-344
85. Smadja DM, Bieche 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*. 2009;13:2534-2546
86. Yoder MC, Ingram DA. The definition of epcs and other bone marrow cells contributing to neoangiogenesis and tumor growth: Is there common ground for understanding the roles of numerous marrow-derived cells in the neoangiogenic process? *Biochim Biophys Acta*. 2009;1796:50-54
87. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: Characterization and role in vascular biology. *Circ Res*. 2004;95:343-353
88. Heil M, Ziegelhoeffer T, Mees B, Schaper W. A different outlook on the role of bone marrow stem cells in vascular growth: Bone marrow delivers software not hardware. *Circ Res*. 2004;94:573-574
89. Urbich C, Aicher A, Heeschen C, Dernbach E, Hofmann WK, Zeiher AM, Dimmeler S. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;39:733-742
90. Di Santo S, Yang Z, Wyler von Ballmoos M, Voelzmann J, Diehm N, Baumgartner I, Kalka C. Novel cell-free strategy for therapeutic angiogenesis: In vitro generated conditioned medium can replace progenitor cell transplantation. *PLoS One*. 2009;4:e5643
91. Wickersheim A, Kerber M, de Miguel LS, Plate KH, Machein MR. Endothelial progenitor cells do not contribute to tumor endothelium in primary and metastatic tumors. *Int J Cancer*. 2009;125:1771-1777

92. Deb A, Patterson C. Hard luck stories: The reality of endothelial progenitor cells continues to fall short of the promise. *Circulation*. 2010;121:850-852
93. Hagensen MK, Shim J, Falk E, Bentzon JF. Flanking recipient vasculature, not circulating progenitor cells, contributes to endothelium and smooth muscle in murine allograft vasculopathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:808-813
94. Hagensen MK, Raarup MK, Mortensen MB, Thim T, Nyengaard JR, Falk E, Bentzon JF. Circulating endothelial progenitor cells do not contribute to regeneration of endothelium after murine arterial injury. *Cardiovasc Res*. 2012;93:223-231
95. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*. 2001;7:430-436
96. Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, Nishimura H, Yoon YS, Milliken C, Uchida S, Masuo O, Iwaguro H, Ma H, Hanley A, Silver M, Kearney M, Losordo DW, Isner JM, Asahara T. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation*. 2003;107:461-468
97. Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, Mione M, Koyanagi M, Fischer A, Burchfield J, Fox H, Doebele C, Ohtani K, Chavakis E, Potente M, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science*. 2009;324:1710-1713
98. Rajantie I, Ilmonen M, Alminaitte A, Ozerdem U, Alitalo K, Salven P. Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells. *Blood*. 2004;104:2084-2086
99. De Palma M, Venneri MA, Galli R, Sergi L, Politi LS, Sampaolesi M, Naldini L. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell*. 2005;8:211-226
100. Fadini GP, Albiero M, Boscaro E, Agostini C, Avogaro A. Endothelial progenitor cells as resident accessory cells for post-ischemic angiogenesis. *Atherosclerosis*. 2009;204:20-22
101. Ziebart T, Yoon CH, Trepels T, Wietelmann A, Braun T, Kiessling F, Stein S, Grez M, Ihling C, Muhly-Reinholz M, Carmona G, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. Sustained persistence of transplanted proangiogenic cells contributes to neovascularization and cardiac function after ischemia. *Circ Res*. 2008;103:1327-1334
102. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*. 2001;89:E1-7
103. Heiss C, Keymel S, Niesler U, Ziemann J, Kelm M, Kalka C. Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:1441-1448
104. Fadini GP, de Kreuzenberg S, Albiero M, Coracina A, Pagnin E, Baesso I, Cignarella A, Bolego C, Plebani M, Nardelli GB, Sartore S, Agostini C, Avogaro A. Gender differences in endothelial progenitor cells and cardiovascular risk profile: The role of female estrogens. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:997-1004
105. Bulut D, Tuns H, Mugge A. Cd31+/annexin v+ microparticles in healthy offsprings of patients with coronary artery disease. *Eur J Clin Invest*. 2009;39:17-22
106. Humpert PM, Neuwirth R, Battista MJ, Voronko O, von Eynatten M, Konrade I, Rudofsky G, Jr., Wendt T, Hamann A, Morcos M, Nawroth PP, Bierhaus A. Sdf-1 genotype influences insulin-dependent mobilization of adult progenitor cells in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2005;28:934-936
107. Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, Numaguchi Y, Kobayashi K, Iino S, Inden Y, Murohara T. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1442-1447
108. Di Stefano R, Barsotti MC, Felice F, Magera A, Lekakis J, Leone A, Balbarini A. Smoking and endothelial progenitor cells: A revision of literature. *Curr Pharm Des*. 2010;16:2559-2566
109. Ludwig A, Jochmann N, Kertesz A, Kuhn C, Mueller S, Gericke C, Baumann G, Stangl K, Stangl V. Smoking decreases the level of circulating cd34+ progenitor cells in young healthy women--a pilot study. *BMC Womens Health*. 2010;10:20
110. Yue WS, Wang M, Yan GH, Yiu KH, Yin L, Lee SW, Siu CW, Tse HF. Smoking is associated with depletion of circulating endothelial progenitor cells and elevated pulmonary artery systolic pressure in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 2010;106:1248-1254
111. Michaud SE, Dussault S, Haddad P, Groleau J, Rivard A. Circulating endothelial progenitor cells from healthy smokers exhibit impaired functional activities. *Atherosclerosis*. 2006;187:423-432
112. Pirro M, Schillaci G, Menecali C, Bagaglia F, Paltriccia R, Vaudo G, Mannarino MR, Mannarino E. Reduced number of circulating endothelial progenitors and hoxa9 expression in cd34+ cells of hypertensive patients. *J Hypertens*. 2007;25:2093-2099
113. Oliveras A, Soler MJ, Martinez-Estrada OM, Vazquez S, Marco-Feliu D, Vila JS, Vilaro S, Lloveras J. Endothelial progenitor cells are reduced in refractory hypertension. *J Hum Hypertens*. 2008;22:183-190
114. Umemura T, Soga J, Hidaka T, Takemoto H, Nakamura S, Jitsuiki D, Nishioka K, Goto C, Teragawa H, Yoshizumi M, Chayama K, Higashi Y. Aging and hypertension are independent risk factors for reduced number of circulating endothelial progenitor cells. *Am J Hypertens*. 2008;21:1203-1209
115. Giannotti G, Doerries C, Mocharla PS, Mueller MF, Bahlmann FH, Horvath T, Jiang H, Sorrentino SA, Steenken N, Manes C, Marzilli M, Rudolph KL, Luscher TF, Drexler H, Landmesser U. Impaired endothelial repair capacity of early endothelial progenitor cells in prehypertension: Relation to endothelial dysfunction. *Hypertension*. 2010;55:1389-1397
116. Delva P, Degan M, Vallerio P, Arosio E, Minuz P, Amen G, Di Chio M, Lechi A. Endothelial progenitor cells in patients with essential hypertension. *J Hypertens*. 2007;25:127-132
117. Yang Z, Chen L, Su C, Xia WH, Wang Y, Wang JM, Chen F, Zhang YY, Wu F, Xu SY, Zhang XL, Tao J. Impaired endothelial progenitor cell activity is associated with reduced arterial elasticity in patients with essential hypertension. *Clin Exp Hypertens*. 2010;32:444-452
118. Lee CW, Huang PH, Huang SS, Leu HB, Huang CC, Wu TC, Chen JW, Lin SJ. Decreased circulating endothelial progenitor cell levels and function in essential hypertensive patients with electrocardiographic left ventricular hypertrophy. *Hypertens Res*. 2011;34:999-1003
119. Chen JZ, Zhang FR, Tao QM, Wang XX, Zhu JH. Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)*. 2004;107:273-280
120. Rossi F, Bertone C, Montanile F, Miglietta F, Lubrano C, Gandini L, Santemma V. Hdl cholesterol is a strong determinant of endothelial progenitor cells in hypercholesterolemic subjects. *Microvasc Res*. 2010;80:274-279

121. Muller-Ehmsen J, Braun D, Schneider T, Pfister R, Worm N, Wielckens K, Scheid C, Frommolt P, Fleisch M. Decreased number of circulating progenitor cells in obesity: Beneficial effects of weight reduction. *Eur Heart J*. 2008;29:1560-1568
122. Heida NM, Muller JP, Cheng IF, Leifheit-Nestler M, Faustini V, Riggert J, Hasenfuss G, Konstantinides S, Schafer K. Effects of obesity and weight loss on the functional properties of early outgrowth endothelial progenitor cells. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55:357-367
123. Tobler K, Freudenthaler A, Baumgartner-Parzer SM, Wolzt M, Ludvik B, Nansalmaa E, Nowotny PJ, Seidinger D, Steiner S, Luger A, Artwohl M. Reduction of both number and proliferative activity of human endothelial progenitor cells in obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2010;34:687-700
124. Egan CG, Lavery R, Caporali F, Fondelli C, Laghi-Pasini F, Dotta F, Sorrentino V. Generalised reduction of putative endothelial progenitors and cxcr4-positive peripheral blood cells in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2008;51:1296-1305
125. Fadini GP, Miorin M, Facco M, Bonamico S, Baesso I, Grego F, Menegolo M, de Kreutzenberg SV, Tiengo A, Agostini C, Avogaro A. Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:1449-1457
126. Fadini GP, Pucci L, Vanacore R, Baesso I, Penno G, Balbarini A, Di Stefano R, Miccoli R, de Kreutzenberg S, Coracina A, Tiengo A, Agostini C, Del Prato S, Avogaro A. Glucose tolerance is negatively associated with circulating progenitor cell levels. *Diabetologia*. 2007;50:2156-2163
127. Loomans CJ, de Koning EJ, Staal FJ, Rookmaaker MB, Verseyden C, de Boer HC, Verhaar MC, Braam B, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ. Endothelial progenitor cell dysfunction: A novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes*. 2004;53:195-199
128. Seeger FH, Haendeler J, Walter DH, Rochwalsky U, Reinhold J, Urbich C, Rossig L, Corbaz A, Chvatchko Y, Zeiher AM, Dimmeler S. P38 mitogen-activated protein kinase downregulates endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2005;111:1184-1191
129. Zhu J, Wang X, Chen J, Sun J, Zhang F. Reduced number and activity of circulating endothelial progenitor cells from patients with hyperhomocysteinemia. *Arch Med Res*. 2006;37:484-489
130. Makino H, Okada S, Nagumo A, Sugisawa T, Miyamoto Y, Kishimoto I, Kikuchi-Taura A, Soma T, Taguchi A, Yoshimasa Y. Decreased circulating cd34+ cells are associated with progression of diabetic nephropathy. *Diabet Med*. 2009;26:171-173
131. George J, Goldstein E, Abashidze S, Deutsch V, Shmilovich H, Finkelstein A, Herz I, Miller H, Keren G. Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina: Association with systemic inflammation. *Eur Heart J*. 2004;25:1003-1008
132. Dei Cas A, Spigoni V, Ardigo D, Pedrazzi G, Franzini L, Derlindati E, Urbani S, Monti L, Gnudi L, Zavaroni I. Reduced circulating endothelial progenitor cell number in healthy young adult hyperinsulinemic men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2011;21:512-517
133. Fadini GP, Agostini C, Boscaro E, Avogaro A. Mechanisms and significance of progenitor cell reduction in the metabolic syndrome. *Metab Syndr Relat Disord*. 2009;7:5-10
134. Bahlmann FH, de Groot K, Mueller O, Hertel B, Haller H, Fliser D. Stimulation of endothelial progenitor cells: A new putative therapeutic effect of angiotensin ii receptor antagonists. *Hypertension*. 2005;45:526-529
135. Benndorf RA, Gehling UM, Appel D, Maas R, Schwedhelm E, Schlagner K, Silberhorn E, Hossfeld DK, Rogiers X, Boger R. Mobilization of putative high-proliferative-potential endothelial colony-forming cells during antihypertensive treatment in patients with essential hypertension. *Stem Cells Dev*. 2007;16:329-338
136. Krankel N, Adams V, Linke A, Gielen S, Erbs S, Lenk K, Schuler G, Hambrecht R. Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:698-703
137. Tamarat R, Silvestre JS, Le Ricousse-Roussanne S, Barateau V, Lecomte-Raclet L, Clergue M, Duriez M, Tobelem G, Levy BI. Impairment in ischemia-induced neovascularization in diabetes: Bone marrow mononuclear cell dysfunction and therapeutic potential of placenta growth factor treatment. *Am J Pathol*. 2004;164:457-466
138. Lombardo MF, Iacopino P, Cuzzola M, Spiniello E, Garreffa C, Ferrelli F, Coppola A, Saccardi R, Piaggese A, Piro R, Mannino D, Grossi G, Lauro D, Irrera G. Type 2 diabetes mellitus impairs the maturation of endothelial progenitor cells and increases the number of circulating endothelial cells in peripheral blood. *Cytometry A*. 2012
139. Fadini GP, de Kreutzenberg SV, Mariano V, Boscaro E, Bertolini F, Mancuso P, Quarna J, Marescotti M, Agostini C, Tiengo A, Avogaro A. Optimized glycaemic control achieved with add-on basal insulin therapy improves indexes of endothelial damage and regeneration in type 2 diabetic patients with macroangiopathy: A randomized crossover trial comparing detemir versus glargine. *Diabetes Obes Metab*. 2011;13:718-725
140. Fadini GP, Avogaro A. Potential manipulation of endothelial progenitor cells in diabetes and its complications. *Diabetes Obes Metab*. 2010;12:570-583
141. Imanishi T, Hano T, Matsuo Y, Nishio I. Oxidized low-density lipoprotein inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial progenitor cell differentiation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003;30:665-670
142. Imanishi T, Hano T, Sawamura T, Nishio I. Oxidized low-density lipoprotein induces endothelial progenitor cell senescence, leading to cellular dysfunction. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2004;31:407-413
143. Wang X, Chen J, Tao Q, Zhu J, Shang Y. Effects of ox-Ldl on number and activity of circulating endothelial progenitor cells. *Drug Chem Toxicol*. 2004;27:243-255
144. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, Rutten H, Fichtlscherer S, Martin H, Zeiher AM. Hmg-coa reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the pi 3-kinase/akt pathway. *J Clin Invest*. 2001;108:391-397
145. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation*. 2001;103:2885-2890
146. Noor R, Shuaib U, Wang CX, Todd K, Ghani U, Schwindt B, Shuaib A. High-density lipoprotein cholesterol regulates endothelial progenitor cells by increasing enos and preventing apoptosis. *Atherosclerosis*. 2006
147. Petoumenos V, Nickenig G, Werner N. High-density lipoprotein exerts vasculoprotection via endothelial progenitor cells. *J Cell Mol Med*. 2009;13:4623-4635
148. Ramunni A, Brescia P, Dambra P, Capuzzimati L, Ria R, De Tullio G, Resta F, Russi G, Vacca A, Coratelli P. Effect of low-density lipoprotein apheresis on circulating endothelial progenitor cells in familial hypercholesterolemia. *Blood Purif*. 2010;29:383-389
149. Wang X, Zhu J, Chen J, Shang Y. Effects of nicotine on the number and activity of circulating endothelial progenitor cells. *J Clin Pharmacol*. 2004;44:881-889

150. Sugimoto A, Masuda H, Eguchi M, Iwaguro H, Tanabe T, Asahara T. Nicotine enlivenment of blood flow recovery following endothelial progenitor cell transplantation into ischemic hindlimb. *Stem Cells Dev.* 2007;16:649-656
151. 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
152. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jurgens K, Miche E, Bohm M, Nickenig G. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation.* 2004;109:220-226
153. Sandri M, Adams V, Gielen S, Linke A, Lenk K, Krankel N, Lenz D, Erbs S, Scheinert D, Mohr FW, Schuler G, Hambrecht R. Effects of exercise and ischemia on mobilization and functional activation of blood-derived progenitor cells in patients with ischemic syndromes: Results of 3 randomized studies. *Circulation.* 2005;111:3391-3399
154. Laufs U, Urhausen A, Werner N, Scharhag J, Heitz A, Kissner G, Bohm M, Kindermann W, Nickenig G. Running exercise of different duration and intensity: Effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2005;12:407-414
155. Shaffer RG, Greene S, Arshi A, Supple G, Bantly A, Moore JS, Parmacek MS, Mohler ER, 3rd. Effect of acute exercise on endothelial progenitor cells in patients with peripheral arterial disease. *Vasc Med.* 2006;11:219-226
156. Schlager O, Giurgea A, Schuhfried O, Seidinger D, Hammer A, Groger M, Fialka-Moser V, Gschwandtner M, Koppensteiner R, Steiner S. Exercise training increases endothelial progenitor cells and decreases asymmetric dimethylarginine in peripheral arterial disease: A randomized controlled trial. *Atherosclerosis.* 2011;217:240-248
157. Luk TH, Dai YL, Siu CW, Yiu KH, Chan HT, Lee SW, Li SW, Fong B, Wong WK, Tam S, Lau CP, Tse HF. Effect of exercise training on vascular endothelial function in patients with stable coronary artery disease: A randomized controlled trial. *Eur J Prev Cardiol.* 2012;19:830-839
158. Chen JZ, Zhu JH, Wang XX, Xie XD, Sun J, Shang YP, Guo XG, Dai HM, Hu SJ. Effects of homocysteine on number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;36:233-239
159. Suh W, Kim KL, Choi JH, Lee YS, Lee JY, Kim JM, Jang HS, Shin IS, Lee JS, Byun J, Jeon ES, Kim DK. C-reactive protein impairs angiogenic functions and decreases the secretion of arteriogenic chemo-cytokines in human endothelial progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;321:65-71
160. Verma S, Kuliszewski MA, Li SH, Szmilko PE, Zucco L, Wang CH, Badiwala MV, Mickle DA, Weisel RD, Fedak PW, Stewart DJ, Kutryk MJ. C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: Further evidence of a mechanistic link between c-reactive protein and cardiovascular disease. *Circulation.* 2004;109:2058-2067
161. Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, Laufs K, Ghaeni L, Milosevic M, Bohm M, Nickenig G. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation.* 2003;107:3059-3065
162. Shaffer RG, Greene S, Arshi A, Supple G, Bantly A, Moore JS, Mohler ER, 3rd. Flow cytometric measurement of circulating endothelial cells: The effect of age and peripheral arterial disease on baseline levels of mature and progenitor populations. *Cytometry B Clin Cytom.* 2006;70:56-62
163. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 1983;219:983-985
164. Cheng SY, Nagane M, Huang HS, Cavenee WK. Intracerebral tumor-associated hemorrhage caused by overexpression of the vascular endothelial growth factor isoforms vegf121 and vegf165 but not vegf189. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:12081-12087
165. Senger DR, Ledbetter SR, Claffey KP, Papadopoulos-Sergiou A, Peruzzi CA, Detmar M. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the alphavbeta3 integrin, osteopontin, and thrombin. *Am J Pathol.* 1996;149:293-305
166. Savona C, Javerzat S, Perollet C, Bikfalvi A. [angiogenesis and neoangiogenesis]. *Rev Prat.* 1997;47:2239-2243
167. Bauters C, Asahara T, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Physiological assessment of augmented vascularity induced by vegf in ischemic rabbit hindlimb. *Am J Physiol.* 1994;267:H1263-1271
168. Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med.* 1995;1:1024-1028
169. Mattot V, Moons L, Lupu F, Chernavvsky D, Gomez RA, Collen D, Carmeliet P. Loss of the vegf(164) and vegf(188) isoforms impairs postnatal glomerular angiogenesis and renal arteriogenesis in mice. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:1548-1560
170. Ladoux A, Frelin C. Hypoxia is a strong inducer of vascular endothelial growth factor mrna expression in the heart. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;195:1005-1010
171. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshet E. Role of hif-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature.* 1998;394:485-490
172. Gleadow JM, Ratcliffe PJ. Induction of hypoxia-inducible factor-1, erythropoietin, vascular endothelial growth factor, and glucose transporter-1 by hypoxia: Evidence against a regulatory role for src kinase. *Blood.* 1997;89:503-509
173. Maxwell PH, Dachs GU, Gleadow JM, Nicholls LG, Harris AL, Stratford IJ, Hankinson O, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:8104-8109
174. Couffinhal T, Silver M, Zheng LP, Kearney M, Witzensbichler B, Isner JM. Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol.* 1998;152:1667-1679
175. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med.* 1994;331:1480-1487
176. Weinstat-Saslow D, Steeg PS. Angiogenesis and colonization in the tumor metastatic process: Basic and applied advances. *Faseb J.* 1994;8:401-407
177. Dragoni S, Laforenza U, Bonetti E, Lodola F, Bottino C, Berra-Romani R, Carlo Bongio G, Cinelli MP, Guerra G, Pedrazzoli P, Rosti V, Tanzi F, Moccia F. Vascular endothelial growth factor stimulates endothelial colony forming cells proliferation and tubulogenesis by inducing oscillations in intracellular ca2+ concentration. *Stem Cells.* 2011;29:1898-1907
178. Yang L, Guan H, He J, Zeng L, Yuan Z, Xu M, Zhang W, Wu X, Guan J. Vegf increases the proliferative capacity and enos/no levels of endothelial progenitor cells through the calcineurin/nfat signalling pathway. *Cell Biol Int.* 2012;36:21-27

