

**Néogenèse vasculaire physiologique et pathologique**

Radia Tamarat, Jean Sébastien Silvestre.

**Radia Tamarat** : [radia.tamarat@irsn.fr](mailto:radia.tamarat@irsn.fr)

Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire (IRSN)

Laboratoire de Radiopathologie

BP 17, Fontenay Aux Roses. 92330.

France

**Jean-Sébastien Silvestre**: [Jean-Sebastien.Silvestre@larib.inserm.fr](mailto:Jean-Sebastien.Silvestre@larib.inserm.fr)

Centre de Recherche Cardiovasculaire INSERM Lariboisière

INSERM U689

Hôpital Lariboisière

41 bvd de la Chapelle

75475 Paris cedex 10

France

**Mots clés** : Angiogenèse, Vasculogenèse, Hypoxie, Inflammation, cellules souches, Ischémie

Les organismes unicellulaires et ceux dont la taille ne dépasse pas les capacités de diffusion des gaz et des substances solubles n'ont pas de système cardiovasculaire. La vie cellulaire est alors uniquement dépendante des concentrations de gaz et de solutés dans le liquide environnant la cellule ou le microorganisme. L'embryon du mammifère ne se compose, au tout début de son évolution, que d'un amas de cellules avasculaires. Cependant, le développement d'un réseau vasculaire capable de transporter fluides et gaz nécessaires à la vie cellulaire apparaît rapidement pendant la croissance de l'embryon. On appelle « vasculogénèse » les événements embryologiques initiaux commençant par la migration de précurseurs endothéliaux (angioblastes) qui se différencient et forment, localement, des tubules de cellules endothéliales qui se réunissent eux mêmes en plexus vasculaires peu ou pas organisés. La croissance, la différenciation et l'organisation de ces plexus en réseaux vasculaires fonctionnels constituent « l'angiogénèse ». Ce processus est caractérisé par le bourgeonnement de cellules endothéliales à partir des extrémités et des parois latérales des vaisseaux préexistants. On observe également une division longitudinale de vaisseaux formant deux tubes parallèles qui évoluent ensuite indépendamment. Ces étapes initiales de vasculogénèse puis d'angiogénèse aboutissent à la formation d'un réseau essentiellement de type capillaire. Ce n'est qu'ensuite que les éléments de plus gros calibres (artérioles, veinules, et anastomoses artério-veineuses) sont constitués par l'apparition de cellules musculaires lisses (myogénèse) puis de matrice extracellulaire qui consolide les structures vasculaires. On observe en même temps l'apparition de pericytes autour des capillaires. Les artères de résistance puis de conductance sont formées en dernier lieu par le développement de la média, puis de l'adventice. Les propriétés contractiles des cellules musculaires vasculaires apparaissent en dernier lieu, l'ensemble de ces événements étant regroupé sous le terme d'artériogénèse.

Ces processus complexes nécessitent une coordination et des régulations précises de multiples facteurs activateurs et inhibiteurs qui interagissent avec de nombreux types cellulaires, vasculaires et extra-vasculaires. Ces mécanismes de régulation sont probablement très différents d'un organe à l'autre et constituent des réseaux qui sont eux-mêmes très différenciés. Il y a, par exemple, de nombreuses distinctions anatomiques, histologiques et fonctionnelles entre les réseaux vasculaires hépatiques, cutanés et cérébraux, par exemple.

Nous nous limiterons dans ce chapitre à présenter les éléments fondamentaux de la néogenèse vasculaire physiologique au cours du développement. Nous aborderons également les différents processus à l'origine de la néo-vascularisation initiée par un contexte pathologique tel que l'ischémie tissulaire.