179. Smadja DM, Bieche 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.* 2007;11:1149-1161
180. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* 1997;18:4-25
181. Kearney JB, Ambler CA, Monaco KA, Johnson N, Rapoport RG, Bautch VL. Vascular endothelial growth factor receptor flt-1 negatively regulates developmental blood vessel formation by modulating endothelial cell division. *Blood.* 2002;99:2397-2407
182. Fong GH, Zhang L, Bryce DM, Peng J. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development.* 1999;126:3015-3025
183. Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:9349-9354
184. Hiratsuka S, Maru Y, Okada A, Seiki M, Noda T, Shibuya M. Involvement of flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis. *Cancer Res.* 2001;61:1207-1213
185. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenzi V, Compernelle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, Scholz D, Acker T, DiPalma T, Dewerchin M, Noel A, Stalmans I, Barra A, Blacher S, Vandendriessche T, Ponten A, Eriksson U, Plate KH, Foidart JM, Schaper W, Charnock-Jones DS, Hicklin DJ, Herbert JM, Collen D, Persico MG. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med.* 2001;7:575-583
186. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (vegf) is mediated via the vegf receptor flt-1. *Blood.* 1996;87:3336-3343
187. Zachary I, Gliki G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res.* 2001;49:568-581
188. Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M. A single autophosphorylation site on kdr/flk-1 is essential for vegf-a-dependent activation of plc-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *Embo J.* 2001;20:2768-2778
189. van Nieuw Amerongen GP, Koolwijk P, Versteilen A, van Hinsbergh VW. Involvement of rhoa/rho kinase signaling in vegf-induced endothelial cell migration and angiogenesis in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:211-217
190. Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, Breitman M, Alitalo K. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in vegf receptor-3. *Science.* 1998;282:946-949
191. Salven P, Mustjoki S, Alitalo R, Alitalo K, Rafii S. Vegfr-3 and cd133 identify a population of cd34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells. *Blood.* 2003;101:168-172
192. Klagsbrun M, Eichmann A. A role for axon guidance receptors and ligands in blood vessel development and tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16:535-548
193. Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y, Matsuda Y, Sanbo M, Yagi T, Fujisawa H. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development.* 1999;126:4895-4902
194. Yuan L, Moyon D, Pardanaud L, Breant C, Karkkainen MJ, Alitalo K, Eichmann A. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development.* 2002;129:4797-4806
195. Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature.* 2000;408:92-96
196. Yamamizu K, Kawasaki K, Katayama S, Watabe T, Yamashita JK. Enhancement of vascular progenitor potential by protein kinase a through dual induction of flk-1 and neuropilin-1. *Blood.* 2009;114:3707-3716
197. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the tie2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell.* 1996;87:1161-1169
198. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the tie2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell.* 1996;87:1171-1180
199. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science.* 1997;277:55-60
200. Witzensbichler B, Maisonpierre PC, Jones P, Yancopoulos GD, Isner JM. Chemotactic properties of angiopoietin-1 and -2, ligands for the endothelial-specific receptor tyrosine kinase tie2. *J Biol Chem.* 1998;273:18514-18521
201. Patan S. Tie1 and tie2 receptor tyrosine kinases inversely regulate embryonic angiogenesis by the mechanism of intussusceptive microvascular growth. *Microvasc Res.* 1998;56:1-21
202. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J Neurooncol.* 2000;50:1-15
203. Gill KA, Brindle NP. Angiopoietin-2 stimulates migration of endothelial progenitors and their interaction with endothelium. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;336:392-396
204. Kim KL, Shin IS, Kim JM, Choi JH, Byun J, Jeon ES, Suh W, Kim DK. Interaction between tie receptors modulates angiogenic activity of angiopoietin2 in endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res.* 2006;72:394-402
205. Smadja DM, 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.* 2006;4:2051-2058
206. Kebir A, Harhour K, Guillet B, Liu JW, Foucault-Bertaud A, Lamy E, Kaspi E, Elganfoud N, Vely F, Sabatier F, Sampol J, Pisano P, Kruthof EK, Bardin N, Dignat-George F, Blot-Chaubaud M. Cd146 short isoform increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells in vitro and in vivo. *Circ Res.* 2010;107:66-75
207. Lapidot T, Kollet O. The essential roles of the chemokine sdf-1 and its receptor cxcr4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient nod/scid and nod/scid/b2m(null) mice. *Leukemia.* 2002;16:1992-2003
208. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T. Defects of b-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the cxc chemokine pbsf/sdf-1. *Nature.* 1996;382:635-638
209. Nagasawa T, Nakajima T, Tachibana K, Iizasa H, Bleul CC, Yoshie O, Matsushima K, Yoshida N, Springer TA, Kishimoto T. Molecular cloning and characterization of a murine pre-b-cell growth-stimulating factor/stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:14726-14729

210. Mohle R, Bautz F, Rafii S, Moore MA, Brugger W, Kanz L. Regulation of transendothelial migration of hematopoietic progenitor cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;872:176-185; discussion 185-176
211. Burger JA, Kipps TJ. Cxcr4: A key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood.* 2006;107:1761-1767
212. Lapidot T. Mechanism of human stem cell migration and repopulation of nod/scid and b2mnull nod/scid mice. The role of sdf-1/cxcr4 interactions. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;938:83-95
213. Salvucci O, Yao L, Villalba S, Sajewicz A, Pittaluga S, Tosato G. Regulation of endothelial cell branching morphogenesis by endogenous chemokine stromal-derived factor-1. *Blood.* 2002;99:2703-2711
214. Dar A, Kollet O, Lapidot T. Mutual, reciprocal sdf-1/cxcr4 interactions between hematopoietic and bone marrow stromal cells regulate human stem cell migration and development in nod/scid chimeric mice. *Exp Hematol.* 2006;34:967-975
215. 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
216. Verani A, Lusso P. Chemokines as natural hiv antagonists. *Curr Mol Med.* 2002;2:691-702
217. Smadja DM, Bieche 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. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:2321-2327
218. Maciag T, Mehlman T, Friesel R, Schreiber AB. Heparin binds endothelial cell growth factor, the principal endothelial cell mitogen in bovine brain. *Science.* 1984;225:932-935
219. Shing Y, Folkman J, Sullivan R, Butterfield C, Murray J, Klagsbrun M. Heparin affinity: Purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science.* 1984;223:1296-1299
220. Cross MJ, Claesson-Welsh L. Fgf and vegf function in angiogenesis: Signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci.* 2001;22:201-207
221. Walgenbach KJ, Gratas C, Shestak KC, Becker D. Ischaemia-induced expression of bfgf in normal skeletal muscle: A potential paracrine mechanism for mediating angiogenesis in ischaemic skeletal muscle. *Nat Med.* 1995;1:453-459
222. Brogi E, Wu T, Namiki A, Isner JM. Indirect angiogenic cytokines upregulate vegf and bfgf gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates vegf expression only. *Circulation.* 1994;90:649-652
223. Pepper MS, Belin D, Montesano R, Orci L, Vassalli JD. Transforming growth factor-beta 1 modulates basic fibroblast growth factor-induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells in vitro. *J Cell Biol.* 1990;111:743-755
224. Ishibashi H, Shiratuchi T, Nakagawa K, Onimaru M, Sugiura T, Sueishi K, Shirasuna K. Hypoxia-induced angiogenesis of cultured human salivary gland carcinoma cells enhances vascular endothelial growth factor production and basic fibroblast growth factor release. *Oral Oncol.* 2001;37:77-83
225. Zemani F, Benisvy D, Galy-Fauroux I, Lokajczyk A, Collic-Jouault S, Uzan G, Fischer AM, Boisson-Vidal C. Low-molecular-weight fucoidan enhances the proangiogenic phenotype of endothelial progenitor cells. *Biochem Pharmacol.* 2005;70:1167-1175
226. Dodelet VC, Pasquale EB. Eph receptors and ephrin ligands: Embryogenesis to tumorigenesis. *Oncogene.* 2000;19:5614-5619
227. Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-b2 and its receptor eph-b4. *Cell.* 1998;93:741-753
228. Adams RH, Wilkinson GA, Weiss C, Diella F, Gale NW, Deutsch U, Risau W, Klein R. Roles of ephrinb ligands and ephb receptors in cardiovascular development: Demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev.* 1999;13:295-306
229. Gerety SS, Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. Symmetrical mutant phenotypes of the receptor ephb4 and its specific transmembrane ligand ephrin-b2 in cardiovascular development. *Mol Cell.* 1999;4:403-414
230. Davy A, Soriano P. Ephrin signaling in vivo: Look both ways. *Dev Dyn.* 2005;232:1-10
231. Foubert P, Silvestre JS, Souttou B, Barateau V, Martin C, Ebrahimian TG, Lere-Dean C, Contreres JO, Sulpice E, Levy BI, Plouet J, Tobelem G, Le Ricousse-Roussanne S. Psgl-1-mediated activation of ephb4 increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells. *J Clin Invest.* 2007;117:1527-1537
232. Henrich D, Hahn P, Wahl M, Wilhelm K, Dernbach E, Dimmeler S, Marzi I. Serum derived from multiple trauma patients promotes the differentiation of endothelial progenitor cells in vitro: Possible role of transforming growth factor-beta1 and vascular endothelial growth factor165. *Shock.* 2004;21:13-16
233. Sales VL, Engelmayr GC, Jr., Mettler BA, Johnson JA, Jr., Sacks MS, Mayer JE, Jr. Transforming growth factor-beta1 modulates extracellular matrix production, proliferation, and apoptosis of endothelial progenitor cells in tissue-engineering scaffolds. *Circulation.* 2006;114:193-199
234. Imamura H, Ohta T, Tsunetoshi K, Doi K, Nozaki K, Takagi Y, Kikuta K. Transdifferentiation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into the smooth muscle cell lineage mediated by transforming growth factor-beta1. *Atherosclerosis.* 2010;211:114-121
235. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:9267-9271
236. Hauser S, Weich HA. A heparin-binding form of placenta growth factor (plgf-2) is expressed in human umbilical vein endothelial cells and in placenta. *Growth Factors.* 1993;9:259-268
237. Iwama H, Uemura S, Naya N, Imagawa K, Takemoto Y, Asai O, Onoue K, Okayama S, Somekawa S, Kida Y, Takeda Y, Nakatani K, Takaoka M, Kawata H, Horii M, Nakajima T, Doi N, Saito Y. Cardiac expression of placental growth factor predicts the improvement of chronic phase left ventricular function in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47:1559-1567
238. Takeda Y, Uemura S, Iwama H, Imagawa K, Nishida T, Onoue K, Takemoto Y, Soeda T, Okayama S, Somekawa S, Ishigami K, Takaoka M, Kawata H, Kubo A, Horii M, Nakajima T, Saito Y. Treatment with recombinant placental growth factor (plgf) enhances both angiogenesis and arteriogenesis and improves survival after myocardial infarction. *Circ J.* 2009;73:1674-1682
239. Dubois C, Liu X, Claus P, Marsboom G, Pokreisz P, Vandewijngaert S, Depelteau H, Streb W, Chaothawee L, Maes F, Gheysens O, Debyser Z, Gillijns H, Pellens M, Vandendriessche T, Chuah M, Collen D, Verbeken E, Belmans A, Van de Werf F, Bogaert J, Janssens S. Differential effects of progenitor cell populations on left ventricular remodeling and myocardial neovascularization after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55:2232-2243

240. Hendrickx B, Verdonck K, Van den Berge S, Dickens S, Eriksson E, Vranckx JJ, Luttun A. Integration of blood outgrowth endothelial cells in dermal fibroblast sheets promotes full thickness wound healing. *Stem Cells*. 2010;28:1165-1177
241. Raida M, Heymann AC, Gunther C, Niederwieser D. Role of bone morphogenetic protein 2 in the crosstalk between endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells. *Int J Mol Med*. 2006;18:735-739
242. Ikeda T, Sun L, Tsuruoka N, Ishigaki Y, Yoshitomi Y, Yoshitake Y, Yonekura H. Hypoxia down-regulates sflt-1 (svegr-1) expression in human microvascular endothelial cells by a mechanism involving mrna alternative processing. *Biochem J*. 2011;436:399-407
243. Kaza E, Ablasser K, Poutias D, Griffiths ER, Saad FA, Hofstaetter JG, del Nido PJ, Friehs I. Up-regulation of soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 prevents angiogenesis in hypertrophied myocardium. *Cardiovasc Res*. 2011;89:410-418
244. Roda JM, Sumner LA, Evans R, Phillips GS, Marsh CB, Eubank TD. Hypoxia-inducible factor-2alpha regulates gm-csf-derived soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 production from macrophages and inhibits tumor growth and angiogenesis. *J Immunol*. 2011;187:1970-1976
245. Gagnon ML, Bielenberg DR, Gechtman Z, Miao HQ, Takashima S, Soker S, Klagsbrun M. Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: In vivo expression and antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:2573-2578
246. Mamluk R, Klagsbrun M, Detmar M, Bielenberg DR. Soluble neuropilin targeted to the skin inhibits vascular permeability. *Angiogenesis*. 2005;8:217-227
247. Tombran-Tink J, Chader GG, Johnson LV. Pedf: A pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. *Exp Eye Res*. 1991;53:411-414
248. Becerra SP. Structure-function studies on pedf. A noninhibitory serpin with neurotrophic activity. *Adv Exp Med Biol*. 1997;425:223-237
249. Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W, Bouck NP. Pigment epithelium-derived factor: A potent inhibitor of angiogenesis. *Science*. 1999;285:245-248
250. Ek ET, Dass CR, Choong PF. Pedf: A potential molecular therapeutic target with multiple anti-cancer activities. *Trends Mol Med*. 2006;12:497-502
251. Mori K, Duh E, Gehlbach P, Ando A, Takahashi K, Pearlman J, Yang HS, Zack DJ, Etyreddy D, Brough DE, Wei LL, Campochiaro PA. Pigment epithelium-derived factor inhibits retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol*. 2001;188:253-263
252. Stellmach V, Crawford SE, Zhou W, Bouck N. Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:2593-2597
253. Wang SH, Lin SJ, Chen YH, Lin FY, Shih JC, Wu CC, Wu HL, Chen YL. Late outgrowth endothelial cells derived from wharton jelly in human umbilical cord reduce neointimal formation after vascular injury: Involvement of pigment epithelium-derived factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:816-822
254. Longeras R, Farjo K, Ilnat M, Ma JX. A pedf-derived peptide inhibits retinal neovascularization and blocks mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Exp Diabetes Res*. 2012;2012:518426
255. Li M, Takenaka H, Asai J, Ibusuki K, Mizukami Y, Maruyama K, Yoon YS, Wecker A, Luedemann C, Eaton E, Silver M, Thorne T, Losordo DW. Endothelial progenitor thrombospondin-1 mediates diabetes-induced delay in reendothelialization following arterial injury. *Circ Res*. 2006;98:697-704
256. Yamamoto K, Kondo T, Suzuki S, Izawa H, Kobayashi M, Emi N, Komori K, Naoe T, Takamatsu J, Murohara T. Molecular evaluation of endothelial progenitor cells in patients with ischemic limbs: Therapeutic effect by stem cell transplantation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:e192-196
257. Werner N, Nickenig G. Influence of cardiovascular risk factors on endothelial progenitor cells: Limitations for therapy? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:257-266
258. Duong Van Huyen JP, Smadja DM, Bruneval P, Gaussem P, Dal-Cortivo L, Julia P, Fiessinger JN, 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
259. Renzoni EA, Walsh DA, Salmon M, Wells AU, Sestini P, Nicholson AG, Veeraghavan S, Bishop AE, Romanska HM, Pantelidis P, Black CM, Du Bois RM. Interstitial vascularity in fibrosing alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167:438-443
260. Ebina M, Shimizukawa M, Shibata N, Kimura Y, Suzuki T, Endo M, Sasano H, Kondo T, Nukiwa T. Heterogeneous increase in cd34-positive alveolar capillaries in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169:1203-1208
261. Tachihara A, Jin E, Matsuoka T, Ghazizadeh M, Yoshino S, Takemura T, W DT, Kawanami O. Critical roles of capillary endothelial cells for alveolar remodeling in nonspecific and usual interstitial pneumonias. *J Nippon Med Sch*. 2006;73:203-213
262. Fadini GP, Schiavon M, Rea F, Avogaro A, Agostini C. Depletion of endothelial progenitor cells may link pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176:724-725; author reply 725
263. Smadja DM, Mauge L, Nunes H, d'Audigier C, Juvin K, Borie R, Carton Z, Bertil S, Blanchard A, Crestani B, Valeyre D, Gaussem P, Israel-Biet D. Imbalance of circulating endothelial cells and progenitors in idiopathic pulmonary fibrosis. *Angiogenesis*. 2013;16:147-157
264. Malli F, Koutsokera A, Paraskeva E, Zakyntinos E, Papagianni M, Makris D, Tsilioni I, Molyvdas PA, Gourgoulianis KI, Daniil Z. Endothelial progenitor cells in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis: An evolving concept. *PLoS One*. 2013;8:e53658
265. Selman M, Pardo A, Kaminski N. Idiopathic pulmonary fibrosis: Aberrant recapitulation of developmental programs? *PLoS Med*. 2008;5:e62
266. Hislop AA. Airway and blood vessel interaction during lung development. *J Anat*. 2002;201:325-334
267. Hall SM, Hislop AA, Haworth SG. Origin, differentiation, and maturation of human pulmonary veins. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;26:333-340
268. Hall SM, Hislop AA, Pierce CM, Haworth SG. Prenatal origins of human intrapulmonary arteries: Formation and smooth muscle maturation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000;23:194-203
269. Hislop A, Reid L. Fetal and childhood development of the intrapulmonary veins in man--branching pattern and structure. *Thorax*. 1973;28:313-319
270. Hislop A, Reid L. Intra-pulmonary arterial development during fetal life-branching pattern and structure. *J Anat*. 1972;113:35-48

271. deMello DE, Sawyer D, Galvin N, Reid LM. Early fetal development of lung vasculature. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997;16:568-581
272. Shifren JL, Doldi N, Ferrara N, Mesiano S, Jaffe RB. In the human fetus, vascular endothelial growth factor is expressed in epithelial cells and myocytes, but not vascular endothelium: Implications for mode of action. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;79:316-322
273. Acarregui MJ, Penisten ST, Goss KL, Ramirez K, Snyder JM. Vascular endothelial growth factor gene expression in human fetal lung in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999;20:14-23
274. Healy AM, Morgenthau L, Zhu X, Farber HW, Cardoso WV. Vegf is deposited in the subepithelial matrix at the leading edge of branching airways and stimulates neovascularization in the murine embryonic lung. *Dev Dyn.* 2000;219:341-352
275. Ng YS, Rohan R, Sunday ME, Demello DE, D'Amore PA. Differential expression of vegf isoforms in mouse during development and in the adult. *Dev Dyn.* 2001;220:112-121
276. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in flk-1-deficient mice. *Nature.* 1995;376:62-66
277. Jakkula M, Le Cras TD, Gebb S, Hirth KP, Tudor RM, Voelkel NF, Abman SH. Inhibition of angiogenesis decreases alveolarization in the developing rat lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;279:L600-607
278. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W, Qin Y. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases tie-1 and tie-2 in blood vessel formation. *Nature.* 1995;376:70-74
279. Zeng X, Gray M, Stahlman MT, Whitsett JA. Tgf-beta1 perturbs vascular development and inhibits epithelial differentiation in fetal lung in vivo. *Dev Dyn.* 2001;221:289-301
280. Folkman J, D'Amore PA. Blood vessel formation: What is its molecular basis? *Cell.* 1996;87:1153-1155
281. Arciniegas E, Neves CY, Carrillo LM, Zambrano EA, Ramirez R. Endothelial-mesenchymal transition occurs during embryonic pulmonary artery development. *Endothelium.* 2005;12:193-200
282. American thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. This joint statement of the american thoracic society (ats), and the european respiratory society (ers) was adopted by the ats board of directors, june 2001 and by the ers executive committee, june 2001. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:277-304
283. Coultas DB, Zumwalt RE, Black WC, Sobonya RE. The epidemiology of interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;150:967-972
284. Raghu G, Nyberg F, Morgan G. The epidemiology of interstitial lung disease and its association with lung cancer. *Br J Cancer.* 2004;91 Suppl 2:S3-10
285. The diagnosis, assessment and treatment of diffuse parenchymal lung disease in adults. Introduction. *Thorax.* 1999;54 Suppl 1:S1-14
286. Taraboletti G, Morbidelli L, Donnini S, Parenti A, Granger HJ, Giavazzi R, Ziche M. The heparin binding 25 kda fragment of thrombospondin-1 promotes angiogenesis and modulates gelatinase and timp-2 production in endothelial cells. *Faseb J.* 2000;14:1674-1676
287. Wilson JW, du Bois RM, King TE, Jr. Challenges in pulmonary fibrosis: 8--the need for an international registry for idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax.* 2008;63:285-287
288. Martinez FJ, Safrin S, Weycker D, Starko KM, Bradford WZ, King TE, Jr., Flaherty KR, Schwartz DA, Noble PW, Raghu G, Brown KK. The clinical course of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Ann Intern Med.* 2005;142:963-967
289. Hosenpud JD, Bennett LE, Keck BM, Edwards EB, Novick RJ. Effect of diagnosis on survival benefit of lung transplantation for end-stage lung disease. *Lancet.* 1998;351:24-27
290. Prasse A, Probst C, Bargagli E, Zissel G, Toews GB, Flaherty KR, Olschewski M, Rottoli P, Muller-Quernheim J. Serum cc-chemokine ligand 18 concentration predicts outcome in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179:717-723
291. Cosgrove GP, Brown KK, Schiemann WP, Serls AE, Parr JE, Geraci MW, Schwarz MI, Cool CD, Worthen GS. Pigment epithelium-derived factor in idiopathic pulmonary fibrosis: A role in aberrant angiogenesis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170:242-251
292. Teng RJ, Eis A, Bakhtashvili I, Arul N, Konduri GG. Increased superoxide production contributes to the impaired angiogenesis of fetal pulmonary arteries with in utero pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009;297:L184-195
293. Nadrous HF, Pellikka PA, Krowka MJ, Swanson KL, Chaowalit N, Decker PA, Ryu JH. Pulmonary hypertension in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest.* 2005;128:2393-2399
294. Sakao S, Taraseviciene-Stewart L, Wood K, Cool CD, Voelkel NF. Apoptosis of pulmonary microvascular endothelial cells stimulates vascular smooth muscle cell growth. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006;291:L362-368
295. Parra ER, David YR, da Costa LR, Ab'Saber A, Sousa R, Kairalla RA, de Carvalho CR, Filho MT, Capelozzi VL. Heterogeneous remodeling of lung vessels in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lung.* 2005;183:291-300
296. Budhiraja R, Tudor RM, Hassoun PM. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation.* 2004;109:159-165
297. Farkas L, Gauldie J, Voelkel NF, Kolb M. Pulmonary hypertension and idiopathic pulmonary fibrosis: A tale of angiogenesis, apoptosis, and growth factors. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;45:1-15
298. Hashimoto N, Phan SH, Imaizumi K, Matsuo M, Nakashima H, Kawabe T, Shimokata K, Hasegawa Y. Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010;43:161-172
299. Adamson IY, Hedgecock C, Bowden DH. Epithelial cell-fibroblast interactions in lung injury and repair. *Am J Pathol.* 1990;137:385-392
300. Crosby LM, Waters CM. Epithelial repair mechanisms in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2010;298:L715-731
301. Sacco O, Silvestri M, Sabatini F, Sale R, Defilippi AC, Rossi GA. Epithelial cells and fibroblasts: Structural repair and remodelling in the airways. *Paediatr Respir Rev.* 2004;5 Suppl A:S35-40
302. Phillips RJ, Burdick MD, Hong K, Lutz MA, Murray LA, Xue YY, Belperio JA, Keane MP, Strieter RM. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to cxcl12 and mediate fibrosis. *J Clin Invest.* 2004;114:438-446
303. Prasse A, Pechkovsky DV, Toews GB, Jungraithmayr W, Kollert F, Goldmann T, Vollmer E, Muller-Quernheim J, Zissel G. A vicious circle of alveolar macrophages and fibroblasts perpetuates pulmonary fibrosis via ccl18. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173:781-792

304. Tager AM, LaCamera P, Shea BS, Campanella GS, Selman M, Zhao Z, Polosukhin V, Wain J, Karimi-Shah BA, Kim ND, Hart WK, Pardo A, Blackwell TS, Xu Y, Chun J, Luster AD. The lysophosphatidic acid receptor lpa1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. *Nat Med*. 2008;14:45-54
305. Oga T, Matsuoka T, Yao C, Nonomura K, Kitaoka S, Sakata D, Kita Y, Tanizawa K, Taguchi Y, Chin K, Mishima M, Shimizu T, Narumiya S. Prostaglandin f(2alpha) receptor signaling facilitates bleomycin-induced pulmonary fibrosis independently of transforming growth factor-beta. *Nat Med*. 2009;15:1426-1430
306. Antoniadis HN, Neville-Golden J, Galanopoulos T, Kradin RL, Valente AJ, Graves DT. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 mrna in human idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:5371-5375
307. Piguet PF, Ribaux C, Karpuz V, Grau GE, Kapanci Y. Expression and localization of tumor necrosis factor-alpha and its mrna in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*. 1993;143:651-655
308. Ulich TR, Yi ES, Longmuir K, Yin S, Biltz R, Morris CF, Housley RM, Pierce GF. Keratinocyte growth factor is a growth factor for type ii pneumocytes in vivo. *J Clin Invest*. 1994;93:1298-1306
309. Pottier N, Maurin T, Chevalier B, Puissegur MP, Lebrigand K, Robbe-Sermesant K, Bertero T, Lino Cardenas CL, Courcot E, Rios G, Fourre S, Lo-Guidice JM, Marcet B, Cardinaud B, Barbry P, Mari B. Identification of keratinocyte growth factor as a target of microRNA-155 in lung fibroblasts: Implication in epithelial-mesenchymal interactions. *PLoS One*. 2009;4:e6718
310. Wang R, Ramos C, Joshi I, Zagariya A, Pardo A, Selman M, Uhal BD. Human lung myofibroblast-derived inducers of alveolar epithelial apoptosis identified as angiotensin peptides. *Am J Physiol*. 1999;277:L1158-1164
311. Konigshoff M, Balsara N, Pfaff EM, Kramer M, Chrobak I, Seeger W, Eickelberg O. Functional wnt signaling is increased in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One*. 2008;3:e2142
312. Coon DR, Roberts DJ, Loscertales M, Kradin R. Differential epithelial expression of shh and foxf1 in usual and nonspecific interstitial pneumonia. *Exp Mol Pathol*. 2006;80:119-123
313. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7:131-142
314. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119:1420-1428
315. Zavadil J, Bottlinger EP. Tgf-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene*. 2005;24:5764-5774
316. Gregory PA, Bracken CP, Bert AG, Goodall GJ. Micrnas as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle*. 2008;7:3112-3118
317. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and smad-independent pathways in tgf-beta family signalling. *Nature*. 2003;425:577-584
318. Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, Pittet JF, Kaminski N, Garat C, Matthay MA, Rifkin DB, Sheppard D. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent tgf beta 1: A mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell*. 1999;96:319-328
319. Xu MY, Porte J, Knox AJ, Weinreb PH, Maher TM, Violette SM, McAnulty RJ, Sheppard D, Jenkins G. Lysophosphatidic acid induces alphavbeta6 integrin-mediated tgf-beta activation via the lpa2 receptor and the small g protein g alpha(q). *Am J Pathol*. 2009;174:1264-1279
320. Jenkins RG, Su X, Su G, Scotton CJ, Camerer E, Laurent GJ, Davis GE, Chambers RC, Matthay MA, Sheppard D. Ligation of protease-activated receptor 1 enhances alpha(v)beta6 integrin-dependent tgf-beta activation and promotes acute lung injury. *J Clin Invest*. 2006;116:1606-1614
321. Fontana L, Chen Y, Prijatelj P, Sakai T, Fassler R, Sakai LY, Rifkin DB. Fibronectin is required for integrin alphavbeta6-mediated activation of latent tgf-beta complexes containing ltbp-1. *Faseb J*. 2005;19:1798-1808
322. Jain R, Shaul PW, Borok Z, Willis BC. Endothelin-1 induces alveolar epithelial-mesenchymal transition through endothelin type a receptor-mediated production of tgf-beta1. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;37:38-47
323. Schwartz MA, DeSimone DW. Cell adhesion receptors in mechanotransduction. *Curr Opin Cell Biol*. 2008;20:551-556
324. Friedland JC, Lee MH, Boettiger D. Mechanically activated integrin switch controls alpha5beta1 function. *Science*. 2009;323:642-644
325. Hinz B. Tissue stiffness, latent tgf-beta1 activation, and mechanical signal transduction: Implications for the pathogenesis and treatment of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep*. 2009;11:120-126
326. Travis MA, Reizis B, Melton AC, Masteller E, Tang Q, Proctor JM, Wang Y, Bernstein X, Huang X, Reichardt LF, Bluestone JA, Sheppard D. Loss of integrin alpha(v)beta8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice. *Nature*. 2007;449:361-365
327. Araya J, Cambier S, Morris A, Finkbeiner W, Nishimura SL. Integrin-mediated transforming growth factor-beta activation regulates homeostasis of the pulmonary epithelial-mesenchymal trophic unit. *Am J Pathol*. 2006;169:405-415
328. Scotton CJ, Krupiczkoj MA, Konigshoff M, Mercer PF, Lee YC, Kaminski N, Morser J, Post JM, Maher TM, Nicholson AG, Moffatt JD, Laurent GJ, Derian CK, Eickelberg O, Chambers RC. Increased local expression of coagulation factor x contributes to the fibrotic response in human and murine lung injury. *J Clin Invest*. 2009;119:2550-2563
329. Wipff PJ, Rifkin DB, Meister JJ, Hinz B. Myofibroblast contraction activates latent tgf-beta1 from the extracellular matrix. *J Cell Biol*. 2007;179:1311-1323
330. Masszi A, Fan L, Rosivall L, McCulloch CA, Rotstein OD, Mucsi I, Kapus A. Integrity of cell-cell contacts is a critical regulator of tgf-beta 1-induced epithelial-to-myofibroblast transition: Role for beta-catenin. *Am J Pathol*. 2004;165:1955-1967
331. Andl CD, Fargnoli BB, Okawa T, Bowser M, Takaoka M, Nakagawa H, Klein-Szanto A, Hua X, Herlyn M, Rustgi AK. Coordinated functions of e-cadherin and transforming growth factor beta receptor ii in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 2006;66:9878-9885
332. Borza CM, Pozzi A, Borza DB, Pedchenko V, Hellmark T, Hudson BG, Zent R. Integrin alpha3beta1, a novel receptor for alpha3(iv) noncollagenous domain and a trans-dominant inhibitor for integrin alphavbeta3. *J Biol Chem*. 2006;281:20932-20939
333. Chattopadhyay N, Wang Z, Ashman LK, Brady-Kalnay SM, Kreidberg JA. Alpha3beta1 integrin-cd151, a component of the cadherin-catenin complex, regulates ptpmu expression and cell-cell adhesion. *J Cell Biol*. 2003;163:1351-1362
334. Coraux C, Meneguzzi G, Rousselle P, Puchelle E, Gaillard D. Distribution of laminin 5, integrin receptors, and branching morphogenesis during human fetal lung development. *Dev Dyn*. 2002;225:176-185
335. Kim KK, Wei Y, Szekeres C, Kugler MC, Wolters PJ, Hill ML, Frank JA, Brumwell AN, Wheeler SE, Kreidberg JA, Chapman HA. Epithelial cell alpha3beta1 integrin links beta-catenin and smad signaling to promote myofibroblast formation and pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*. 2009;119:213-224

336. Piedra J, Martinez D, Castano J, Miravet S, Dunach M, de Herreros AG. Regulation of beta-catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*. 2001;276:20436-20443
337. Guo X, Ramirez A, Waddell DS, Li Z, Liu X, Wang XF. Axin and gsk3- control smad3 protein stability and modulate tgf-signaling. *Genes Dev*. 2008;22:106-120
338. Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, Wang HR, Zhang Y, Wrana JL. Regulation of the polarity protein par6 by tgfbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science*. 2005;307:1603-1609
339. Lee MK, Pardoux C, Hall MC, Lee PS, Warburton D, Qing J, Smith SM, Derynck R. Tgf-beta activates erk map kinase signalling through direct phosphorylation of shca. *Embo J*. 2007;26:3957-3967
340. Massague J, Chen YG. Controlling tgf-beta signaling. *Genes Dev*. 2000;14:627-644
341. Alcorn JF, Guala AS, van der Velden J, McElhinney B, Irvin CG, Davis RJ, Janssen-Heininger YM. Jun n-terminal kinase 1 regulates epithelial-to-mesenchymal transition induced by tgf-beta1. *J Cell Sci*. 2008;121:1036-1045
342. Santibanez JF. Jnk mediates tgf-beta1-induced epithelial mesenchymal transdifferentiation of mouse transformed keratinocytes. *FEBS Lett*. 2006;580:5385-5391
343. Qing J, Zhang Y, Derynck R. Structural and functional characterization of the transforming growth factor-beta -induced smad3/c-jun transcriptional cooperativity. *J Biol Chem*. 2000;275:38802-38812
344. Davies M, Robinson M, Smith E, Huntley S, Prime S, Paterson I. Induction of an epithelial to mesenchymal transition in human immortal and malignant keratinocytes by tgf-beta1 involves mapk, smad and ap-1 signalling pathways. *J Cell Biochem*. 2005;95:918-931
345. Docherty NG, O'Sullivan OE, Healy DA, Murphy M, O'Neill A J, Fitzpatrick JM, Watson RW. Tgf-beta1-induced emt can occur independently of its proapoptotic effects and is aided by egf receptor activation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006;290:F1202-1212
346. Radisky DC, Levy DD, Littlepage LE, Liu H, Nelson CM, Fata JE, Leake D, Godden EL, Albertson DG, Nieto MA, Werb Z, Bissell MJ. Rac1b and reactive oxygen species mediate mmp-3-induced emt and genomic instability. *Nature*. 2005;436:123-127
347. Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, Kalluri R. Bmp-7 counteracts tgf-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med*. 2003;9:964-968
348. Izumi N, Mizuguchi S, Inagaki Y, Saika S, Kawada N, Nakajima Y, Inoue K, Suehiro S, Friedman SL, Ikeda K. Bmp-7 opposes tgf-beta1-mediated collagen induction in mouse pulmonary myofibroblasts through id2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;290:L120-126
349. Koli K, Myllarniemi M, Vuorinen K, Salmenkivi K, Ryyanen MJ, Kinnula VL, Keski-Oja J. Bone morphogenetic protein-4 inhibitor gremlin is overexpressed in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*. 2006;169:61-71
350. Myllarniemi M, Lindholm P, Ryyanen MJ, Kliment CR, Salmenkivi K, Keski-Oja J, Kinnula VL, Oury TD, Koli K. Gremlin-mediated decrease in bone morphogenetic protein signaling promotes pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177:321-329
351. Murray LA, Hackett TL, Warner SM, Shaheen F, Argentieri RL, Dudas P, Farrell FX, Knight DA. Bmp-7 does not protect against bleomycin-induced lung or skin fibrosis. *PLoS One*. 2008;3:e4039
352. Chapman HA, Allen CL, Stone OL. Abnormalities in pathways of alveolar fibrin turnover among patients with interstitial lung disease. *Am Rev Respir Dis*. 1986;133:437-443
353. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. 2008;214:199-210
354. Fichtner-Feigl S, Strober W, Kawakami K, Puri RK, Kitani A. Il-13 signaling through the il-13alpha2 receptor is involved in induction of tgf-beta1 production and fibrosis. *Nat Med*. 2006;12:99-106
355. Bates RC, Mercurio AM. Tumor necrosis factor-alpha stimulates the epithelial-to-mesenchymal transition of human colonic organoids. *Mol Biol Cell*. 2003;14:1790-1800
356. Kolb M, Margetts PJ, Anthony DC, Pitossi F, Gauldie J. Transient expression of il-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*. 2001;107:1529-1536
357. McGuire JK, Li Q, Parks WC. Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) mediates e-cadherin ectodomain shedding in injured lung epithelium. *Am J Pathol*. 2003;162:1831-1843
358. Cheng DS, Han W, Chen SM, Sherrill TP, Chont M, Park GY, Sheller JR, Polosukhin VV, Christman JW, Yull FE, Blackwell TS. Airway epithelium controls lung inflammation and injury through the nf-kappa b pathway. *J Immunol*. 2007;178:6504-6513
359. Higgins DF, Kimura K, Iwano M, Haase VH. Hypoxia-inducible factor signaling in the development of tissue fibrosis. *Cell Cycle*. 2008;7:1128-1132
360. Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, Saito Y, Johnson RS, Kretzler M, Cohen CD, Eckardt KU, Iwano M, Haase VH. Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via hif-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2007;117:3810-3820
361. Kim WY, Perera S, Zhou B, Carretero J, Yeh JJ, Heathcote SA, Jackson AL, Nikolinakos P, Ospina B, Naumov G, Brandstetter KA, Weigman VJ, Zaghul S, Hayes DN, Padera RF, Heymach JV, Kung AL, Sharpless NE, Kaelin WG, Jr., Wong KK. Hif2alpha cooperates with ras to promote lung tumorigenesis in mice. *J Clin Invest*. 2009;119:2160-2170
362. Zhou G, Dada LA, Wu M, Kelly A, Trejo H, Zhou Q, Varga J, Sznajder JI. Hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition requires mitochondrial ros and hypoxia-inducible factor 1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009;297:L1120-1130
363. Tzouveleki A, Harokopos V, Paparountas T, Oikonomou N, Chatziioannou A, Vilaras G, Tsiambas E, Karameris A, Bouros D, Aidinis V. Comparative expression profiling in pulmonary fibrosis suggests a role of hypoxia-inducible factor-1alpha in disease pathogenesis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176:1108-1119
364. Hickey MM, Richardson T, Wang T, Mosqueira M, Arguiri E, Yu H, Yu QC, Solomides CC, Morrissey EE, Khurana TS, Christofidou-Solomidou M, Simon MC. The von hippel-lindau chuvash mutation promotes pulmonary hypertension and fibrosis in mice. *J Clin Invest*. 2010;120:827-839
365. Chilosi M, Poletti V, Murer B, Lestani M, Cancellieri A, Montagna L, Piccoli P, Cangi G, Semenzato G, Doglioni C. Abnormal re-epithelialization and lung remodeling in idiopathic pulmonary fibrosis: The role of deltan-p63. *Lab Invest*. 2002;82:1335-1345
366. Sahlgren C, Gustafsson MV, Jin S, Poellinger L, Lendahl U. Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:6392-6397
367. Dong Z, Kumar R, Yang X, Fidler IJ. Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in lewis lung carcinoma. *Cell*. 1997;88:801-810

368. Patterson BC, Sang QA. Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (mmp-7) and gelatinase b/type iv collagenase (mmp-9). *J Biol Chem.* 1997;272:28823-28825
369. Stathakis P, Fitzgerald M, Matthias LJ, Chesterman CN, Hogg PJ. Generation of angiostatin by reduction and proteolysis of plasmin. Catalysis by a plasmin reductase secreted by cultured cells. *J Biol Chem.* 1997;272:20641-20645
370. Cao Y, Xue L. Angiostatin. *Semin Thromb Hemost.* 2004;30:83-93
371. Cao Y, Ji RW, Davidson D, Schaller J, Marti D, Sohndel S, McCance SG, O'Reilly MS, Llinas M, Folkman J. Kringle domains of human angiostatin. Characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells. *J Biol Chem.* 1996;271:29461-29467
372. Claesson-Welsh L, Welsh M, Ito N, Anand-Apte B, Soker S, Zetter B, O'Reilly M, Folkman J. Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif rgd. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:5579-5583
373. Chavakis E, Dimmeler S. Regulation of endothelial cell survival and apoptosis during angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:887-893
374. Gupta N, Nodzinski E, Khodarev NN, Yu J, Khorasani L, Beckett MA, Kufe DW, Weichselbaum RR. Angiostatin effects on endothelial cells mediated by ceramide and rhoa. *EMBO Rep.* 2001;2:536-540
375. Moser TL, Kenan DJ, Ashley TA, Roy JA, Goodman MD, Misra UK, Cheek DJ, Pizzo SV. Endothelial cell surface f1-f0 atp synthase is active in atp synthesis and is inhibited by angiostatin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:6656-6661
376. Moser TL, Stack MS, Asplin I, Enghild JJ, Hojrup P, Everitt L, Hubchak S, Schnaper HW, Pizzo SV. Angiostatin binds atp synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:2811-2816
377. Jurasz P, Ng D, Granton JT, Courtman DW, Stewart DJ. Elevated platelet angiostatin and circulating endothelial microfragments in idiopathic pulmonary arterial hypertension: A preliminary study. *Thromb Res.* 2010;125:53-60
378. Pascaud MA, Griscelli F, Raoul W, Marcos E, Opolon P, Raffestin B, Perricaudet M, Adnot S, Eddahibi S. Lung overexpression of angiostatin aggravates pulmonary hypertension in chronically hypoxic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;29:449-457
379. Liu RM. Oxidative stress, plasminogen activator inhibitor 1, and lung fibrosis. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10:303-319
380. Mulligan-Kehoe MJ, Wagner R, Wieland C, Powell R. A truncated plasminogen activator inhibitor-1 protein induces and inhibits angiostatin (kringles 1-3), a plasminogen cleavage product. *J Biol Chem.* 2001;276:8588-8596
381. Galie N, Hoeper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery JL, Barbera JA, Beghetti M, Corris P, Gaine S, Gibbs JS, Gomez-Sanchez MA, Jondeau G, Klepetko W, Opitz C, Peacock A, Rubin L, Zellweger M, Simonneau G. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2009;34:1219-1263
382. Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, Elliott CG, Gaine SP, Gladwin MT, Jing ZC, Krowka MJ, Langleben D, Nakanishi N, Souza R. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54:S43-54
383. Lane KB, Machado RD, Pauciuolo MW, Thomson JR, Phillips JA, 3rd, Loyd JE, Nichols WC, Trembath RC. Heterozygous germline mutations in bmpr2, encoding a tgfbeta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. *Nat Genet.* 2000;26:81-84
384. Peacock AJ, Murphy NF, McMurray JJ, Caballero L, Stewart S. An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 2007;30:104-109
385. Marsboom G, Pokreisz P, Gheysens O, Vermeersch P, Gillijns H, Pellens M, Liu X, Collen D, Janssens S. Sustained endothelial progenitor cell dysfunction after chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Stem Cells.* 2008;26:1017-1026
386. Satoh K, Kagaya Y, Nakano M, Ito Y, Ohta J, Tada H, Karibe A, Minegishi N, Suzuki N, Yamamoto M, Ono M, Watanabe J, Shirato K, Ishii N, Sugamura K, Shimokawa H. Important role of endogenous erythropoietin system in recruitment of endothelial progenitor cells in hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Circulation.* 2006;113:1442-1450
387. Diller GP, van Eijl S, Okonko DO, Howard LS, Ali O, Thum T, Wort SJ, Bedard E, Gibbs JS, Bauersachs J, Hobbs AJ, Wilkins MR, Gatzoulis MA, Wharton J. Circulating endothelial progenitor cells in patients with eisenmenger syndrome and idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 2008;117:3020-3030
388. Junhui Z, Xingxiang W, Guosheng F, Yunpeng S, Furong Z, Junzhu C. Reduced number and activity of circulating endothelial progenitor cells in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respir Med.* 2008;102:1073-1079
389. Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 1995;333:214-221
390. Pullamsetti S, Kiss L, Ghofrani HA, Voswinkel R, Haredza P, Klepetko W, Aigner C, Fink L, Muyl JP, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Schermuly RT. Increased levels and reduced catabolism of asymmetric and symmetric dimethylarginines in pulmonary hypertension. *Faseb J.* 2005;19:1175-1177
391. Humbert M, Monti G, Brenot F, Sitbon O, Portier A, Grangeot-Keros L, Duroux P, Galanaud P, Simonneau G, Emilie D. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;151:1628-1631
392. Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, Rabinovitch M. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43:13S-24S
393. Asosingh K, Aldred MA, Vasanji A, Drazba J, Sharp J, Farver C, Comhair SA, Xu W, Licina L, Huang L, Anand-Apte B, Yoder MC, Tuder RM, Erzurum SC. Circulating angiogenic precursors in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Pathol.* 2008;172:615-627
394. Yao W, Firth AL, Sacks RS, Ogawa A, Auger WR, Fedullo PF, Madani MM, Lin GY, Sakakibara N, Thistlethwaite PA, Jamieson SW, Rubin LJ, Yuan JX. Identification of putative endothelial progenitor cells (cd34+cd133+flk-1+) in endarterectomized tissue of patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009;296:L870-878
395. Young KC, Torres E, Hatzistergos KE, Hehre D, Suguihara C, Hare JM. Inhibition of the sdf-1/cxcr4 axis attenuates neonatal hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circ Res.* 2009;104:1293-1301
396. Dormandy JA, Rutherford RB. Management of peripheral arterial disease (pad). Tasc working group. Transatlantic inter-society consensus (tasc). *J Vasc Surg.* 2000;31:S1-S296
397. Ruffolo AJ, Romano M, Ciapponi A. Prostanoids for critical limb ischaemia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010:CD006544
398. Morishita T, Uzui H, Nakano A, Mitsuke Y, Geshi T, Ueda T, Lee JD. Number of endothelial progenitor cells in peripheral artery disease as a marker of severity and association with pentraxin-3, malondialdehyde-modified low-density lipoprotein and membrane type-1 matrix metalloproteinase. *J Atheroscler Thromb.* 2012;19:149-158
399. Smadja DM, d'Audigier C, Bieche I, Evrard S, Mauge L, Dias JV, Labreuche J, Laurendeau I, Marsac B, Dizier B, Wagner-Ballon O, Boisson-Vidal C, Morandi V, Duong-Van-Huyen JP, Bruneval P, Dignat-George F, Emmerich J, Gaussem P. Thrombospondin-