## **I- Les principaux processus de la néogenèse vasculaire**

### *I-a, La vasculogenèse*

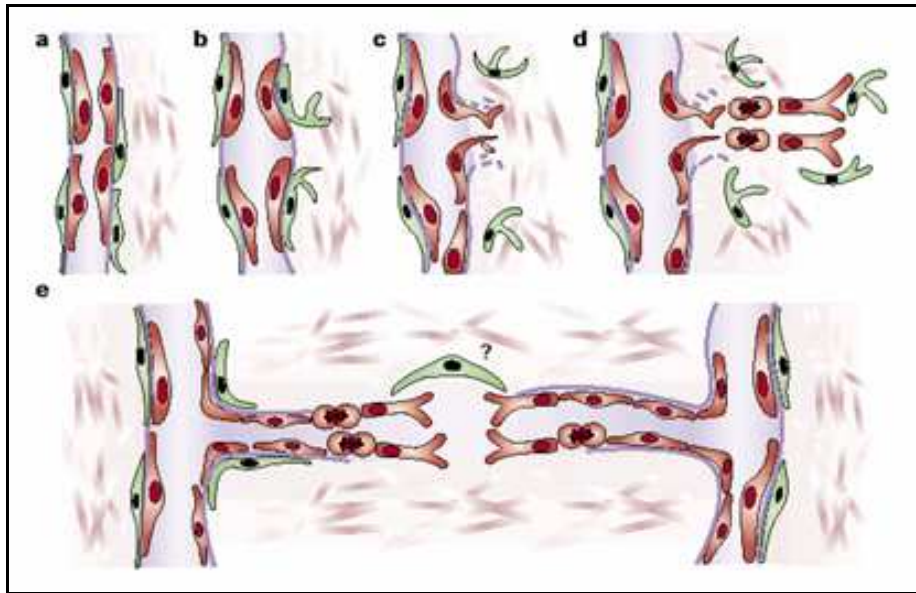
Décrite pour la première fois en 1900 [1], la vasculogenèse traduit l'émergence *de novo* de cellules progénitrices endothéliales (EPC) ou angioblastes, à partir de tissus non vasculaires. Essentiellement décrite pendant les étapes très précoces du développement embryonnaire, elle ne leur serait cependant pas exclusive : en effet, la description d'EPC circulantes (CEPC) chez l'adulte suggère l'existence d'une vasculogenèse néonatale [2], participant dans une certaine mesure à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins chez l'adulte [3, 4], mais également dans le cadre pathologique à l'angiogenèse tumorale [5, 6] et à la néovascularisation après infarctus du myocarde [7, 8] ou ischémie critique des membres inférieurs [7, 9, 10]. Plusieurs origines ont été décrites pour ces CEPC : cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse [11, 12], cellules myéloïdes sanguines, cellules

souches mésenchymateuses de la moelle osseuse, cellules souches adipocytaires, cellules souches hématopoïétiques provenant de sang de cordon ombilical (pour revue [2]). Enfin, il a été démontré récemment l'existence de CEPC au cours du développement embryonnaire aviaire, en l'absence de moëlle osseuse hématogénique [13].

### *I-b, L'angiogenèse*

L'angiogenèse est la formation de néo-vaisseaux à partir de vaisseaux pré-existants. Ce processus rend compte de la grande majorité des phénomènes de développement vasculaire, pendant la période embryonnaire ou chez l'adulte, en condition physiologique ou pathologique. Deux grands mécanismes d'angiogenèse ont été décrits à l'heure actuelle :

**l'angiogenèse par bourgeonnement** (« sprouting angiogenesis ») est le premier mécanisme d'angiogenèse à avoir été décrit, et le mieux caractérisé. Il se déroule selon des étapes séquentielles [14, 15] : i) vasodilatation et perméabilité accrue du vaisseau pré-existant (Figure 1b) ; ii) déstabilisation du vaisseau (Figure 1b) ; iii) bourgeonnement d'un segment tubaire par prolifération et migration de cellules endothéliales (Figure 1c) ; iv) formation d'une lumière vasculaire ; v) stabilisation du néo-vaisseau par interaction des cellules endothéliales avec des péricytes et cellules musculaires lisses, et synthèse d'une nouvelle lame basale (Figure 1). Les principaux facteurs intervenant au cours de ces différentes étapes seront décrits ultérieurement.

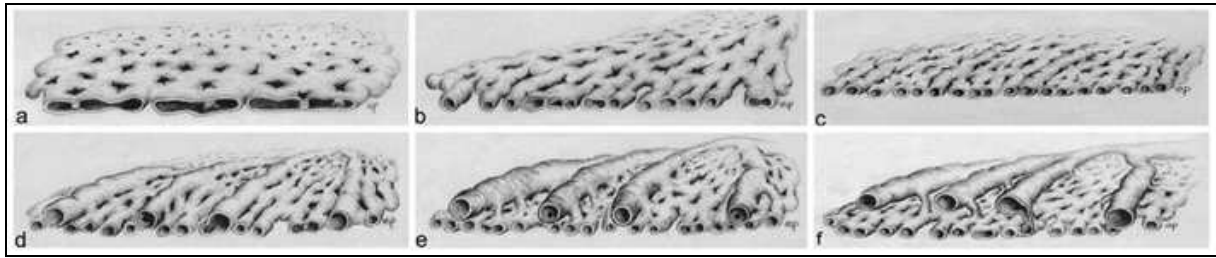


**Figure 1 : Angiogenèse par bourgeonnement.**

A partir d'un vaisseau pré-existant (a), un néo-vaisseau se forme par bourgeonnement de cellules endothéliales (b-e)