- 1 is a plasmatic marker of peripheral arterial disease that modulates endothelial progenitor cell angiogenic properties. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:551-559
400. Smadja DM, Duong-van-Huyen JP, Dal Cortivo L, Blanchard A, Bruneval P, Emmerich J, Gaussem P. Early endothelial progenitor cells in bone marrow are a biomarker of cell therapy success in patients with critical limb ischemia. *Cytotherapy.* 2012;14:232-239
  401. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Jessup M, Konstam MA, Mancini DM, Michl K, Oates JA, Rahko PS, Silver MA, Stevenson LW, Yancy CW. 2009 focused update incorporated into the acc/aha 2005 guidelines for the diagnosis and management of heart failure in adults: A report of the american college of cardiology foundation/american heart association task force on practice guidelines: Developed in collaboration with the international society for heart and lung transplantation. *Circulation.* 2009;119:e391-479
  402. Cannon CP, Brindis RG, Chaitman BR, Cohen DJ, Cross JT, Jr., Drozda JP, Jr., Fesmire FM, Fintel DJ, Fonarow GC, Fox KA, Gray DT, Harrington RA, Hicks KA, Hollander JE, Krumholz H, Labarthe DR, Long JB, Mascette AM, Meyer C, Peterson ED, Radford MJ, Roe MT, Richmann JB, Selker HP, Shahian DM, Shaw RE, Sprenger S, Swor R, Underberg JA, Van de Werf F, Weiner BH, Weintraub WS. 2013 accf/aha key data elements and definitions for measuring the clinical management and outcomes of patients with acute coronary syndromes and coronary artery disease: A report of the american college of cardiology foundation/american heart association task force on clinical data standards (writing committee to develop acute coronary syndromes and coronary artery disease clinical data standards). *J Am Coll Cardiol.* 2013;61:992-1025
  403. Calo LA, Facco M, Davis PA, Pagnin E, Maso LD, Puato M, Caielli P, Agostini C, Pessina AC. Endothelial progenitor cells relationships with clinical and biochemical factors in a human model of blunted angiotensin ii signaling. *Hypertens Res.* 2011;34:1017-1022
  404. Jialal I, Fadini GP, Pollock K, Devaraj S. Circulating levels of endothelial progenitor cell mobilizing factors in the metabolic syndrome. *Am J Cardiol.* 2010;106:1606-1608
  405. Mok MY, Yiu KH, Wong CY, Qiuwaxi J, Lai WH, Wong WS, Tse HF, Lau CS. Low circulating level of cd133+kdr+ cells in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol.* 2010;28:S19-25
  406. Sibal L, Aldibbiat A, Agarwal SC, Mitchell G, Oates C, Razvi S, Weaver JU, Shaw JA, Home PD. Circulating endothelial progenitor cells, endothelial function, carotid intima-media thickness and circulating markers of endothelial dysfunction in people with type 1 diabetes without macrovascular disease or microalbuminuria. *Diabetologia.* 2009;52:1464-1473
  407. Fadini GP, Sartore S, Albiero M, Baesso I, Murphy E, Menegolo M, Grego F, Vigili de Kreutzenberg S, Tiengo A, Agostini C, Avogaro A. Number and function of endothelial progenitor cells as a marker of severity for diabetic vasculopathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:2140-2146
  408. Bielak LF, Horenstein RB, Ryan KA, Sheedy PF, Rumberger JA, Tanner K, Post W, Mitchell BD, Shuldiner AR, Peyser PA. Circulating cd34+ cell count is associated with extent of subclinical atherosclerosis in asymptomatic amish men, independent of 10-year framingham risk. *Clin Med Cardiol.* 2009;3:53-60
  409. Ghani U, Shuaib A, Salam A, Nasir A, Shuaib U, Jeerakathil T, Sher F, O'Rourke F, Nasser AM, Schwindt B, Todd K. Endothelial progenitor cells during cerebrovascular disease. *Stroke.* 2005;36:151-153
  410. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Bohm M, Nickenig G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med.* 2005;353:999-1007
  411. Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kamper U, Dimmeler S, Zeiher AM. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: Proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation.* 2005;111:2981-2987
  412. Guven H, Shepherd RM, Bach RG, Capoccia BJ, Link DC. The number of endothelial progenitor cell colonies in the blood is increased in patients with angiographically significant coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:1579-1587
  413. Leone AM, Rutella S, Bonanno G, Abbate A, Rebuzzi AG, Giovannini S, Lombardi M, Galiuto L, Liuzzo G, Andreotti F, Lanza GA, Contemi AM, Leone G, Crea F. Mobilization of bone marrow-derived stem cells after myocardial infarction and left ventricular function. *Eur Heart J.* 2005;26:1196-1204
  414. Massa M, Rosti V, Ferrario M, Campanelli R, Ramajoli I, Rosso R, De Ferrari GM, Ferlini M, Goffredo L, Bertolotti A, Klersy C, Pecci A, Moratti R, Tavazzi L. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood.* 2005;105:199-206
  415. Sobrino T, Hurtado O, Moro MA, Rodriguez-Yanez M, Castellanos M, Brea D, Moldes O, Blanco M, Arenillas JF, Leira R, Davalos A, Lizasoain I, Castillo J. The increase of circulating endothelial progenitor cells after acute ischemic stroke is associated with good outcome. *Stroke.* 2007;38:2759-2764
  416. Yip HK, Chang LT, Chang WN, Lu CH, Liou CW, Lan MY, Liu JS, Youssef AA, Chang HW. Level and value of circulating endothelial progenitor cells in patients after acute ischemic stroke. *Stroke.* 2008;39:69-74
  417. Wojakowski W, Tendera M, Michalowska A, Majka M, Kucia M, Maslankiewicz K, Wyderka R, Ochala A, Ratajczak MZ. Mobilization of cd34/cxcr4+, cd34/cd117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction. *Circulation.* 2004;110:3213-3220
  418. Bonello L, Sabatier F, Basire A, Paganelli F, Dignat-George F. The imbalance between circulating endothelial cells and progenitors in cardiovascular diseases: A mirror of disrupted endothelial integrity. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 2006;99:607-613
  419. 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.* 2006;4:979-981
  420. Massa M, Campanelli R, Bonetti E, Ferrario M, Marinoni B, Rosti V. Rapid and large increase of the frequency of circulating endothelial colony-forming cells (ecfcs) generating late outgrowth endothelial cells in patients with acute myocardial infarction. *Exp Hematol.* 2009;37:8-9
  421. Meneveau N, Deschaseaux F, Seronde MF, Chopard R, Schiele F, Jehl J, Tiberghien P, Bassand JP, Kantelip JP, Davani S. Presence of endothelial colony-forming cells is associated with reduced microvascular obstruction limiting infarct size and left ventricular remodelling in patients with acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 2011;106:1397-1410
  422. Heesch C, Lehmann R, Honold J, Assmus B, Aicher A, Walter DH, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation.* 2004;109:1615-1622

423. Andreou I, Tousoulis D, Tentolouris C, Antoniadis C, Stefanadis C. Potential role of endothelial progenitor cells in the pathophysiology of heart failure: Clinical implications and perspectives. *Atherosclerosis*. 2006;189:247-254
424. Fritzenwanger M, Lorenz F, Jung C, Fabris M, Thude H, Barz D, Figulla HR. Differential number of cd34+, cd133+ and cd34+/cd133+ cells in peripheral blood of patients with congestive heart failure. *Eur J Med Res*. 2009;14:113-117
425. Kuliczkowski W, Derzhko R, Prajs I, Podolak-Dawidziak M, Serebruany VL. Endothelial progenitor cells and left ventricle function in patients with acute myocardial infarction: Potential therapeutic considerations. *Am J Ther*. 2012;19:44-50
426. Bogoslovsky T, Spatz M, Chaudhry A, Maric D, Luby M, Frank J, Warach S. Stromal-derived factor-1[alpha] correlates with circulating endothelial progenitor cells and with acute lesion volume in stroke patients. *Stroke*. 2011;42:618-625
427. Smadja DM, Godier A, Susen S, Packard RR, Fabiani JN, Aiach M, Gaussem P. Endothelial progenitor cells are selectively mobilised immediately after coronary artery bypass grafting or valve surgery. *Thromb Haemost*. 2009;101:983-985
428. Heesch C, Dimmeler S, Fichtlscherer S, Hamm CW, Berger J, Simoons ML, Zeiher AM. Prognostic value of placental growth factor in patients with acute chest pain. *Jama*. 2004;291:435-441
429. Smadja DM, Gaussem P, Mauge L, Lacroix R, Gandrille S, Remones V, Peyrard S, Sabatier F, Bonnet D, Levy M. Comparison of endothelial biomarkers according to reversibility of pulmonary hypertension secondary to congenital heart disease. *Pediatr Cardiol*. 2010;31:657-662
430. Delva P, De Marchi S, Prior M, Degan M, Lechi A, Trettene M, Arosio E. Endothelial progenitor cells in patients with severe peripheral arterial disease. *Endothelium*. 2008;15:246-253
431. Wang CH, Hsieh IC, Su Pang JH, Cherng WJ, Lin SJ, Tung TH, Mei HF. Factors associated with purity, biological function, and activation potential of endothelial colony-forming cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011;300:R586-594
432. Campioni D, Zauli G, Gambetti S, Campo G, Cuneo A, Ferrari R, Secchiero P. In vitro characterization of circulating endothelial progenitor cells isolated from patients with acute coronary syndrome. *PLoS One*. 2013;8:e56377
433. Hoesli SJ, Mead LE, Prater D, Javed MJ, Ingram DA, Denne SC. Endothelial colony-forming cells and mesenchymal stem cells from ECMO circuits of term infants. *J Perinatol*. 2010;30:724-730
434. Fung ET, Wright GL, Jr., Dalmaso EA. Proteomic strategies for biomarker identification: Progress and challenges. *Curr Opin Mol Ther*. 2000;2:643-650
435. De Gruttola VG, Clax P, DeMets DL, Downing GJ, Ellenberg SS, Friedman L, Gail MH, Prentice R, Wittes J, Zeger SL. Considerations in the evaluation of surrogate endpoints in clinical trials. Summary of a national institutes of health workshop. *Control Clin Trials*. 2001;22:485-502
436. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69:89-95
437. Sato Y, Fujiwara H, Takatsu Y. Biochemical markers in heart failure. *J Cardiol*. 2012;59:1-7
438. Vasani RS. Biomarkers of cardiovascular disease: Molecular basis and practical considerations. *Circulation*. 2006;113:2335-2362
439. du Bois RM, Weycker D, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Kartashov A, Lancaster L, Noble PW, Sahn SA, Swartzberg J, Thomeer M, Valeyre D, King TE, Jr. Six-minute-walk test in idiopathic pulmonary fibrosis: Test validation and minimal clinically important difference. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183:1231-1237
440. Kohno N, Kyoizumi S, Awaya Y, Fukuhara H, Yamakido M, Akiyama M. New serum indicator of interstitial pneumonitis activity. Sialylated carbohydrate antigen kl-6. *Chest*. 1989;96:68-73
441. Bandoh S, Fujita J, Ohtsuki Y, Ueda Y, Hojo S, Tokuda M, Dobashi H, Kurata N, Yoshinouchi T, Kohno N, Takahara J. Sequential changes of kl-6 in sera of patients with interstitial pneumonia associated with polymyositis/dermatomyositis. *Ann Rheum Dis*. 2000;59:257-262
442. Hirasawa Y, Kohno N, Yokoyama A, Inoue Y, Abe M, Hiwada K. Kl-6, a human muc1 mucin, is chemotactic for human fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997;17:501-507
443. Ohshimo S, Yokoyama A, Hattori N, Ishikawa N, Hirasawa Y, Kohno N. Kl-6, a human muc1 mucin, promotes proliferation and survival of lung fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;338:1845-1852
444. Ishii H, Mukae H, Kadota J, Kaida H, Nagata T, Abe K, Matsukura S, Kohno S. High serum concentrations of surfactant protein a in usual interstitial pneumonia compared with non-specific interstitial pneumonia. *Thorax*. 2003;58:52-57
445. Ohnishi H, Yokoyama A, Kondo K, Hamada H, Abe M, Nishimura K, Hiwada K, Kohno N. Comparative study of kl-6, surfactant protein-a, surfactant protein-d, and monocyte chemoattractant protein-1 as serum markers for interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:378-381
446. Kohno N, Awaya Y, Oyama T, Yamakido M, Akiyama M, Inoue Y, Yokoyama A, Hamada H, Fujioka S, Hiwada K. Kl-6, a mucin-like glycoprotein, in bronchoalveolar lavage fluid from patients with interstitial lung disease. *Am Rev Respir Dis*. 1993;148:637-642
447. Goerke J. Pulmonary surfactant: Functions and molecular composition. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1408:79-89
448. Kishore U, Greenhough TJ, Waters P, Shrive AK, Ghai R, Kamran MF, Bernal AL, Reid KB, Madan T, Chakraborty T. Surfactant proteins sp-a and sp-d: Structure, function and receptors. *Mol Immunol*. 2006;43:1293-1315
449. Greene KE, King TE, Jr., Kuroki Y, Bucher-Bartelson B, Hunninghake GW, Newman LS, Nagae H, Mason RJ. Serum surfactant proteins-a and -d as biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2002;19:439-446
450. Okamoto M, Hoshino T, Kitasato Y, Sakazaki Y, Kawayama T, Fujimoto K, Ohshima K, Shiraishi H, Uchida M, Ono J, Ohta S, Kato S, Izuhara K, Aizawa H. Periostin, a matrix protein, is a novel biomarker for idiopathic interstitial pneumonias. *Eur Respir J*. 2011;37:1119-1127
451. Sidhu SS, Yuan S, Innes AL, Kerr S, Woodruff PG, Hou L, Muller SJ, Fahy JV. Roles of epithelial cell-derived periostin in tgf-beta activation, collagen production, and collagen gel elasticity in asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:14170-14175
452. Oikonomidi S, Kostikas K, Tsilioni I, Tanou K, Gourgoulanis KI, Kiroopoulos TS. Matrix metalloproteinases in respiratory diseases: From pathogenesis to potential clinical implications. *Curr Med Chem*. 2009;16:1214-1228
453. Sauter W, Rosenberger A, Beckmann L, Kropp S, Mittelstrass K, Timofeeva M, Wolke G, Steinwachs A, Scheiner D, Meese E, Sybrecht G, Kronenberg F, Dienemann H, Chang-Claude J, Illig T, Wichmann HE, Bickeboller H, Risch A. Matrix metalloproteinase 1 (mmp1) is associated with early-onset lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17:1127-1135
454. Zuo F, Kaminski N, Eugui E, Allard J, Yakhini Z, Ben-Dor A, Lollini L, Morris D, Kim Y, DeLustro B, Sheppard D, Pardo A, Selman M, Heller RA. Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:6292-6297

455. Vuorinen K, Myllarniemi M, Lammi L, Piirila P, Ryttila P, Salmenkivi K, Kinnula VL. Elevated matrix metalloproteinase levels in bronchoalveolar lavage fluid do not distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from other interstitial lung diseases. *APMIS*. 2007;115:969-975
456. Huh JW, Kim DS, Oh YM, Shim TS, Lim CM, Lee SD, Koh Y, Kim WS, Kim WD, Kim KR. Is metalloproteinase-7 specific for idiopathic pulmonary fibrosis? *Chest*. 2008;133:1101-1106
457. Fujishima S, Shiomi T, Yamashita S, Yogo Y, Nakano Y, Inoue T, Nakamura M, Tasaka S, Hasegawa N, Aikawa N, Ishizaka A, Okada Y. Production and activation of matrix metalloproteinase 7 (matrilysin 1) in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134:1136-1142
458. Rosas IO, Richards TJ, Konishi K, Zhang Y, Gibson K, Lokshin AE, Lindell KO, Cisneros J, Macdonald SD, Pardo A, Sciruba F, Dauber J, Selman M, Gochuico BR, Kaminski N. Mmp1 and mmp7 as potential peripheral blood biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS Med*. 2008;5:e93
459. Kim HN, Januzzi JL, Jr. Natriuretic peptide testing in heart failure. *Circulation*. 2011;123:2015-2019
460. Fonarow GC, Peacock WF, Phillips CO, Givertz MM, Lopatin M. Admission b-type natriuretic peptide levels and in-hospital mortality in acute decompensated heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49:1943-1950
461. Leuchte HH, Holzapfel M, Baumgartner RA, Ding I, Neurohr C, Vogeser M, Kolbe T, Schwaiblmair M, Behr J. Clinical significance of brain natriuretic peptide in primary pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:764-770
462. Song JW, Song JK, Kim DS. Echocardiography and brain natriuretic peptide as prognostic indicators in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med*. 2009;103:180-186
463. Zisman DA, Kawut SM, Lederer DJ, Belperio JA, Lynch JP, 3rd, Schwarz MI, Tayek JA, Reuben DB, Karlamangla AS. Serum albumin concentration and waiting list mortality in idiopathic interstitial pneumonia. *Chest*. 2009;135:929-935
464. Satoh H, Kurishima K, Ishikawa H, Ohtsuka M. Increased levels of kl-6 and subsequent mortality in patients with interstitial lung diseases. *J Intern Med*. 2006;260:429-434
465. Kinder BW, Brown KK, McCormack FX, Ix JH, Kervitsky A, Schwarz MI, King TE, Jr. Serum surfactant protein-a is a strong predictor of early mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*. 2009;135:1557-1563
466. Takahashi H, Fujishima T, Koba H, Murakami S, Kurokawa K, Shibuya Y, Shiratori M, Kuroki Y, Abe S. Serum surfactant proteins a and d as prognostic factors in idiopathic pulmonary fibrosis and their relationship to disease extent. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:1109-1114
467. Richards TJ, Kaminski N, Baribaud F, Flavin S, Brodmerkel C, Horowitz D, Li K, Choi J, Vuga LJ, Lindell KO, Klesin M, Zhang Y, Gibson KF. Peripheral blood proteins predict mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185:67-76
468. Luzina IG, Tsybalyuk N, Choi J, Hasday JD, Atamas SP. Ccl18-stimulated upregulation of collagen production in lung fibroblasts requires sp1 signaling and basal smad3 activity. *J Cell Physiol*. 2006;206:221-228
469. Prasse A, Pechkovsky DV, Toews GB, Schafer M, Eggeling S, Ludwig C, Germann M, Kollert F, Zissel G, Muller-Quernheim J. Ccl18 as an indicator of pulmonary fibrotic activity in idiopathic interstitial pneumonias and systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2007;56:1685-1693
470. Johansen JS, Christoffersen P, Moller S, Price PA, Henriksen JH, Garbarsch C, Bendtsen F. Serum ykl-40 is increased in patients with hepatic fibrosis. *J Hepatol*. 2000;32:911-920
471. Kruit A, Grutters JC, Ruven HJ, van Moorsel CC, van den Bosch JM. A chi311 gene polymorphism is associated with serum levels of ykl-40, a novel sarcoidosis marker. *Respir Med*. 2007;101:1563-1571
472. Letuve S, Kozhich A, Arouche N, Grandsaigne M, Reed J, Dombret MC, Kiener PA, Aubier M, Coyle AJ, Pretolani M. Ykl-40 is elevated in patients with chronic obstructive pulmonary disease and activates alveolar macrophages. *J Immunol*. 2008;181:5167-5173
473. Chupp GL, Lee CG, Jarjour N, Shim YM, Holm CT, He S, Dziura JD, Reed J, Coyle AJ, Kiener P, Cullen M, Grandsaigne M, Dombret MC, Aubier M, Pretolani M, Elias JA. A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma. *N Engl J Med*. 2007;357:2016-2027
474. Ober C, Chupp GL. The chitinase and chitinase-like proteins: A review of genetic and functional studies in asthma and immune-mediated diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2009;9:401-408
475. Furuhashi K, Suda T, Nakamura Y, Inui N, Hashimoto D, Miwa S, Hayakawa H, Kusagaya H, Nakano Y, Nakamura H, Chida K. Increased expression of ykl-40, a chitinase-like protein, in serum and lung of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med*. 2010;104:1204-1210
476. Korthagen NM, van Moorsel CH, Barlo NP, Ruven HJ, Kruit A, Heron M, van den Bosch JM, Grutters JC. Serum and balf ykl-40 levels are predictors of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med*. 2011;105:106-113
477. Borchers AT, Chang C, Keen CL, Gershwin ME. Idiopathic pulmonary fibrosis-an epidemiological and pathological review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2011;40:117-134
478. Parra ER, Kairalla RA, Ribeiro de Carvalho CR, Eher E, Capelozzi VL. Inflammatory cell phenotyping of the pulmonary interstitium in idiopathic interstitial pneumonia. *Respiration*. 2007;74:159-169
479. Daniil Z, Kitsanta P, Kapotsis G, Mathioudaki M, Kollintza A, Karatza M, Milic-Emili J, Roussos C, Papiris SA. Cd8+ t lymphocytes in lung tissue from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res*. 2005;6:81
480. Gilani SR, Vuga LJ, Lindell KO, Gibson KF, Xue J, Kaminski N, Valentine VG, Lindsay EK, George MP, Steele C, Duncan SR. Cd28 down-regulation on circulating cd4 t-cells is associated with poor prognoses of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One*. 2010;5:e8959
481. Kotsianidis I, Nakou E, Bouchliou I, Tzouveleki A, Spanoudakis E, Steiropoulos P, Sotiriou I, Aidinis V, Margaritis D, Tsatalas C, Bouras D. Global impairment of cd4+cd25+foxp3+ regulatory t cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;179:1121-1130
482. Bellini A, Mattoli S. The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses. *Lab Invest*. 2007;87:858-870
483. Moore BB, Kolodnick JE, Thannickal VJ, Cooke K, Moore TA, Hogaboam C, Wilke CA, Toews GB. Ccr2-mediated recruitment of fibrocytes to the alveolar space after fibrotic injury. *Am J Pathol*. 2005;166:675-684
484. Andersson-Sjoland A, de Alba CG, Nihlberg K, Becerril C, Ramirez R, Pardo A, Westergren-Thorsson G, Selman M. Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40:2129-2140

485. Moeller A, Gilpin SE, Ask K, Cox G, Cook D, Gaudie J, Margetts PJ, Farkas L, Dobranowski J, Boylan C, O'Byrne PM, Strieter RM, Kolb M. Circulating fibrocytes are an indicator of poor prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179:588-594
486. Tzouveleki A, Anevlavis S, Bouros D. Angiogenesis in interstitial lung diseases: A pathogenetic hallmark or a bystander? *Respir Res.* 2006;7:82
487. Koyama S, Sato E, Haniuda M, Numanami H, Nagai S, Izumi T. Decreased level of vascular endothelial growth factor in bronchoalveolar lavage fluid of normal smokers and patients with pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166:382-385
488. Meyer KC, Cardoni A, Xiang ZZ. Vascular endothelial growth factor in bronchoalveolar lavage from normal subjects and patients with diffuse parenchymal lung disease. *J Lab Clin Med.* 2000;135:332-338
489. Vasakova M, Sterclova M, Kolesar L, Slavcev A, Pohunek P, Sulc J, Skibova J, Striz I. Bronchoalveolar lavage fluid cellular characteristics, functional parameters and cytokine and chemokine levels in interstitial lung diseases. *Scand J Immunol.* 2009;69:268-274
490. Ando M, Miyazaki E, Ito T, Hiroshige S, Nureki SI, Ueno T, Takenaka R, Fukami T, Kumamoto T. Significance of serum vascular endothelial growth factor level in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Lung.* 2010;188:247-252
491. Saito A, Okazaki H, Sugawara I, Yamamoto K, Takizawa H. Potential action of il-4 and il-13 as fibrogenic factors on lung fibroblasts in vitro. *Int Arch Allergy Immunol.* 2003;132:168-176
492. Ingram JL, Rice AB, Geisenhoffer K, Madtes DK, Bonner JC. Il-13 and il-1beta promote lung fibroblast growth through coordinated up-regulation of pdgf-aa and pdgf-ralpha. *Faseb J.* 2004;18:1132-1134
493. Oriente A, Fedarko NS, Pacocha SE, Huang SK, Lichtenstein LM, Essayan DM. Interleukin-13 modulates collagen homeostasis in human skin and keloid fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;292:988-994
494. Murray LA, Argentieri RL, Farrell FX, Bracht M, Sheng H, Whitaker B, Beck H, Tsui P, Cochlin K, Evanoff HL, Hogaboam CM, Das AM. Hyper-responsiveness of ipf/uip fibroblasts: Interplay between tgfbeta1, il-13 and ccl2. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40:2174-2182
495. Corren J, Lemanske RF, Hanania NA, Korenblat PE, Parsey MV, Arron JR, Harris JM, Scheerens H, Wu LC, Su Z, Mosesova S, Eisner MD, Bohen SP, Matthews JG. Lebrikizumab treatment in adults with asthma. *N Engl J Med.* 2011;365:1088-1098
496. Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: Regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest.* 2001;107:1055-1061
497. O'Regan A, Berman JS. Osteopontin: A key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *Int J Exp Pathol.* 2000;81:373-390
498. Takahashi F, Takahashi K, Okazaki T, Maeda K, Ienaga H, Maeda M, Kon S, Uede T, Fukuchi Y. Role of osteopontin in the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;24:264-271
499. Pardo A, Gibson K, Cisneros J, Richards TJ, Yang Y, Becerril C, Yousem S, Herrera I, Ruiz V, Selman M, Kaminski N. Up-regulation and profibrotic role of osteopontin in human idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS Med.* 2005;2:e251
500. Kadota J, Mizunoe S, Mito K, Mukae H, Yoshioka S, Kawakami K, Koguchi Y, Fukushima K, Kon S, Kohno S, Saito A, Uede T, Nasu M. High plasma concentrations of osteopontin in patients with interstitial pneumonia. *Respir Med.* 2005;99:111-117
501. Cai J, Parr C, Watkins G, Jiang WG, Boulton M. Decreased pigment epithelium-derived factor expression in human breast cancer progression. *Clin Cancer Res.* 2006;12:3510-3517
502. Rychli K, Niessner A, Hohensinner PJ, Mahdy Ali K, Kaun C, Neuhold S, Zorn G, Richter B, Hulsmann M, Berger R, Mortl D, Huber K, Maurer G, Pacher R, Wojta J. Prognostic value of pigment epithelium-derived factor in patients with advanced heart failure. *Chest.* 2010;138:656-664
503. Uehara H, Miyamoto M, Kato K, Ebihara Y, Kaneko H, Hashimoto H, Murakami Y, Hase R, Takahashi R, Mega S, Shichinohe T, Kawarada Y, Itoh T, Okushiba S, Kondo S, Katoh H. Expression of pigment epithelium-derived factor decreases liver metastasis and correlates with favorable prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2004;64:3533-3537
504. Zhang L, Chen J, Ke Y, Mansel RE, Jiang WG. Expression of pigment epithelial derived factor is reduced in non-small cell lung cancer and is linked to clinical outcome. *Int J Mol Med.* 2006;17:937-944
505. Benisty JJ, McLaughlin VV, Landzberg MJ, Rich JD, Newburger JW, Rich S, Folkman J. Elevated basic fibroblast growth factor levels in patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest.* 2004;126:1255-1261
506. Izikki M, Guignabert C, Fadel E, Humbert M, Tu L, Zadigue P, Dartevelle P, Simonneau G, Adnot S, Maitre B, Raffestin B, Eddahibi S. Endothelial-derived fgf2 contributes to the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents. *J Clin Invest.* 2009;119:512-523
507. Fredriksson L, Li H, Eriksson U. The pdgf family: Four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15:197-204
508. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev.* 1999;79:1283-1316
509. Lindahl P, Johansson BR, Leveen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in pdgf-b-deficient mice. *Science.* 1997;277:242-245
510. Hellstrom M, Gerhardt H, Kalen M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, Betsholtz C. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol.* 2001;153:543-553
511. Otrock ZK, Mahfouz RA, Makarem JA, Shamseddine AI. Understanding the biology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells Mol Dis.* 2007;39:212-220
512. Homma S, Nagaoka I, Abe H, Takahashi K, Seyama K, Nukiwa T, Kira S. Localization of platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor i in the fibrotic lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;152:2084-2089
513. Antoniadou HN, Bravo MA, Avila RE, Galanopoulos T, Neville-Golden J, Maxwell M, Selman M. Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest.* 1990;86:1055-1064
514. Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, Sydykov A, Lai YJ, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F. Reversal of experimental pulmonary hypertension by pdgf inhibition. *J Clin Invest.* 2005;115:2811-2821
515. Clamp AR, Jayson GC. The clinical potential of antiangiogenic fragments of extracellular matrix proteins. *Br J Cancer.* 2005;93:967-972

516. Paddenberg R, Faulhammer P, Goldenberg A, Kummer W. Hypoxia-induced increase of endostatin in murine aorta and lung. *Histochem Cell Biol.* 2006;125:497-508
517. Masaki T, Yanagisawa M, Goto K. Physiology and pharmacology of endothelins. *Med Res Rev.* 1992;12:391-421
518. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 1993;328:1732-1739
519. Dupuis J, Prie S. The et(a)-receptor antagonist lu 135252 prevents the progression of established pulmonary hypertension induced by monocrotaline in rats. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 1999;4:33-39
520. Park SH, Saleh D, Giaid A, Michel RP. Increased endothelin-1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis and the effect of an endothelin receptor antagonist. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156:600-608
521. Trakada G, Spiropoulos K. Arterial endothelin-1 in interstitial lung disease patients with pulmonary hypertension. *Monaldi Arch Chest Dis.* 2001;56:379-383
522. Comellas AP, Briva A. Role of endothelin-1 in acute lung injury. *Transl Res.* 2009;153:263-271
523. Sofia M, Mormile M, Faraone S, Alifano M, Carratu P, Carratu L. Endothelin-1 excretion in urine in active pulmonary sarcoidosis and in other interstitial lung diseases. *Sarcoidosis.* 1995;12:118-123
524. Jeffery TK, Morrell NW. Molecular and cellular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Prog Cardiovasc Dis.* 2002;45:173-202
525. Morrell NW, Higham MA, Phillips PG, Shakur BH, Robinson PJ, Beddoes RJ. Pilot study of losartan for pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res.* 2005;6:88
526. Wang R, Ibarra-Sunga O, Verlinski L, Pick R, Uhal BD. Abrogation of bleomycin-induced epithelial apoptosis and lung fibrosis by captopril or by a caspase inhibitor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;279:L143-151
527. Wang R, Zagariya A, Ibarra-Sunga O, Gidea C, Ang E, Deshmukh S, Chaudhary G, Baraboutis J, Filippatos G, Uhal BD. Angiotensin ii induces apoptosis in human and rat alveolar epithelial cells. *Am J Physiol.* 1999;276:L885-889
528. Maniatis NA, Kotanidou A, Catravas JD, Orfanos SE. Endothelial pathomechanisms in acute lung injury. *Vascul Pharmacol.* 2008;49:119-133
529. Specks U, Martin WJ, 2nd, Rohrbach MS. Bronchoalveolar lavage fluid angiotensin-converting enzyme in interstitial lung diseases. *Am Rev Respir Dis.* 1990;141:117-123
530. Kim W, Moon SO, Lee SY, Jang KY, Cho CH, Koh GY, Choi KS, Yoon KH, Sung MJ, Kim DH, Lee S, Kang KP, Park SK. Comp-angiotensin-1 ameliorates renal fibrosis in a unilateral ureteral obstruction model. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:2474-2483
531. Long DA, Price KL, Ioffe E, Gannon CM, Gnudi L, White KE, Yancopoulos GD, Rudge JS, Woolf AS. Angiotensin-1 therapy enhances fibrosis and inflammation following folic acid-induced acute renal injury. *Kidney Int.* 2008;74:300-309
532. Sullivan CC, Du L, Chu D, Cho AJ, Kido M, Wolf PL, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Induction of pulmonary hypertension by an angiotensin 1/tie2/serotonin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:12331-12336
533. Zhao YD, Campbell AI, Robb M, Ng D, Stewart DJ. Protective role of angiotensin-1 in experimental pulmonary hypertension. *Circ Res.* 2003;92:984-991
534. Hiwatari N, Shimura S, Yamauchi K, Nara M, Hida W, Shirato K. Significance of elevated procollagen-iii-peptide and transforming growth factor-beta levels of bronchoalveolar lavage fluids from idiopathic pulmonary fibrosis patients. *Tohoku J Exp Med.* 1997;181:285-295
535. Meloni F, Caporali R, Marone Bianco A, Paschetto E, Morosini M, Fietta AM, Patrizio V, Bobbio-Pallavicini F, Pozzi E, Montecucco C. Bal cytokine profile in different interstitial lung diseases: A focus on systemic sclerosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2004;21:111-118
536. Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med.* 2000;342:1350-1358
537. Shi Y, Massague J. Mechanisms of tgf-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 2003;113:685-700
538. McCartney-Francis NL, Wahl SM. Transforming growth factor beta: A matter of life and death. *J Leukoc Biol.* 1994;55:401-409
539. Massague J. How cells read tgf-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1:169-178
540. Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Ten Dijke P. Signaling of transforming growth factor-beta family members through smad proteins. *Eur J Biochem.* 2000;267:6954-6967
541. Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. Smad regulation in tgf-beta signal transduction. *J Cell Sci.* 2001;114:4359-4369
542. Derynck R, Feng XH. Tgf-beta receptor signaling. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1333:F105-150
543. Sirard C, Kim S, Mirtsos C, Tadich P, Hoodless PA, Itie A, Maxson R, Wrana JL, Mak TW. Targeted disruption in murine cells reveals variable requirement for smad4 in transforming growth factor beta-related signaling. *J Biol Chem.* 2000;275:2063-2070
544. Durocher D, Taylor IA, Sarbassova D, Haire LF, Westcott SL, Jackson SP, Smerdon SJ, Yaffe MB. The molecular basis of fha domain:Phosphopeptide binding specificity and implications for phospho-dependent signaling mechanisms. *Mol Cell.* 2000;6:1169-1182
545. Choy L, Skillington J, Derynck R. Roles of autocrine tgf-beta receptor and smad signaling in adipocyte differentiation. *J Cell Biol.* 2000;149:667-682
546. Arora K, Warrior R. A new smurf in the village. *Dev Cell.* 2001;1:441-442
547. Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, Wrana JL, Thomsen GH. A smad ubiquitin ligase targets the bmp pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature.* 1999;400:687-693
548. Zhang Y, Chang C, Gehling DJ, Hemmati-Brivanlou A, Derynck R. Regulation of smad degradation and activity by smurf2, an e3 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:974-979
549. Bonni S, Wang HR, Causing CG, Kavsak P, Stroschein SL, Luo K, Wrana JL. Tgf-beta induces assembly of a smad2-smurf2 ubiquitin ligase complex that targets snon for degradation. *Nat Cell Biol.* 2001;3:587-595
550. Lo RS, Massague J. Ubiquitin-dependent degradation of tgf-beta-activated smad2. *Nat Cell Biol.* 1999;1:472-478
551. Fukuchi M, Imamura T, Chiba T, Ebisawa T, Kawabata M, Tanaka K, Miyazono K. Ligand-dependent degradation of smad3 by a ubiquitin ligase complex of roc1 and associated proteins. *Mol Biol Cell.* 2001;12:1431-1443
552. Inman GJ, Nicolas FJ, Hill CS. Nucleocytoplasmic shuttling of smads 2, 3, and 4 permits sensing of tgf-beta receptor activity. *Mol Cell.* 2002;10:283-294
553. Xu L, Kang Y, Col S, Massague J. Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins can/nup214 and nup153 feeds tgf-beta signaling complexes in the cytoplasm and nucleus. *Mol Cell.* 2002;10:271-282

554. Lee PS, Chang C, Liu D, Derynck R. Sumoylation of smad4, the common smad mediator of transforming growth factor-beta family signaling. *J Biol Chem.* 2003;278:27853-27863
555. Xu J, Attisano L. Mutations in the tumor suppressors smad2 and smad4 inactivate transforming growth factor beta signaling by targeting smads to the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:4820-4825
556. Wan M, Cao X, Wu Y, Bai S, Wu L, Shi X, Wang N. Jab1 antagonizes tgfbeta signaling by inducing smad4 degradation. *EMBO Rep.* 2002;3:171-176
557. Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, Wrana JL. Smad7 binds to smurf2 to form an e3 ubiquitin ligase that targets the tgfbeta receptor for degradation. *Mol Cell.* 2000;6:1365-1375
558. Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, Chiba T, Tanaka K, Imamura T, Miyazono K. Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type i receptor through smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem.* 2001;276:12477-12480
559. Di Guglielmo GM, Le Roy C, Goodfellow AF, Wrana JL. Distinct endocytic pathways regulate tgfbeta receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol.* 2003;5:410-421
560. Wu JW, Hu M, Chai J, Seoane J, Huse M, Li C, Rigotti DJ, Kyin S, Muir TW, Fairman R, Massague J, Shi Y. Crystal structure of a phosphorylated smad2. Recognition of phosphoserine by the mh2 domain and insights on smad function in tgfbeta signaling. *Mol Cell.* 2001;8:1277-1289
561. Chacko BM, Qin B, Correia JJ, Lam SS, de Caestecker MP, Lin K. The I3 loop and c-terminal phosphorylation jointly define smad protein trimerization. *Nat Struct Biol.* 2001;8:248-253
562. Inman GJ, Hill CS. Stoichiometry of active smad-transcription factor complexes on DNA. *J Biol Chem.* 2002;277:51008-51016
563. Feng XH, Lin X, Derynck R. Smad2, smad3 and smad4 cooperate with sp1 to induce p15(ink4b) transcription in response to tgfbeta. *Embo J.* 2000;19:5178-5193
564. Watanabe M, Masuyama N, Fukuda M, Nishida E. Regulation of intracellular dynamics of smad4 by its leucine-rich nuclear export signal. *EMBO Rep.* 2000;1:176-182
565. Xiao Z, Watson N, Rodriguez C, Lodish HF. Nucleocytoplasmic shuttling of smad1 conferred by its nuclear localization and nuclear export signals. *J Biol Chem.* 2001;276:39404-39410
566. Xu L, Chen YG, Massague J. The nuclear import function of smad2 is masked by sara and unmasked by tgfbeta-dependent phosphorylation. *Nat Cell Biol.* 2000;2:559-562
567. Kurisaki A, Kose S, Yoneda Y, Heldin CH, Moustakas A. Transforming growth factor-beta induces nuclear import of smad3 in an importin-beta1 and ran-dependent manner. *Mol Biol Cell.* 2001;12:1079-1091
568. Masuyama N, Hanafusa H, Kusakabe M, Shibuya H, Nishida E. Identification of two smad4 proteins in xenopus. Their common and distinct properties. *J Biol Chem.* 1999;274:12163-12170
569. Itoh F, Asao H, Sugamura K, Heldin CH, ten Dijke P, Itoh S. Promoting bone morphogenetic protein signaling through negative regulation of inhibitory smads. *Embo J.* 2001;20:4132-4142
570. Hanyu A, Ishidou Y, Ebisawa T, Shimanuki T, Imamura T, Miyazono K. The n domain of smad7 is essential for specific inhibition of transforming growth factor-beta signaling. *J Cell Biol.* 2001;155:1017-1027
571. Bai S, Cao X. A nuclear antagonistic mechanism of inhibitory smads in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem.* 2002;277:4176-4182
572. Pulaski L, Landstrom M, Heldin CH, Souchelnytskyi S. Phosphorylation of smad7 at ser-249 does not interfere with its inhibitory role in transforming growth factor-beta-dependent signaling but affects smad7-dependent transcriptional activation. *J Biol Chem.* 2001;276:14344-14349
573. Gronroos E, Hellman U, Heldin CH, Ericsson J. Control of smad7 stability by competition between acetylation and ubiquitination. *Mol Cell.* 2002;10:483-493
574. de Caestecker MP, Parks WT, Frank CJ, Castagnino P, Bottaro DP, Roberts AB, Lechleider RJ. Smad2 transduces common signals from receptor serine-threonine and tyrosine kinases. *Genes Dev.* 1998;12:1587-1592
575. Kretzschmar M, Doody J, Timokhina I, Massague J. A mechanism of repression of tgfbeta/ smad signaling by oncogenic ras. *Genes Dev.* 1999;13:804-816
576. Funaba M, Zimmerman CM, Mathews LS. Modulation of smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase. *J Biol Chem.* 2002;277:41361-41368
577. Engel ME, McDonnell MA, Law BK, Moses HL. Interdependent smad and jnk signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. *J Biol Chem.* 1999;274:37413-37420
578. Janda E, Lehmann K, Killisch I, Jechlinger M, Herzig M, Downward J, Beug H, Grunert S. Ras and tgfbeta cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: Dissection of ras signaling pathways. *J Cell Biol.* 2002;156:299-313
579. Grimm OH, Gurdon JB. Nuclear exclusion of smad2 is a mechanism leading to loss of competence. *Nat Cell Biol.* 2002;4:519-522
580. Brown JD, DiChiara MR, Anderson KR, Gimbrone MA, Jr., Topper JN. Mekk-1, a component of the stress (stress-activated protein kinase/c-jun n-terminal kinase) pathway, can selectively activate smad2-mediated transcriptional activation in endothelial cells. *J Biol Chem.* 1999;274:8797-8805
581. Wicks SJ, Lui S, Abdel-Wahab N, Mason RM, Chantry A. Inactivation of smad-transforming growth factor beta signaling by ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase ii. *Mol Cell Biol.* 2000;20:8103-8111
582. Yakymovych I, Ten Dijke P, Heldin CH, Souchelnytskyi S. Regulation of smad signaling by protein kinase c. *Faseb J.* 2001;15:553-555
583. Chen CR, Kang Y, Siegel PM, Massague J. E2f4/5 and p107 as smad cofactors linking the tgfbeta receptor to c-myc repression. *Cell.* 2002;110:19-32
584. Kang Y, Chen CR, Massague J. A self-enabling tgfbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor atf3 for id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell.* 2003;11:915-926
585. Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschuere K, van Grunsven L, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroeck D, van Roy F. The two-handed e box binding zinc finger protein sip1 downregulates e-cadherin and induces invasion. *Mol Cell.* 2001;7:1267-1278
586. Alliston T, Choy L, Ducy P, Karsenty G, Derynck R. Tgfbeta-induced repression of cbfa1 by smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *Embo J.* 2001;20:2254-2272
587. Liu D, Black BL, Derynck R. Tgfbeta inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by smad3. *Genes Dev.* 2001;15:2950-2966