(adaptée d'après [16])

**l'intussusception** (« splitting angiogenesis ») permet la formation de néo-vaisseaux par subdivision d'un vaisseau ou d'un plexus pré-existant, via l'établissement de « piliers ». Contrairement au bourgeonnement, elle permet un remodelage vasculaire très rapide et « économique » car elle n'implique pas forcément de prolifération des cellules endothéliales. Suggérée pour la première fois en 1950 [17], elle a été mieux caractérisée par le groupe de Peter H. Burri [18-20]. C'est un mécanisme morphogénétique largement répandu, observé lors de l'expansion de lits capillaires (intussusceptive microvascular growth) et de leur remodelage en un réseau hiérarchisé (intussusceptive arborization) (Figure 2), mais également lors du remodelage des branchements vasculaires (intussusceptive branching remodeling). Elle est mise en jeu dans de nombreux organes (poumon, rein, rétine, endomètre, cerveau) ainsi que dans l'angiogenèse tumorale [21-23].



**Figure 2 : L'arborisation intussusceptive, un exemple d'intussusception**

(adaptée d'après [24])

### *I-c, Lymphangiogenèse*

La lymphangiogenèse est le processus de formation des vaisseaux lymphatiques, qui constituent un réseau hiérarchisé complémentaire du réseau sanguin. Le réseau lymphatique a un rôle prépondérant dans le maintien de l'homéostasie tissulaire, la surveillance immunitaire et l'absorption de graisses au niveau de l'intestin grêle. Dans le cadre pathologique, un défaut de la capacité du drainage lymphatique entraîne des lymphoedèmes accompagnés d'inflammations interstitielles aboutissant à de la fibrose et des réponses immunitaires diminuées. A l'inverse, une lymphangiogenèse anormale est généralement observée lors de la croissance tumorale, et constitue un facteur clé de la dispersion métastatique.

La grande perméabilité nécessaire aux fonctions des vaisseaux lymphatiques résulte de la présence d'un endothélium lâche et d'une membrane basale incomplète, et de l'absence de péricytes et de cellules musculaires lisses. La cohésion est maintenue grâce à des fibres élastiques qui ancrent les cellules endothéliales lymphatiques à la matrice extracellulaire.

Les processus de lymphangiogenèse sont encore mal connus. Au début du XIX<sup>ème</sup> siècle, une origine veineuse a été proposée pour les vaisseaux lymphatiques. Cette hypothèse est supportée par l'étude récente de souris déficientes pour les gènes de Prox-1 [25] ou du

vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) [26], facteurs impliqués dans la différenciation lymphatique. L'existence de lymphangioblastes mésodermiques a également été proposée [27].

## **II- Néogenèse vasculaire et développement embryonnaire**

Le développement physiologique de vaisseaux sanguins est essentiellement observé pendant l'embryogenèse, au cours duquel se met en place l'essentiel des structures vasculaires. L'angiogenèse est également observée chez l'adulte, mais est limitée à des situations particulières comme l'adaptation du muscle squelettique à l'exercice physique prolongé, l'ovaire et l'utérus au cours du cycle de reproduction chez la femme, ou la cicatrisation.

La première étape du développement vasculaire pendant l'embryogenèse est la vasculogenèse qui permet la mise en place *de novo* d'un plexus vasculaire primitif, non organisé. Celui-ci est ensuite réorganisé par des processus d'angiogenèse.