588. Choy L, Derynck R. Transforming growth factor-beta inhibits adipocyte differentiation by smad3 interacting with ccaat/enhancer-binding protein (c/ebp) and repressing c/ebp transactivation function. *J Biol Chem.* 2003;278:9609-9619
589. Liberati NT, Moniwa M, Borton AJ, Davie JR, Wang XF. An essential role for mad homology domain 1 in the association of smad3 with histone deacetylase activity\*. *J Biol Chem.* 2001;276:22595-22603
590. Choy L, Derynck R. The type ii transforming growth factor (tgf)-beta receptor-interacting protein trip-1 acts as a modulator of the tgf-beta response. *J Biol Chem.* 1998;273:31455-31462
591. McGonigle S, Beall MJ, Pearce EJ. Eukaryotic initiation factor 2 alpha subunit associates with tgf beta receptors and 14-3-3 epsilon and acts as a modulator of the tgf beta response. *Biochemistry.* 2002;41:579-587
592. Griswold-Prenner I, Kamibayashi C, Maruoka EM, Mumby MC, Derynck R. Physical and functional interactions between type i transforming growth factor beta receptors and balpha, a wd-40 repeat subunit of phosphatase 2a. *Mol Cell Biol.* 1998;18:6595-6604
593. Datta PK, Moses HL. Strap and smad7 synergize in the inhibition of transforming growth factor beta signaling. *Mol Cell Biol.* 2000;20:3157-3167
594. Huse M, Chen YG, Massague J, Kuriyan J. Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type i tgf beta receptor in complex with fkbp12. *Cell.* 1999;96:425-436
595. Yao D, Dore JJ, Jr., Leof EB. Fkbp12 is a negative regulator of transforming growth factor-beta receptor internalization. *J Biol Chem.* 2000;275:13149-13154
596. Aghdasi B, Ye K, Resnick A, Huang A, Ha HC, Guo X, Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH. Fkbp12, the 12-kda fk506-binding protein, is a physiologic regulator of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:2425-2430
597. Ventura F, Liu F, Doody J, Massague J. Interaction of transforming growth factor-beta receptor i with farnesyl-protein transferase-alpha in yeast and mammalian cells. *J Biol Chem.* 1996;271:13931-13934
598. Yu L, Hebert MC, Zhang YE. Tgf-beta receptor-activated p38 map kinase mediates smad-independent tgf-beta responses. *Embo J.* 2002;21:3749-3759
599. Yue J, Mulder KM. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by transforming growth factor-beta. *Methods Mol Biol.* 2000;142:125-131
600. Yamaguchi K, Nagai S, Ninomiya-Tsuji J, Nishita M, Tamai K, Irie K, Ueno N, Nishida E, Shibuya H, Matsumoto K. Xiap, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to tab1-tak1 in the bmp signaling pathway. *Embo J.* 1999;18:179-187
601. Salvesen GS, Duckett CS. Iap proteins: Blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3:401-410
602. Bakin AV, Rinehart C, Tomlinson AK, Arteaga CL. P38 mitogen-activated protein kinase is required for tgf-beta-mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration. *J Cell Sci.* 2002;115:3193-3206
603. Zavadil J, Bitzer M, Liang D, Yang YC, Massimi A, Kneitz S, Piek E, Bottinger EP. Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:6686-6691
604. Kimura N, Matsuo R, Shibuya H, Nakashima K, Taga T. Bmp2-induced apoptosis is mediated by activation of the tak1-p38 kinase pathway that is negatively regulated by smad6. *J Biol Chem.* 2000;275:17647-17652
605. Mazars A, Lallemand F, Prunier C, Marais J, Ferrand N, Pessah M, Cherqui G, Atfi A. Evidence for a role of the jnk cascade in smad7-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 2001;276:36797-36803
606. Pessah M, Marais J, Prunier C, Ferrand N, Lallemand F, Mauviel A, Atfi A. C-jun associates with the oncoprotein ski and suppresses smad2 transcriptional activity. *J Biol Chem.* 2002;277:29094-29100
607. Bhowmick NA, Ghiassi M, Bakin A, Aakre M, Lundquist CA, Engel ME, Arteaga CL, Moses HL. Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a rhoa-dependent mechanism. *Mol Biol Cell.* 2001;12:27-36
608. Edlund S, Landstrom M, Heldin CH, Aspenstrom P. Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small gtpases cdc42 and rhoa. *Mol Biol Cell.* 2002;13:902-914
609. Engel ME, Datta PK, Moses HL. Rhob is stabilized by transforming growth factor beta and antagonizes transcriptional activation. *J Biol Chem.* 1998;273:9921-9926
610. Shen X, Li J, Hu PP, Waddell D, Zhang J, Wang XF. The activity of guanine exchange factor net1 is essential for transforming growth factor-beta-mediated stress fiber formation. *J Biol Chem.* 2001;276:15362-15368
611. Bishop AL, Hall A. Rho gtpases and their effector proteins. *Biochem J.* 2000;348 Pt 2:241-255
612. Bakin AV, Tomlinson AK, Bhowmick NA, Moses HL, Arteaga CL. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem.* 2000;275:36803-36810
613. Vinals F, Pouyssegur J. Transforming growth factor beta1 (tgf-beta1) promotes endothelial cell survival during in vitro angiogenesis via an autocrine mechanism implicating tgf-alpha signaling. *Mol Cell Biol.* 2001;21:7218-7230
614. Miettinen PJ, Ebner R, Lopez AR, Derynck R. Tgf-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: Involvement of type i receptors. *J Cell Biol.* 1994;127:2021-2036
615. Piek E, Moustakas A, Kurisaki A, Heldin CH, ten Dijke P. Tgf-(beta) type i receptor/alk-5 and smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in nmumg breast epithelial cells. *J Cell Sci.* 1999;112 ( Pt 24):4557-4568
616. Petritsch C, Beug H, Balmain A, Oft M. Tgf-beta inhibits p70 s6 kinase via protein phosphatase 2a to induce g(1) arrest. *Genes Dev.* 2000;14:3093-3101
617. Bennett D, Alphey L. Pp1 binds sara and negatively regulates dpp signaling in drosophila melanogaster. *Nat Genet.* 2002;31:419-423
618. Stroschein SL, Bonni S, Wrana JL, Luo K. Smad3 recruits the anaphase-promoting complex for ubiquitination and degradation of snon. *Genes Dev.* 2001;15:2822-2836
619. Wan Y, Liu X, Kirschner MW. The anaphase-promoting complex mediates tgf-beta signaling by targeting snon for destruction. *Mol Cell.* 2001;8:1027-1039
620. Nathan SD, Noble PW, Tudor RM. Idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension: Connecting the dots. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175:875-880
621. Fadini GP, Avogaro A, Ferraccioli G, Agostini C. Endothelial progenitors in pulmonary hypertension: New pathophysiology and therapeutic implications. *Eur Respir J.* 2010;35:418-425

622. Smadja DM, Mauge L, Gaussem P, d'Audigier C, Israel-Biet D, Celermajer DS, Bonnet D, Levy M. Treprostinil increases the number and angiogenic potential of endothelial progenitor cells in children with pulmonary hypertension. *Angiogenesis*. 2011;14:17-27
623. Tsimikas S. Oxidized low-density lipoprotein biomarkers in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2006;8:55-61
624. Tsimikas S, Kiechl S, Willeit J, Mayr M, Miller ER, Kronenberg F, Xu Q, Bergmark C, Weger S, Oberhollenzer F, Witztum JL. Oxidized phospholipids predict the presence and progression of carotid and femoral atherosclerosis and symptomatic cardiovascular disease: Five-year prospective results from the bruneck study. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47:2219-2228
625. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Plasma concentration of c-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. *Circulation*. 1998;97:425-428
626. Vu JD, Vu JB, Pio JR, Malik S, Franklin SS, Chen RS, Wong ND. Impact of c-reactive protein on the likelihood of peripheral arterial disease in united states adults with the metabolic syndrome, diabetes mellitus, and preexisting cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 2005;96:655-658
627. Vainas T, Stassen FR, de Graaf R, Twiss EL, Herengreen 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;42:243-251
628. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105:1135-1143
629. Findley CM, Mitchell RG, Duscha BD, Annex BH, Kontos CD. Plasma levels of soluble tie2 and vascular endothelial growth factor distinguish critical limb ischemia from intermittent claudication in patients with peripheral arterial disease. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:387-393
630. Ho M, Yang E, Matcuk G, Deng D, Sampas N, Tsalenko A, Tabibiazar R, Zhang Y, Chen M, Talbi S, Ho YD, Wang J, Tsao PS, Ben-Dor A, Yakhini Z, Bruhn L, Quertermous T. Identification of endothelial cell genes by combined database mining and microarray analysis. *Physiol Genomics*. 2003;13:249-262
631. Vanhoutte PM, Miller VM. Heterogeneity of endothelium-dependent responses in mammalian blood vessels. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1985;7 Suppl 3:S12-23
632. Luscher TF, Cooke JP, Houston DS, Neves RJ, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent relaxations in human arteries. *Mayo Clin Proc*. 1987;62:601-606
633. Kunkel EJ, Butcher EC. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity*. 2002;16:1-4
634. Geary RL, Wong JM, Rossini A, Schwartz SM, Adams LD. Expression profiling identifies 147 genes contributing to a unique primate neointimal smooth muscle cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:2010-2016
635. Deng DX, Tsalenko A, Vailaya A, Ben-Dor A, Kundu R, Estay I, Tabibiazar R, Kincaid R, Yakhini Z, Bruhn L, Quertermous T. Differences in vascular bed disease susceptibility reflect differences in gene expression response to atherogenic stimuli. *Circ Res*. 2006;98:200-208
636. Tzoulaki I, Murray GD, Lee AJ, Rumley A, Lowe GD, Fowkes FG. C-reactive protein, interleukin-6, and soluble adhesion molecules as predictors of progressive peripheral atherosclerosis in the general population: Edinburgh artery study. *Circulation*. 2005;112:976-983
637. Murabito JM, Keyes MJ, Guo CY, Keaney JF, Jr., Vasan RS, D'Agostino RB, Sr., Benjamin EJ. Cross-sectional relations of multiple inflammatory biomarkers to peripheral arterial disease: The framingham offspring study. *Atherosclerosis*. 2009;203:509-514
638. Mittermayer F, Krzyzanowska K, Exner M, Mlekusch W, Amighi J, Sabeti S, Minar E, Muller M, Wolzt M, Schillinger M. Asymmetric dimethylarginine predicts major adverse cardiovascular events in patients with advanced peripheral artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:2536-2540
639. Krzyzanowska K, Mittermayer F, Krugluger W, Schnack C, Hofer M, Wolzt M, Scherthaner G. Asymmetric dimethylarginine is associated with macrovascular disease and total homocysteine in patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 2006;189:236-240
640. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: A novel marker of atherosclerosis. *Circulation*. 1999;99:1141-1146
641. Boger RH, Bode-Boger SM, Thiele W, Junker W, Alexander K, Frolich JC. Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation*. 1997;95:2068-2074
642. Brevetti G, Schiano V, Chiariello M. Cellular adhesion molecules and peripheral arterial disease. *Vasc Med*. 2006;11:39-47
643. Kappelmayer J, Nagy B, Jr., Miszti-Blasius K, Hevessy Z, Setiadi H. The emerging value of p-selectin as a disease marker. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42:475-486
644. Lee AJ, MacGregor AS, Hau CM, Price JF, Rumley A, Lowe GD, Fowkes FG. The role of haematological factors in diabetic peripheral arterial disease: The edinburgh artery study. *Br J Haematol*. 1999;105:648-654
645. Yoshitomi Y, Kojima S, Umemoto T, Kubo K, Matsumoto Y, Yano M, Sugi T, Kuramochi M. Serum hepatocyte growth factor in patients with peripheral arterial occlusive disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:2425-2428
646. Fraley AE, Tsimikas S. Clinical applications of circulating oxidized low-density lipoprotein biomarkers in cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*. 2006;17:502-509
647. Sutton-Tyrrell K, Evans RW, Meilahn E, Alcorn HG. Lipoprotein(a) and peripheral atherosclerosis in older adults. *Atherosclerosis*. 1996;122:11-19
648. Malinow MR. Plasma homocyst(e)ine and arterial occlusive diseases: A mini-review. *Clin Chem*. 1995;41:173-176
649. Loffredo L, Marcocchia A, Pignatelli P, Andreozzi P, Borgia MC, Cangemi R, Chiarotti F, Violi F. Oxidative-stress-mediated arterial dysfunction in patients with peripheral arterial disease. *Eur Heart J*. 2007;28:608-612
650. Mueller T, Dieplinger B, Gegenhuber A, Haidinger D, Schmid N, Roth N, Ebner F, Landl M, Poelz W, Haltmayer M. Serum total 8-iso-prostaglandin f2alpha: A new and independent predictor of peripheral arterial disease. *J Vasc Surg*. 2004;40:768-773
651. Seigneur M, Dufourcq P, Conri C, Constans J, Mercie P, Pruvost A, Amirat J, Midy D, Baste JC, Boisseau MR. Levels of plasma thrombomodulin are increased in atheromatous arterial disease. *Thromb Res*. 1993;71:423-431
652. Mustonen P, Lepantalo M, Lassila R. Physical exertion induces thrombin formation and fibrin degradation in patients with peripheral atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:244-249
653. Vidula H, Tian L, Liu K, Criqui MH, Ferrucci L, Pearce WH, Greenland P, Green D, Tan J, Garside DB, Guralnik J, Ridker PM, Rifai N, McDermott MM. Biomarkers of inflammation and thrombosis as predictors of near-term mortality in patients with peripheral arterial disease: A cohort study. *Ann Intern Med*. 2008;148:85-93

654. Snyder N, Nguyen A, Gajula L, Soloway R, Xiao SY, Lau DT, Petersen J. The apri may be enhanced by the use of the fibrospect ii in the estimation of fibrosis in chronic hepatitis c. *Clin Chim Acta*. 2007;381:119-123
655. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER, Wickerham DL, Bryant J, Wolmark N. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351:2817-2826
656. Wang TJ, Gona P, Larson MG, Tofler GH, Levy D, Newton-Cheh C, Jacques PF, Rifai N, Selhub J, Robins SJ, Benjamin EJ, D'Agostino RB, Vasani RS. Multiple biomarkers for the prediction of first major cardiovascular events and death. *N Engl J Med*. 2006;355:2631-2639
657. Fung ET, Wilson AM, Zhang F, Harris N, Edwards KA, Olin JW, Cooke JP. A biomarker panel for peripheral arterial disease. *Vasc Med*. 2008;13:217-224
658. Brechot N, Gomez E, Bignon M, Khallou-Laschet J, Dussiot M, Cazes A, Alanio-Brechot C, Durand M, Philippe J, Silvestre JS, Van Rooijen N, Corvol P, Nicoletti A, Chazaud B, Germain S. Modulation of macrophage activation state protects tissue from necrosis during critical limb ischemia in thrombospondin-1-deficient mice. *PLoS One*. 2008;3:e3950
659. Favier J, Germain S, Emmerich J, Corvol P, Gasc JM. Critical overexpression of thrombospondin 1 in chronic leg ischaemia. *J Pathol*. 2005;207:358-366
660. Lawler J, Hynes RO. The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins. *J Cell Biol*. 1986;103:1635-1648
661. Carlson CB, Lawler J, Mosher DF. Structures of thrombospondins. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65:672-686
662. Xiao Y, Kleeff J, Guo J, Gazdhar A, Liao Q, Di Cesare PE, Buchler MW, Friess H. Cartilage oligomeric matrix protein expression in hepatocellular carcinoma and the cirrhotic liver. *J Gastroenterol Hepatol*. 2004;19:296-302
663. Li N, Jian X, Hu Y, Xu C, Yao Z, Zhong X. Discovery of novel biomarkers in oral submucous fibrosis by microarray analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17:2249-2259
664. van Doorn R, Zoutman WH, Dijkman R, de Menezes RX, Commandeur S, Mulder AA, van der Velden PA, Vermeer MH, Willemze R, Yan PS, Huang TH, Tensen CP. Epigenetic profiling of cutaneous t-cell lymphoma: Promoter hypermethylation of multiple tumor suppressor genes including bcl7a, p16, and p73. *J Clin Oncol*. 2005;23:3886-3896
665. Korkola JE, DeVries S, Fridlyand J, Hwang ES, Estep AL, Chen YY, Chew KL, Dairkee SH, Jensen RM, Waldman FM. Differentiation of lobular versus ductal breast carcinomas by expression microarray analysis. *Cancer Res*. 2003;63:7167-7175
666. Sugimura J, Yang XJ, Tretiakova MS, Takahashi M, Kort EJ, Fulton B, Fujioka T, Vogelzang NJ, Teh BT. Gene expression profiling of mesoblastic nephroma and wilms tumors--comparison and clinical implications. *Urology*. 2004;64:362-368; discussion 368
667. Dalla-Torre CA, Yoshimoto M, Lee CH, Joshua AM, de Toledo SR, Petrilli AS, Andrade JA, Chilton-MacNeill S, Zielenska M, Squire JA. Effects of thbs3, sparc and spp1 expression on biological behavior and survival in patients with osteosarcoma. *BMC Cancer*. 2006;6:237
668. Kazerounian S, Yee KO, Lawler J. Thrombospondins in cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65:700-712
669. Stenina OI, Topol EJ, Plow EF. Thrombospondins, their polymorphisms, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:1886-1894
670. Kato K, Oguri M, Kato N, Hibino T, Yajima K, Yoshida T, Metoki N, Yoshida H, Satoh K, Watanabe S, Yokoi K, Murohara T, Yamada Y. Assessment of genetic risk factors for thoracic aortic aneurysm in hypertensive patients. *Am J Hypertens*. 2008;21:1023-1027
671. Koch W, Hoppmann P, de Waha A, Schomig A, Kastrati A. Polymorphisms in thrombospondin genes and myocardial infarction: A case-control study and a meta-analysis of available evidence. *Hum Mol Genet*. 2008;17:1120-1126
672. Sfar S, Saad H, Mosbah F, Gabbouj S, Chouchane L. Tsp1 and mmp9 genetic variants in sporadic prostate cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 2007;172:38-44
673. Bornstein P. Diversity of function is inherent in matricellular proteins: An appraisal of thrombospondin 1. *J Cell Biol*. 1995;130:503-506
674. Roberts DD, Miller TW, Rogers NM, Yao M, Isenberg JS. The matricellular protein thrombospondin-1 globally regulates cardiovascular function and responses to stress via cd47. *Matrix Biol*. 2012;31:162-169
675. Dudzinski DM, Michel T. Life history of enos: Partners and pathways. *Cardiovasc Res*. 2007;75:247-260
676. Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, Flores-Santana W, Switzer CH, Donzelli S, Hussain P, Vecoli C, Paolucci N, Ambs S, Colton CA, Harris CC, Roberts DD, Wink DA. The chemical biology of nitric oxide: Implications in cellular signaling. *Free Radic Biol Med*. 2008;45:18-31
677. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An l-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:5193-5197
678. Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:521-534
679. Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO, Buerk DG, Huang PL, Jain RK. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:2604-2609
680. Babaei S, Teichert-Kuliszewska K, Zhang Q, Jones N, Dumont DJ, Stewart DJ. Angiogenic actions of angiotensin-1 require endothelium-derived nitric oxide. *Am J Pathol*. 2003;162:1927-1936
681. Urano T, Ito Y, Akao M, Sawa T, Miyata K, Tabata M, Morisada T, Hato T, Yano M, Kadomatsu T, Yasunaga K, Shibata R, Murohara T, Akaike T, Tanihara H, Suda T, Oike Y. Angiotensin-related growth factor enhances blood flow via activation of the erk1/2-enos-no pathway in a mouse hind-limb ischemia model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:827-834
682. Babaei S, Teichert-Kuliszewska K, Monge JC, Mohamed F, Bendeck MP, Stewart DJ. Role of nitric oxide in the angiogenic response in vitro to basic fibroblast growth factor. *Circ Res*. 1998;82:1007-1015
683. Guerrero D, Guarch R, Ojer A, Casas JM, Ropero S, Mancha A, Pesce C, Lloveras B, Garcia-Bragado F, Puras A. Hypermethylation of the thrombospondin-1 gene is associated with poor prognosis in penile squamous cell carcinoma. *BJU Int*. 2008;102:747-755
684. Kodama J, Hashimoto I, Seki N, Hongo A, Yoshinouchi M, Okuda H, Kudo T. Thrombospondin-1 and -2 messenger rna expression in invasive cervical cancer: Correlation with angiogenesis and prognosis. *Clin Cancer Res*. 2001;7:2826-2831
685. Neal CP, Garcea G, Doucas H, Manson MM, Sutton CD, Dennison AR, Berry DP. Molecular prognostic markers in resectable colorectal liver metastases: A systematic review. *Eur J Cancer*. 2006;42:1728-1743