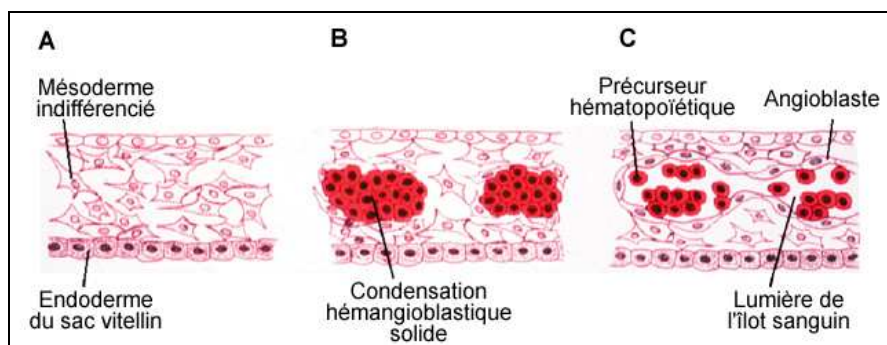
### **II-a, Vasculogenèse**

Le développement vasculaire commence dans le sac vitellin extra-embryonnaire. A ce niveau, la vasculogenèse présente la particularité d'être étroitement associée aux premiers stades de l'hématopoïèse. Au sein du mésoderme splanchnopleural apparaissent des condensations épithélioïdes, les îlots sanguins, constitués d'hémangioblastes bi-potentiels (hématopoïétique et endothélial) [28, 29]. Les hémangioblastes périphériques, fusiformes, se différencient en précurseurs des cellules endothéliales, les angioblastes, tandis que les hémangioblastes

centraux se constituent en précurseurs hématopoïétiques (Figure 3B). Puis les îlots sanguins se creusent d'une lumière et fusionnent en un plexus capillaire primitif (Figure 3C).

La vasculogénèse intra-embryonnaire [30, 31] n'est pas forcément associée au développement hématopoïétique. Elle permet la différenciation d'hémangioblastes qui s'assemblent pour constituer les ébauches des aortes dorsales et des veines cardinales, sans formation et remodelage préalable d'un plexus capillaire primitif. Deux territoires différents contribuent à l'élaboration des vaisseaux intra-embryonnaires :

- le mésoderme ventral ou splanchnopleural, d'où dérivent des cellules participant à la vascularisation des viscères et du plancher de l'aorte ; ces cellules ont une double potentialité endothéliale et hématopoïétique, et sont à l'origine de la première vague d'hématopoïèse intra-embryonnaire au niveau du plancher de l'aorte, une région appelée AGM (Aorte-Gonade-Mésonéphros) ;
- le deuxième territoire correspond aux somites, d'où émergent des précurseurs spécifiquement endothéliaux qui vont constituer les vaisseaux intersegmentaires, les veines cardinales et les parois dorsales et latérales de l'aorte.



**Figure 3 : Vasculogénèse extra-embryonnaire**



## **II-b, Angiogenèse**

### **Principaux mécanismes.**

Le réseau capillaire primitif est remodelé par angiogenèse, permettant son extension et sa réorganisation en un arbre vasculaire hiérarchisé, optimisé pour remplir ses fonctions de conduction et d'échange. Le bourgeonnement et l'intussusception participent de façon variable à ce remodelage vasculaire. Certains organes comme le système nerveux central sont tributaires du bourgeonnement, tandis que le poumon ou le muscle squelettique nécessitent un remodelage vasculaire rapide par intussusception. Les annexes extra-embryonnaires comme le sac vitellin ou la membrane chorioallantoïde aviaire sont le siège de ces deux processus.

La maturation des vaisseaux va alors se produire. Elle consiste en l'établissement d'un mur vasculaire par recrutement de cellules péri-endothéliales (cellules musculaires lisses et péricytes), dont l'origine dépend de la localisation dans l'embryon [32] : les premières cellules murales à apparaître le long des tubes endothéliaux se transdifférencient à partir de l'endothélium lui-même, comme cela a notamment été décrit pour l'aorte dorsale [33]. Les cellules musculaires lisses des veines coronaires proviennent du myocarde de l'oreillette, et celles des artères coronaires de l'épicarde. Les cellules musculaires lisses des larges vaisseaux thoraciques, de la tête et du cou dérivent en partie de la crête neurale cardiaque. La maturation, en permettant aux vaisseaux sanguins d'acquérir leur structure définitive, est nécessaire au contrôle de l'hémodynamisme. Elle entraîne une stabilisation du réseau vasculaire avec arrêt des processus d'angiogenèse. Seuls quelques conditions particulières chez l'adulte permettront de réactiver la formation de néo-vaisseaux.

### **Régulation de l'angiogenèse.**

L'état du réseau vasculaire est régulé de façon très fine par un équilibre dynamique entre facteurs angiogéniques et angiostatiques, dont la modulation résulte en une induction de l'angiogenèse, ou au contraire une stabilisation voire une régression des vaisseaux sanguins. Un grand nombre de facteurs de nature très variée interviennent à différentes étapes de l'angiogenèse : molécules signalisatrices (facteurs de croissance et cytokines, chémokines, hormones, neuropeptides), protéines de la matrice extracellulaire, protéases, ou encore paramètres hémodynamiques (forces de cisaillement liées au flux sanguin). L'intégration de ces différents facteurs, dont les modes d'actions ne sont pas tous connus, est extrêmement complexe. Par souci de simplicité, nous présenterons les principaux intervenants sans détailler leurs caractéristiques moléculaires.