686. Poon RT, Chung KK, Cheung ST, Lau CP, Tong SW, Leung KL, Yu WC, Tuszynski GP, Fan ST. Clinical significance of thrombospondin 1 expression in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10:4150-4157
687. Straume O, Akslen LA. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptors (flt-1, kdr) and tsp-1 related to microvessel density and patient outcome in vertical growth phase melanomas. *Am J Pathol.* 2001;159:223-235
688. Rice AJ, Steward MA, Quinn CM. Thrombospondin 1 protein expression relates to good prognostic indices in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Clin Pathol.* 2002;55:921-925
689. Tobita K, Kijima H, Dowaki S, Oida Y, Kashiwagi H, Ishii M, Sugio Y, Sekka T, Ohtani Y, Tanaka M, Inokuchi S, Makuuchi H. Thrombospondin-1 expression as a prognostic predictor of pancreatic ductal carcinoma. *Int J Oncol.* 2002;21:1189-1195
690. Hawighorst T, Velasco P, Streit M, Hong YK, Kyriakides TR, Brown LF, Bornstein P, Detmar M. Thrombospondin-2 plays a protective role in multistep carcinogenesis: A novel host anti-tumor defense mechanism. *Embo J.* 2001;20:2631-2640
691. Hawighorst T, Oura H, Streit M, Janes L, Nguyen L, Brown LF, Oliver G, Jackson DG, Detmar M. Thrombospondin-1 selectively inhibits early-stage carcinogenesis and angiogenesis but not tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in transgenic mice. *Oncogene.* 2002;21:7945-7956
692. Isenberg JS, Ridnour LA, Perruccio EM, Espey MG, Wink DA, Roberts DD. Thrombospondin-1 inhibits endothelial cell responses to nitric oxide in a cgmp-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:13141-13146
693. Bergseth G, Lappegard KT, Videm V, Mollnes TE. A novel enzyme immunoassay for plasma thrombospondin. Comparison with beta-thromboglobulin as platelet activation marker in vitro and in vivo. *Thromb Res.* 2000;99:41-50
694. Isenberg JS, Romeo MJ, Yu C, Yu CK, Nghiem K, Monsale J, Rick ME, Wink DA, Frazier WA, Roberts DD. Thrombospondin-1 stimulates platelet aggregation by blocking the antithrombotic activity of nitric oxide/cgmp signaling. *Blood.* 2008;111:613-623
695. Isenberg JS, Wink DA, Roberts DD. Thrombospondin-1 antagonizes nitric oxide-stimulated vascular smooth muscle cell responses. *Cardiovasc Res.* 2006;71:785-793
696. Isenberg JS, Hyodo F, Ridnour LA, Shannon CS, Wink DA, Krishna MC, Roberts DD. Thrombospondin 1 and vasoactive agents indirectly alter tumor blood flow. *Neoplasia.* 2008;10:886-896
697. Isenberg JS, Frazier WA, Roberts DD. Thrombospondin-1: A physiological regulator of nitric oxide signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65:728-742
698. Chandrasekaran L, He CZ, Al-Barazi H, Krutzsch HC, Iruela-Arispe ML, Roberts DD. Cell contact-dependent activation of alpha3beta1 integrin modulates endothelial cell responses to thrombospondin-1. *Mol Biol Cell.* 2000;11:2885-2900
699. Calzada MJ, Sipes JM, Krutzsch HC, Yurchenco PD, Annis DS, Mosher DF, Roberts DD. Recognition of the n-terminal modules of thrombospondin-1 and thrombospondin-2 by alpha6beta1 integrin. *J Biol Chem.* 2003;278:40679-40687
700. Calzada MJ, Zhou L, Sipes JM, Zhang J, Krutzsch HC, Iruela-Arispe ML, Annis DS, Mosher DF, Roberts DD. Alpha4beta1 integrin mediates selective endothelial cell responses to thrombospondins 1 and 2 in vitro and modulates angiogenesis in vivo. *Circ Res.* 2004;94:462-470
701. Staniszewska I, Zaveri S, Del Valle L, Oliva I, Rothman VL, Croul SE, Roberts DD, Mosher DF, Tuszynski GP, Marcinkiewicz C. Interaction of alpha9beta1 integrin with thrombospondin-1 promotes angiogenesis. *Circ Res.* 2007;100:1308-1316
702. Elzie CA, Murphy-Ullrich JE. The n-terminus of thrombospondin: The domain stands apart. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36:1090-1101
703. Liu A, Mosher DF, Murphy-Ullrich JE, Goldblum SE. The counteradhesive proteins, thrombospondin 1 and sparc/osteonectin, open the tyrosine phosphorylation-responsive paracellular pathway in pulmonary vascular endothelia. *Microvasc Res.* 2009;77:13-20
704. Dawson DW, Pearce SF, Zhong R, Silverstein RL, Frazier WA, Bouck NP. Cd36 mediates the in vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J Cell Biol.* 1997;138:707-717
705. Simantov R, Febbraio M, Silverstein RL. The antiangiogenic effect of thrombospondin-2 is mediated by cd36 and modulated by histidine-rich glycoprotein. *Matrix Biol.* 2005;24:27-34
706. Isenberg JS, Annis DS, Pendrak ML, Ptaszynska M, Frazier WA, Mosher DF, Roberts DD. Differential interactions of thrombospondin-1, -2, and -4 with cd47 and effects on cgmp signaling and ischemic injury responses. *J Biol Chem.* 2009;284:1116-1125
707. van Beek EM, Cochrane F, Barclay AN, van den Berg TK. Signal regulatory proteins in the immune system. *J Immunol.* 2005;175:7781-7787
708. Isenberg JS, Ridnour LA, Dimitry J, Frazier WA, Wink DA, Roberts DD. Cd47 is necessary for inhibition of nitric oxide-stimulated vascular cell responses by thrombospondin-1. *J Biol Chem.* 2006;281:26069-26080
709. Isenberg JS, Hyodo F, Matsumoto K, Romeo MJ, Abu-Asab M, Tsokos M, Kuppusamy P, Wink DA, Krishna MC, Roberts DD. Thrombospondin-1 limits ischemic tissue survival by inhibiting nitric oxide-mediated vascular smooth muscle relaxation. *Blood.* 2007;109:1945-1952
710. Bhardwaj A, Januzzi JL, Jr. St2: A novel biomarker for heart failure. *Expert Rev Mol Diagn.* 2010;10:459-464
711. Gruson D, Thys F, Verschuren F. Diagnosing destabilized heart failure in the emergency setting: Current and future biomarker tests. *Mol Diagn Ther.* 2011;15:327-340
712. Sabatine MS, Morrow DA, de Lemos JA, Gibson CM, Murphy SA, Rifai N, McCabe C, Antman EM, Cannon CP, Braunwald E. Multimarker approach to risk stratification in non-st elevation acute coronary syndromes: Simultaneous assessment of troponin i, c-reactive protein, and b-type natriuretic peptide. *Circulation.* 2002;105:1760-1763
713. Tello-Montoliu A, Marin F, Roldan V, Mainar L, Lopez MT, Sogorb F, Vicente V, Lip GY. A multimarker risk stratification approach to non-st elevation acute coronary syndrome: Implications of troponin t, crp, nt pro-bnp and fibrin d-dimer levels. *J Intern Med.* 2007;262:651-658
714. Zairis MN, Tsioulos GZ, Georgilas AT, Makrygiannis SS, Adamopoulou EN, Handanis SM, Batika PC, Prekates AA, Velissaris D, Kouris NT, Mytas DZ, Babalis DK, Karidis KS, Foussas SG. Multimarker strategy for the prediction of 31 days cardiac death in patients with acutely decompensated chronic heart failure. *Int J Cardiol.* 2010;141:284-290
715. Adams JE, 3rd, Bodor GS, Davila-Roman VG, Delmez JA, Apple FS, Ladenson JH, Jaffe AS. Cardiac troponin i. A marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation.* 1993;88:101-106
716. Bodor GS, Porterfield D, Voss EM, Smith S, Apple FS. Cardiac troponin-i is not expressed in fetal and healthy or diseased adult human skeletal muscle tissue. *Clin Chem.* 1995;41:1710-1715

717. Ishii J, Cui W, Kitagawa F, Kuno T, Nakamura Y, Naruse H, Mori Y, Ishikawa T, Nagamura Y, Kondo T, Oshima H, Nomura M, Ezaki K, Hishida H. Prognostic value of combination of cardiac troponin t and b-type natriuretic peptide after initiation of treatment in patients with chronic heart failure. *Clin Chem*. 2003;49:2020-2026
718. Parenti N, Bartolacci S, Carle F, Angelo F. Cardiac troponin i as prognostic marker in heart failure patients discharged from emergency department. *Intern Emerg Med*. 2008;3:43-47
719. Shah RV, Chen-Tournoux AA, Picard MH, Januzzi JL. Association between troponin t and impaired left ventricular relaxation in patients with acute decompensated heart failure with preserved systolic function. *Eur J Echocardiogr*. 2009;10:765-768
720. Wu AH, Jaffe AS. The clinical need for high-sensitivity cardiac troponin assays for acute coronary syndromes and the role for serial testing. *Am Heart J*. 2008;155:208-214
721. Goetze JP. Biochemistry of pro-b-type natriuretic peptide-derived peptides: The endocrine heart revisited. *Clin Chem*. 2004;50:1503-1510
722. Davis M, Espiner E, Richards G, Billings J, Town I, Neill A, Drennan C, Richards M, Turner J, Yandle T. Plasma brain natriuretic peptide in assessment of acute dyspnoea. *Lancet*. 1994;343:440-444
723. Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, McCord J, Hollander JE, Duc P, Omland T, Storrow AB, Abraham WT, Wu AH, Clopton P, Steg PG, Westheim A, Knudsen CW, Perez A, Kazanegra R, Herrmann HC, McCullough PA. Rapid measurement of b-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *N Engl J Med*. 2002;347:161-167
724. Hunt PJ, Yandle TG, Nicholls MG, Richards AM, Espiner EA. The amino-terminal portion of pro-brain natriuretic peptide (pro-bnp) circulates in human plasma. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;214:1175-1183
725. Januzzi JL, Jr., Camargo CA, Anwaruddin S, Baggish AL, Chen AA, Krauser DG, Tung R, Cameron R, Nagurney JT, Chae CU, Lloyd-Jones DM, Brown DF, Foran-Melanson S, Sluss PM, Lee-Lewandrowski E, Lewandrowski KB. The n-terminal pro-bnp investigation of dyspnea in the emergency department (pride) study. *Am J Cardiol*. 2005;95:948-954
726. Lainchbury JG, Campbell E, Frampton CM, Yandle TG, Nicholls MG, Richards AM. Brain natriuretic peptide and n-terminal brain natriuretic peptide in the diagnosis of heart failure in patients with acute shortness of breath. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42:728-735
727. Elster SK, Braunwald E, Wood HF. A study of c-reactive protein in the serum of patients with congestive heart failure. *Am Heart J*. 1956;51:533-541
728. Castell JV, Gomez-Lechon MJ, David M, Fabra R, Trullenque R, Heinrich PC. Acute-phase response of human hepatocytes: Regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6. *Hepatology*. 1990;12:1179-1186
729. Venugopal SK, Devaraj S, Jialal I. Effect of c-reactive protein on vascular cells: Evidence for a proinflammatory, proatherogenic role. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005;14:33-37
730. Matsumoto M, Tsujino T, Lee-Kawabata M, Naito Y, Sakoda T, Ohyanagi M, Masuyama T. Serum interleukin-6 and c-reactive protein are markedly elevated in acute decompensated heart failure patients with left ventricular systolic dysfunction. *Cytokine*. 2010;49:264-268
731. Loncar G, Bozic B, Cvorovic V, Radojicic Z, Dimkovic S, Markovic N, Prodanovic N, Lepic T, Putnikovic B, Popovic-Brkic V. Relationship between rankl and neuroendocrine activation in elderly males with heart failure. *Endocrine*. 2010;37:148-156
732. Ueland T, Dahl CP, Kjekshus J, Hulthe J, Bohm M, Mach F, Goudev A, Lindberg M, Wikstrand J, Aukrust P, Gullestad L. Osteoprotegerin predicts progression of chronic heart failure: Results from corona. *Circ Heart Fail*. 2011;4:145-152
733. Roysland R, Masson S, Omland T, Milani V, Bjerre M, Flyvbjerg A, Di Tano G, Misuraca G, Maggioni AP, Tognoni G, Tavazzi L, Latini R. Prognostic value of osteoprotegerin in chronic heart failure: The gissi-hf trial. *Am Heart J*. 2010;160:286-293
734. Benslimane-Ahmim Z, Heymann D, Dizier B, Lokajczyk A, Brion R, Laurendeau I, Bieche I, Smadja DM, Galy-Fauroux I, Collic-Jouault S, Fischer AM, Boisson-Vidal C. Osteoprotegerin, a new actor in vasculogenesis, stimulates endothelial colony-forming cells properties. *J Thromb Haemost*. 2011;9:834-843
735. Lott JA, Stang JM. Serum enzymes and isoenzymes in the diagnosis and differential diagnosis of myocardial ischemia and necrosis. *Clin Chem*. 1980;26:1241-1250
736. Roberts R. Early diagnosis of myocardial infarction with mb ck isoforms. *Clin Chim Acta*. 1998;272:33-45
737. Wu AH, Wang XM, Gornet TG, Ordonez-Llanos J. Creatine kinase mb isoforms in patients with skeletal muscle injury: Ramifications for early detection of acute myocardial infarction. *Clin Chem*. 1992;38:2396-2400
738. Sacks DB. Acute coronary ischemia: Troponin i and t. *Vasc Med*. 1999;4:253-256
739. Morrow DA, Cannon CP, Jesse RL, Newby LK, Ravkilde J, Storrow AB, Wu AH, Christenson RH. National academy of clinical biochemistry laboratory medicine practice guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2007;115:e356-375
740. Keller T, Zeller T, Peetz D, Tzikas S, Roth A, Czyz E, Bickel C, Baldus S, Warnholtz A, Frohlich M, Sinning CR, Eleftheriadis MS, Wild PS, Schnabel RB, Lubos E, Jachmann N, Genth-Zotz S, Post F, Nicaud V, Tiret L, Lackner KJ, Munzel TF, Blankenberg S. Sensitive troponin i assay in early diagnosis of acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2009;361:868-877
741. Apple FS, Christenson RH, Valdes R, Jr., Andriak AJ, Berg A, Duh SH, Feng YJ, Jortani SA, Johnson NA, Koplen B, Mascotti K, Wu AH. Simultaneous rapid measurement of whole blood myoglobin, creatine kinase mb, and cardiac troponin i by the triage cardiac panel for detection of myocardial infarction. *Clin Chem*. 1999;45:199-205
742. Panteghini M. Role and importance of biochemical markers in clinical cardiology. *Eur Heart J*. 2004;25:1187-1196
743. Collinson PO, Gaze DC, Bainbridge K, Morris F, Morris B, Price A, Goodacre S. Utility of admission cardiac troponin and "ischemia modified albumin" measurements for rapid evaluation and rule out of suspected acute myocardial infarction in the emergency department. *Emerg Med J*. 2006;23:256-261
744. Sinha MK, Roy D, Gaze DC, Collinson PO, Kaski JC. Role of "ischemia modified albumin", a new biochemical marker of myocardial ischaemia, in the early diagnosis of acute coronary syndromes. *Emerg Med J*. 2004;21:29-34
745. Kleinfeld AM, Prothro D, Brown DL, Davis RC, Richieri GV, DeMaria A. Increases in serum unbound free fatty acid levels following coronary angioplasty. *Am J Cardiol*. 1996;78:1350-1354
746. Key G, Schreiber A, Feldbrugge R, McNeil CJ, Jorgensen P, Pelsers MM, Glatz JF, Spencer F. Multicenter evaluation of an amperometric immunosensor for plasma fatty acid-binding protein: An early marker for acute myocardial infarction. *Clin Biochem*. 1999;32:229-231
747. Glatz JF, Kleine AH, van Nieuwenhoven FA, Hermens WT, van Dieijen-Visser MP, van der Vusse GJ. Fatty-acid-binding protein as a plasma marker for the estimation of myocardial infarct size in humans. *Br Heart J*. 1994;71:135-140

748. McCann CJ, Glover BM, Menown IB, Moore MJ, McEneny J, Owens CG, Smith B, Sharpe PC, Young IS, Adgey JA. Novel biomarkers in early diagnosis of acute myocardial infarction compared with cardiac troponin t. *Eur Heart J*. 2008;29:2843-2850
749. Staub D, Nusbaumer C, Zellweger MJ, Jonas N, Wild D, Pfisterer ME, Mueller-Brand J, Perruchoud AP, Mueller C. Use of b-type natriuretic peptide in the detection of myocardial ischemia. *Am Heart J*. 2006;151:1223-1230
750. Weber M, Bazzino O, Navarro Estrada JL, Fuselli JJ, Botto F, Perez de Arenaza D, Mollmann H, Nef HN, Elsasser A, Hamm CW. N-terminal b-type natriuretic peptide assessment provides incremental prognostic information in patients with acute coronary syndromes and normal troponin t values upon admission. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51:1188-1195
751. Morrow DA, de Lemos JA, Sabatine MS, Murphy SA, Demopoulos LA, DiBattiste PM, McCabe CH, Gibson CM, Cannon CP, Braunwald E. Evaluation of b-type natriuretic peptide for risk assessment in unstable angina/non-st-elevation myocardial infarction: B-type natriuretic peptide and prognosis in tactics-timi 18. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:1264-1272
752. Heeschen C, Hamm CW, Mitrovic V, Lantelme NH, White HD. N-terminal pro-b-type natriuretic peptide levels for dynamic risk stratification of patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. 2004;110:3206-3212
753. Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P, Wallentin L. Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. Frisc study group. Fragmin during instability in coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2000;343:1139-1147
754. Suleiman M, Khatib R, Agmon Y, Mahamid R, Boulous M, Kapeliovich M, Levy Y, Beyar R, Markiewicz W, Hammerman H, Aronson D. Early inflammation and risk of long-term development of heart failure and mortality in survivors of acute myocardial infarction predictive role of c-reactive protein. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47:962-968
755. Lindmark E, Diderholm E, Wallentin L, Siegbahn A. Relationship between interleukin 6 and mortality in patients with unstable coronary artery disease: Effects of an early invasive or noninvasive strategy. *Jama*. 2001;286:2107-2113
756. Brennan ML, Penn MS, Van Lente F, Nambi V, Shishehbor MH, Aviles RJ, Goormastic M, Pepoy ML, McElean ES, Topol EJ, Nissen SE, Hazen SL. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N Engl J Med*. 2003;349:1595-1604
757. Roman RM, Camargo PV, Borges FK, Rossini AP, Polanczyk CA. Prognostic value of myeloperoxidase in coronary artery disease: Comparison of unstable and stable angina patients. *Coron Artery Dis*. 2010;21:129-136
758. Kai H, Ikeda H, Yasukawa H, Kai M, Seki Y, Kuwahara F, Ueno T, Sugi K, Imaizumi T. Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32:368-372
759. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, van den Brand MJ, Boersma E, Zeiher AM, Simoons ML. Soluble cd40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2003;348:1104-1111
760. Varo N, de Lemos JA, Libby P, Morrow DA, Murphy SA, Nuzzo R, Gibson CM, Cannon CP, Braunwald E, Schonbeck U. Soluble cd40l: Risk prediction after acute coronary syndromes. *Circulation*. 2003;108:1049-1052
761. Apple FS, Pearce LA, Chung A, Ler R, Murakami MM. Multiple biomarker use for detection of adverse events in patients presenting with symptoms suggestive of acute coronary syndrome. *Clin Chem*. 2007;53:874-881
762. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor family genes: When did the three genes phylogenetically segregate? *Biol Chem*. 2002;383:1573-1579
763. Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, Sato M. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene*. 1990;5:519-524
764. Keyt BA, Nguyen HV, Berleau LT, Duarte CM, Park J, Chen H, Ferrara N. Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding kdr and flt-1 receptors. Generation of receptor-selective vegf variants by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*. 1996;271:5638-5646
765. Sawano A, Iwai S, Sakurai Y, Ito M, Shitara K, Nakahata T, Shibuya M. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood*. 2001;97:785-791
766. Seetharam L, Gotoh N, Maru Y, Neufeld G, Yamaguchi S, Shibuya M. A unique signal transduction from flt tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor vegf. *Oncogene*. 1995;10:135-147
767. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of kdr and flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*. 1994;269:26988-26995
768. Gille H, Kowalski J, Yu L, Chen H, Pisabarro MT, Davis-Smyth T, Ferrara N. A repressor sequence in the juxtamembrane domain of flt-1 (vegfr-1) constitutively inhibits vascular endothelial growth factor-dependent phosphatidylinositol 3'-kinase activation and endothelial cell migration. *Embo J*. 2000;19:4064-4073
769. Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to flt-1 but not to flk-1/kdr. *J Biol Chem*. 1994;269:25646-25654
770. Kearney JB, Kappas NC, Ellerstrom C, DiPaola FW, Bautch VL. The vegf receptor flt-1 (vegfr-1) is a positive modulator of vascular sprout formation and branching morphogenesis. *Blood*. 2004;103:4527-4535
771. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. 1995;376:66-70
772. Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, Shipley JM, Senior RM, Shibuya M. Mmp9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell*. 2002;2:289-300
773. Kami J, Muranaka K, Yanagi Y, Obata R, Tamaki Y, Shibuya M. Inhibition of choroidal neovascularization by blocking vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase. *Jpn J Ophthalmol*. 2008;52:91-98
774. Murakami M, Iwai S, Hiratsuka S, Yamauchi M, Nakamura K, Iwakura Y, Shibuya M. Signaling of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine kinase promotes rheumatoid arthritis through activation of monocytes/macrophages. *Blood*. 2006;108:1849-1856
775. Kerber M, Reiss Y, Wickersheim A, Jugold M, Kiessling F, Heil M, Tchaikovski V, Waltenberger J, Shibuya M, Plate KH, Machein MR. Flt-1 signaling in macrophages promotes glioma growth in vivo. *Cancer Res*. 2008;68:7342-7351
776. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, Kroll J, Plaisance S, De Mol M, Bono F, Kliche S, Fellbrich G, Ballmer-Hofer K, Maglione D, Mayr-Beyrle U, Dewerchin M, Dombrowski S, Stanimirovic D, Van Hummelen P, Dehio C, Hicklin DJ, Persico G, Herbert JM, Shibuya M, Collen D, Conway EM, Carmeliet P. Role of plgf in the intra- and intermolecular cross talk between the vegf receptors flt1 and flk1. *Nat Med*. 2003;9:936-943
777. Bates RC, Goldsmith JD, Bachelder RE, Brown C, Shibuya M, Oettgen P, Mercurio AM. Flt-1-dependent survival characterizes the epithelial-mesenchymal transition of colonic organoids. *Curr Biol*. 2003;13:1721-1727

778. Maru Y, Yamaguchi S, Shibuya M. Flt-1, a receptor for vascular endothelial growth factor, has transforming and morphogenic potentials. *Oncogene*. 1998;16:2585-2595
779. Fan F, Wey JS, McCarty MF, Belcheva A, Liu W, Bauer TW, Somcio RJ, Wu Y, Hooper A, Hicklin DJ, Ellis LM. Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. *Oncogene*. 2005;24:2647-2653
780. Taylor AP, Goldenberg DM. Role of placenta growth factor in malignancy and evidence that an antagonistic plgf/flt-1 peptide inhibits the growth and metastasis of human breast cancer xenografts. *Mol Cancer Ther*. 2007;6:524-531
781. Clauss M, Weich H, Breier G, Knies U, Rockl W, Waltenberger J, Risau W. The vascular endothelial growth factor receptor flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem*. 1996;271:17629-17634
782. Bellik L, Vinci MC, Filippi S, Ledda F, Parenti A. Intracellular pathways triggered by the selective flt-1-agonist placental growth factor in vascular smooth muscle cells exposed to hypoxia. *Br J Pharmacol*. 2005;146:568-575
783. Gille H, Kowalski J, Li B, LeCouter J, Moffat B, Zioncheck TF, Pelletier N, Ferrara N. Analysis of biological effects and signaling properties of flt-1 (vegfr-1) and kdr (vegfr-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem*. 2001;276:3222-3230
784. Persico MG, Vincenti V, DiPalma T. Structure, expression and receptor-binding properties of placenta growth factor (plgf). *Curr Top Microbiol Immunol*. 1999;237:31-40
785. Migdal M, Huppertz B, Tessler S, Comforti A, Shibuya M, Reich R, Baumann H, Neufeld G. Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor. *J Biol Chem*. 1998;273:22272-22278
786. Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, Zacchigna S, Loges S, Pattarini L, Chorianopoulos E, Liesenborghs L, Koch M, De Mol M, Autiero M, Wyns S, Plaisance S, Moons L, van Rooijen N, Giacca M, Stassen JM, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P. Anti-plgf inhibits growth of vegf(r)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell*. 2007;131:463-475
787. Adini A, Kornaga T, Firoozbakht F, Benjamin LE. Placental growth factor is a survival factor for tumor endothelial cells and macrophages. *Cancer Res*. 2002;62:2749-2752
788. Ziche M, Maglione D, Ribatti D, Morbidelli L, Lago CT, Battisti M, Paoletti I, Barra A, Tucci M, Parise G, Vincenti V, Granger HJ, Vignietto G, Persico MG. Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic, and angiogenic. *Lab Invest*. 1997;76:517-531
789. Yonekura H, Sakurai S, Liu X, Migita H, Wang H, Yamagishi S, Nomura M, Abedin MJ, Unoki H, Yamamoto Y, Yamamoto H. Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor b and c expression in microvascular endothelial cells and pericytes. Implication in autocrine and paracrine regulation of angiogenesis. *J Biol Chem*. 1999;274:35172-35178
790. Luttun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y, Angelillo-Scherrer A, Liao F, Nagy JA, Hooper A, Priller J, De Klerck B, Compennolle V, Daci E, Bohlen P, Dewerchin M, Herbert JM, Fava R, Matthys P, Carmeliet G, Collen D, Dvorak HF, Hicklin DJ, Carmeliet P. Revascularization of ischemic tissues by plgf treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-flt1. *Nat Med*. 2002;8:831-840
791. Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B, Hicklin DJ, Zhu Z, Bohlen P, Witte L, Hendrikx J, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Werb Z, Lyden D, Rafii S. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting vegfr1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med*. 2002;8:841-849
792. Pipp F, Heil M, Issbrucker K, Ziegelhoeffer T, Martin S, van den Heuvel J, Weich H, Fernandez B, Golomb G, Carmeliet P, Schaper W, Clauss M. Vegfr-1-selective vegf homologue plgf is arteriogenic: Evidence for a monocyte-mediated mechanism. *Circ Res*. 2003;92:378-385
793. Scholz D, Elsaesser H, Sauer A, Friedrich C, Luttun A, Carmeliet P, Schaper W. Bone marrow transplantation abolishes inhibition of arteriogenesis in placenta growth factor (plgf)  $-/-$  mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2003;35:177-184
794. Rafii S, Avezilla S, Shmelkov S, Shido K, Tejada R, Moore MA, Heissig B, Hattori K. Angiogenic factors reconstitute hematopoiesis by recruiting stem cells from bone marrow microenvironment. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;996:49-60
795. Selvaraj SK, Giri RK, Perelman N, Johnson C, Malik P, Kalra VK. Mechanism of monocyte activation and expression of proinflammatory cytochemokines by placenta growth factor. *Blood*. 2003;102:1515-1524
796. Marcellini M, De Luca N, Riccioni T, Ciucci A, Orecchia A, Lacal PM, Ruffini F, Pesce M, Cianfarani F, Zambruno G, Orlandi A, Failla CM. Increased melanoma growth and metastasis spreading in mice overexpressing placenta growth factor. *Am J Pathol*. 2006;169:643-654
797. Roy H, Bhardwaj S, Babu M, Jauhiainen S, Herzig KH, Bellu AR, Haisma HJ, Carmeliet P, Alitalo K, Yla-Herttuala S. Adenovirus-mediated gene transfer of placental growth factor to perivascular tissue induces angiogenesis via upregulation of the expression of endogenous vascular endothelial growth factor-a. *Hum Gene Ther*. 2005;16:1422-1428
798. Schoenfeld J, Lessan K, Johnson NA, Charnock-Jones DS, Evans A, Vourvoughaki E, Scott L, Stephens R, Freeman TC, Saidi SA, Tom B, Weston GC, Rogers P, Smith SK, Print CG. Bioinformatic analysis of primary endothelial cell gene array data illustrated by the analysis of transcriptome changes in endothelial cells exposed to vegf-a and plgf. *Angiogenesis*. 2004;7:143-156
799. Odorisio T, Cianfarani F, Failla CM, Zambruno G. The placenta growth factor in skin angiogenesis. *J Dermatol Sci*. 2006;41:11-19
800. Babiak A, Schumm AM, Wangler C, Loukas M, Wu J, Dombrowski S, Matuschek C, Kotzerke J, Dehio C, Waltenberger J. Coordinated activation of vegfr-1 and vegfr-2 is a potent arteriogenic stimulus leading to enhancement of regional perfusion. *Cardiovasc Res*. 2004;61:789-795
801. Roncal C, Buyschaert I, Chorianopoulos E, Georgiadou M, Meilhac O, Demol M, Michel JB, Vinckier S, Moons L, Carmeliet P. Beneficial effects of prolonged systemic administration of plgf on late outcome of post-ischaemic myocardial performance. *J Pathol*. 2008;216:236-244
802. Cianfarani F, Zambruno G, Brogelli L, Sera F, Lacal PM, Pesce M, Capogrossi MC, Failla CM, Napolitano M, Odorisio T. Placenta growth factor in diabetic wound healing: Altered expression and therapeutic potential. *Am J Pathol*. 2006;169:1167-1182
803. Gargioli C, Coletta M, De Grandis F, Cannata SM, Cossu G. Plgf-mmp-9-expressing cells restore microcirculation and efficacy of cell therapy in aged dystrophic muscle. *Nat Med*. 2008;14:973-978
804. Khurana R, Moons L, Shafi S, Luttun A, Collen D, Martin JF, Carmeliet P, Zachary IC. Placental growth factor promotes atherosclerotic intimal thickening and macrophage accumulation. *Circulation*. 2005;111:2828-2836
805. Oura H, Bertoincini J, Velasco P, Brown LF, Carmeliet P, Detmar M. A critical role of placental growth factor in the induction of inflammation and edema formation. *Blood*. 2003;101:560-567
806. Fujii T, Yonemitsu Y, Onimaru M, Inoue M, Hasegawa M, Kuwano H, Sueishi K. Vegf function for upregulation of endogenous plgf expression during fgf-2-mediated therapeutic angiogenesis. *Atherosclerosis*. 2008;200:51-57

807. Failla CM, Odorisio T, Cianfarani F, Schietroma C, Puddu P, Zambruno G. Placenta growth factor is induced in human keratinocytes during wound healing. *J Invest Dermatol*. 2000;115:388-395
808. Fiedler J, Leucht F, Waltenberger J, Dehio C, Brenner RE. Vegf-a and plgf-1 stimulate chemotactic migration of human mesenchymal progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;334:561-568
809. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, MacDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA, Zhu Z, Hicklin D, Wu Y, Port JL, Altorki N, Port ER, Ruggero D, Shmelkov SV, Jensen KK, Rafii S, Lyden D. Vegfr1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*. 2005;438:820-827
810. Wu Y, Hooper AT, Zhong Z, Witte L, Bohlen P, Rafii S, Hicklin DJ. The vascular endothelial growth factor receptor (vegfr-1) supports growth and survival of human breast carcinoma. *Int J Cancer*. 2006;119:1519-1529
811. Lin YL, Liang YC, Chiang BL. Placental growth factor down-regulates type 1 t helper immune response by modulating the function of dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2007;82:1473-1480
812. Xu L, Cochran DM, Tong RT, Winkler F, Kashiwagi S, Jain RK, Fukumura D. Placenta growth factor overexpression inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis by depleting vascular endothelial growth factor homodimers in orthotopic mouse models. *Cancer Res*. 2006;66:3971-3977
813. Schomber T, Kopfstein L, Djonov V, Albrecht I, Baeriswyl V, Strittmatter K, Christofori G. Placental growth factor-1 attenuates vascular endothelial growth factor-a-dependent tumor angiogenesis during beta cell carcinogenesis. *Cancer Res*. 2007;67:10840-10848
814. Eriksson A, Cao R, Pawliuk R, Berg SM, Tsang M, Zhou D, Fleet C, Tritsarlis K, Dissing S, Leboulch P, Cao Y. Placenta growth factor-1 antagonizes vegf-induced angiogenesis and tumor growth by the formation of functionally inactive plgf-1/vegfr heterodimers. *Cancer Cell*. 2002;1:99-108
815. Bjorndahl M, Cao R, Eriksson A, Cao Y. Blockage of vegf-induced angiogenesis by preventing vegf secretion. *Circ Res*. 2004;94:1443-1450
816. Cao Y, Linden P, Shima D, Browne F, Folkman J. In vivo angiogenic activity and hypoxia induction of heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. *J Clin Invest*. 1996;98:2507-2511
817. Yoder MC. Defining human endothelial progenitor cells. *J Thromb Haemost*. 2009;7 Suppl 1:49-52
818. Pollman MJ, Naumovski L, Gibbons GH. Vascular cell apoptosis: Cell type-specific modulation by transforming growth factor-beta1 in endothelial cells versus smooth muscle cells. *Circulation*. 1999;99:2019-2026
819. Benckert C, Jonas S, Cramer T, Von Marschall Z, Schafer G, Peters M, Wagner K, Radke C, Wiedenmann B, Neuhaus P, Hocker M, Rosewicz S. Transforming growth factor beta 1 stimulates vascular endothelial growth factor gene transcription in human cholangiocellular carcinoma cells. *Cancer Res*. 2003;63:1083-1092
820. Shao ES, Lin L, Yao Y, Bostrom KI. Expression of vascular endothelial growth factor is coordinately regulated by the activin-like kinase receptors 1 and 5 in endothelial cells. *Blood*. 2009;114:2197-2206
821. Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct tgfbeta type i receptors. *Embo J*. 2002;21:1743-1753
822. Lamouille S, Mallet C, Feige JJ, Bailly S. Activin receptor-like kinase 1 is implicated in the maturation phase of angiogenesis. *Blood*. 2002;100:4495-4501
823. Moonen JR, Krenning G, Brinker MG, Koerts JA, van Luyn MJ, Harmsen MC. Endothelial progenitor cells give rise to pro-angiogenic smooth muscle-like progeny. *Cardiovasc Res*. 2010;86:506-515
824. Medici D, Shore EM, Lounev VY, Kaplan FS, Kalluri R, Olsen BR. Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells. *Nat Med*. 2010;16:1400-1406
825. Autiero M, Lutun A, Tjwa M, Carmeliet P. Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: Novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. *J Thromb Haemost*. 2003;1:1356-1370
826. Murphy-Ullrich JE, Gurusiddappa S, Frazier WA, Hook M. Heparin-binding peptides from thrombospondins 1 and 2 contain focal adhesion-labilizing activity. *J Biol Chem*. 1993;268:26784-26789
827. Nunes SS, Outeiro-Bernstein MA, Juliano L, Vardiero F, Nader HB, Woods A, Legrand C, Morandi V. Syndecan-4 contributes to endothelial tubulogenesis through interactions with two motifs inside the pro-angiogenic n-terminal domain of thrombospondin-1. *J Cell Physiol*. 2008;214:828-837
828. Short SM, Derrien A, Narsimhan RP, Lawler J, Ingber DE, Zetter BR. Inhibition of endothelial cell migration by thrombospondin-1 type-1 repeats is mediated by beta1 integrins. *J Cell Biol*. 2005;168:643-653
829. Phelan MW, Forman LW, Perrine SP, Faller DV. Hypoxia increases thrombospondin-1 transcript and protein in cultured endothelial cells. *J Lab Clin Med*. 1998;132:519-529
830. Dias JV, Benslimane-Ahmim Z, Egot M, Lokajczyk A, Grelac F, Galy-Fauroux I, Juliano L, Le-Bonniec B, Takiya CM, Fischer AM, Blanc-Brude O, Morandi V, Boisson-Vidal C. A motif within the n-terminal domain of tsp-1 specifically promotes the proangiogenic activity of endothelial colony-forming cells. *Biochem Pharmacol*. 2012;84:1014-1023
831. Volpert OV, Zaichuk T, Zhou W, Reiher F, Ferguson TA, Stuart PM, Amin M, Bouck NP. Inducer-stimulated fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. *Nat Med*. 2002;8:349-357
832. Zak S, Treven J, Nash N, Gutierrez LS. Lack of thrombospondin-1 increases angiogenesis in a model of chronic inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis*. 2008;23:297-304
833. Kang SY, Halvorsen OJ, Gravdal K, Bhattacharya N, Lee JM, Liu NW, Johnston BT, Johnston AB, Haukaas SA, Aamodt K, Yoo S, Akslen LA, Watnick RS. Prosaposin inhibits tumor metastasis via paracrine and endocrine stimulation of stromal p53 and tsp-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:12115-12120
834. Narizhneva NV, Razorenova OV, Podrez EA, Chen J, Chandrasekharan UM, DiCorleto PE, Plow EF, Topol EJ, Byzova TV. Thrombospondin-1 up-regulates expression of cell adhesion molecules and promotes monocyte binding to endothelium. *Faseb J*. 2005;19:1158-1160
835. Smadja D, Gaussem P, Roncal C, Fischer AM, Emmerich J, Darnige L. Arterial and venous thrombosis is associated with different angiogenic cytokine patterns in patients with antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2010;19:837-843
836. Roncal C, Buyschaert I, Gerdes N, Georgiadou M, Ovchinnikova O, Fischer C, Stassen JM, Moons L, Collen D, De Bock K, Hansson GK, Carmeliet P. Short-term delivery of anti-plgf antibody delays progression of atherosclerotic plaques to vulnerable lesions. *Cardiovasc Res*. 2010;86:29-36

837. Borgel D, Durand E, Clauser S, Bachelot-Loza C, Peyrard S, Remones V, Aiach M, Lafont A. Plasma gas6 levels and coronary artery disease. *Thromb Haemost.* 2009;101:215-216
838. Borgel D, Clauser S, Bornstain C, Bieche I, Bissery A, Remones V, Fagon JY, Aiach M, Diehl JL. Elevated growth-arrest-specific protein 6 plasma levels in patients with severe sepsis. *Crit Care Med.* 2006;34:219-222
839. Silvestre JS, Gojova A, Brun V, Potteaux S, Esposito B, Duriez M, Clergue M, Le Ricousse-Roussanne S, Barateau V, Merval R, Groux H, Tobelem G, Levy B, Tedgui A, Mallat Z. Transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells in ischemic apolipoprotein e-knockout mice accelerates atherosclerosis without altering plaque composition. *Circulation.* 2003;108:2839-2842
840. Porto ML, Lima LC, Pereira TM, Nogueira BV, Tonini CL, Campagnaro BP, Meyrelles SS, Vasquez EC. Mononuclear cell therapy attenuates atherosclerosis in apoe ko mice. *Lipids Health Dis.* 2011;10:155
841. Gautier B, Miteva MA, Goncalves V, Huguenot F, Coric P, Bouaziz S, Seijo B, Gaucher JF, Broutin I, Garbay C, Lesnard A, Rault S, Inguibert N, Villoutreix BO, Vidal M. Targeting the proangiogenic vegf-vegfr protein-protein interface with drug-like compounds by in silico and in vitro screening. *Chem Biol.* 2011;18:1631-1639
842. Roskoski R, Jr. Vegf receptor protein-tyrosine kinases: Structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;375:287-291
843. Smadja DM, d'Audigier C, Weiswald LB, Badoual C, Dangles-Marie V, Mauge L, Evrard S, Laurendeau I, Lallemand F, Germain S, Grelac F, Dizier B, Vidaud M, Bieche I, Gaussem P. The wnt antagonist dickkopf-1 increases endothelial progenitor cell angiogenic potential. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:2544-2552

## RESUME

**Rationnel :** Les capacités pro-angiogènes des progéniteurs endothéliaux circulants sont maintenant bien établies, et leur implication dans les phénomènes de néovascularisation chez l'adulte a stimulé la recherche de thérapeutiques angiogènes basées sur la greffe de ces cellules. Les données actuelles convergent vers la notion de deux types cellulaires au phénotype endothélial, définis entre autres par leur cinétique d'apparition en culture : les progéniteurs précoces (CFU-EC ou CAC) et tardifs (ECFC). Notre équipe a montré que l'injection thérapeutique de cellules mononucléées de moelle osseuse (BM-MNC) permettait la néovascularisation du site ischémié chez des patients atteints d'ischémie critique des membres inférieurs, et que les nouveaux vaisseaux formés avaient le phénotype d'ECFC. Nous avons dans un premier temps mesuré les concentrations de différentes protéines modulant l'angiogenèse, chez des patients atteints de pathologies ischémiques et cardiovasculaires, ou impliquant des anomalies vasculaires associées à la fibrose. Ainsi, le *transforming growth factor -  $\beta$ 1* (TGF- $\beta$ 1) dans la fibrose pulmonaire idiopathique, la thrombospondine-1 (TSP-1) dans l'artériopathie des membres inférieurs, et le *placental growth factor* (PlGF) chez les patients atteints de pathologies cardiovasculaires (patients présentant un syndrome coronarien aigu, patients devant subir une chirurgie de la valve ou un pontage coronarien), se sont distingués comme potentiel biomarqueur plasmatique dans ces pathologies, et ont été étudiés dans la biologie des ECFC humaines.

**Résultats :** Le taux plasmatique de TGF- $\beta$ 1 est augmenté chez les patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) par rapport à la population contrôle ; il a un effet pro-angiogène *in vivo* (vascularisation des implants de Matrigel®) et *in vitro* (prolifération et migration des ECFC) via les récepteurs ALK-1, ALK-5 et TGF- $\beta$ R2. Le taux plasmatique de TSP-1 est augmenté chez les patients artéritiques par rapport à la population contrôle. Par ailleurs les néovaisseaux formés de patients artéritiques ayant été traités par injection locale de BM-MNC expriment la TSP-1. Dans les modèles murins de Matrigel®-plugs et d'ischémie du membre inférieur (IMI), la TSP-1 induit une diminution de la vascularisation des implants ainsi qu'une diminution de la revascularisation du membre ischémié. *In vitro*, la TSP-1 augmente l'adhésion via un mécanisme N-Terminal dépendant, et diminue le potentiel angiogène (prolifération et migration) des ECFC via sa liaison au récepteur CD47, ce qui active la voie de signalisation SDF-1/CXCR4. Le taux plasmatique de PlGF est augmenté chez les patients coronariens par rapport à la population contrôle et aux patients angoreux ; il est également augmenté chez les patients ayant subi une chirurgie cardiaque. Les PlGF-1 et -2 potentialisent la tubulogenèse des ECFC *in vitro* via la phosphorylation du récepteur VEGFR1. Cet effet est aboli lorsque le VEGFR1 est inhibé par ARN interférence ou par le composé chimique « 4321 ». De plus ce composé « 4321 » inhibe la vascularisation des implants de Matrigel®, ainsi que la revascularisation du membre ischémié dans le modèle d'IMI.

**Conclusions :** Le TGF- $\beta$ 1 joue un rôle dans le remodelage vasculaire de la FPI via les ECFC ; la TSP-1 est un potentiel biomarqueur de l'angiogenèse induite par les ECFC dans l'artériopathie des membres inférieurs ; l'inhibition de la voie PlGF/VEGFR1 module la tubulogenèse induite par les ECFC, cellules impliquées dans la formation de nouveaux vaisseaux. Nous avons ainsi mis en évidence 3 protéines modulant l'angiogenèse dans 3 contextes pathologiques différents, caractérisés par un remodelage vasculaire et où les ECFC sont impliquées dans leurs mécanismes physiopathologiques. Ces 3 protéines se présentent donc comme de potentiels biomarqueurs plasmatiques, modulant les propriétés angiogènes des ECFC et pouvant donc influencer leur efficacité en tant que produit de thérapie cellulaire. Ces biomarqueurs plasmatiques jouent un rôle probable dans l'équilibre homéostatique au décours des pathologies concernées.

**Mots-clés :** progéniteurs endothéliaux circulants, biomarqueurs plasmatiques vasculaires, potentiel angiogène, fibrose pulmonaire idiopathique, artériopathie des membres inférieurs, syndromes coronariens aigus, thérapie cellulaire.

**Discipline :** Biochimie et Biologie Moléculaire

**Adresse du laboratoire :**

INSERM UMR-S 765 : « Thrombose : épidémiologie, physiopathologie et thérapeutiques innovantes » - Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques, 4 avenue de l'Observatoire - 75270 Paris Cedex 06