*Principaux facteurs de régulation.* Le VEGF-A, découvert en 1989 [34, 35], est l'inducteur le plus important de l'angiogenèse physiologique et pathologique [36-40]. Il augmente la perméabilité vasculaire et stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales via ses récepteurs VEGF-R1 et VEGF-R2 exprimés spécifiquement au niveau de ces cellules.

Le système des angiopoïétines (Ang) et de leurs récepteurs Tie intervient dans la stabilisation/déstabilisation des vaisseaux. L'effet principal d'Ang-1 via son récepteur Tie-2 est de stabiliser les vaisseaux en modifiant les jonctions entre les cellules endothéliales [41] et en favorisant le recrutement des péricytes [42]. Ang-2 antagonise les effets d'Ang-1 sur Tie-2, entraînant une déstabilisation des vaisseaux nécessaire à l'angiogenèse [43-45]. Leurs effets sont cependant plus complexes et semblent dépendre du contexte (pour revue [46]).

Des protéases (activateurs du plasminogène, métalloprotéinases matricielles et leurs inhibiteurs (MMP/TIMP) participent au remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) et à la

libération de facteurs pro-angiogéniques associés à la MEC (bFGF, VEGF et TGF- $\beta$ ) [47-49].

Elles peuvent en revanche bloquer l'angiogenèse en libérant des inhibiteurs associés à la MEC (thrombospondine-1, canstatine, tumstatine, endostatine et platelet factor-4).

Des membres des systèmes ephrines/Eph, semaphorines/plexines/neuropilines, Netrines/UNC5 et Slits/Roundabouts permettent le guidage des cellules endothéliales pendant leur migration (pour revue [50]).

Le PDGF-BB et son récepteur PDGFR- $\beta$  participe à la stabilisation des néo-vaisseaux en recrutant des péricytes [51].

Les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  et  $\alpha_v\beta_5$  permettent l'adhérence des cellules endothéliales à la MEC, et sont nécessaires à leur survie (pour revues, voir [52, 53]). Des molécules de jonction et de communication intercellulaire (VE-cadhérine, connexines 37 et 40) sont également importantes pour leur survie et pour le remodelage vasculaire [54, 55].

*Régulation spécifique de l'intussusception.* Des travaux récents suggèrent que l'angiogenèse par intussusception présente, par rapport à l'angiogenèse par bourgeonnement, des mécanismes de régulation qui lui sont propres. En effet, en plus d'une possible implication des angiopoïétines/récepteurs Tie [56, 57], du PDGF-BB [58, 59] et des éphrines/récepteurs Eph [60-62], il a été suggéré que le premier mécanisme serait dépendant d'une régulation par le bFGF, tandis que le second serait contrôlé par le VEGF [63-68].

Enfin, les forces hémodynamiques jouent un rôle important dans le remodelage vasculaire par intussusception [69, 70].

*Rôle de l'hypoxie.* L'hypoxie joue un rôle crucial de régulateur de l'angiogenèse, pendant le développement embryonnaire comme en pathologie. Sa voie d'action principale consiste à activer les Hypoxia-inducible factors (HIF), des membres de la superfamille des bHLH-PAS,

qui en activant de nombreuses voies métaboliques, vont permettre une adaptation à l'hypoxie. Trois facteurs HIF sont actuellement connus, les deux principaux étant HIF-1 et HIF-2 (EPAS). Ils présentent des mécanismes similaires de stabilisation durant l'hypoxie [71, 72], et induisent la transcription de nombreux gènes dont des gènes de facteurs angiogéniques comme le VEGF et ses récepteurs, ou l'angiopoïétine-2 [73]. Leur importance pour le développement vasculaire physiologique est reflétée par les phénotypes des souris invalidées pour leurs gènes. Les souris HIF-1 $\alpha^{-/-}$  ou HIF-1 $\beta^{-/-}$  présentent une régression très importante de leur réseau vasculaire, et meurent aux environs du 10<sup>ème</sup> jour embryonnaire [74-76]. Les souris HIF-2 $\alpha^{-/-}$  présentent des phénotypes variables selon le fond génétique, mais des défauts vasculaires ont également été décrits [77].

Les HIF sont également importants en pathologie, notamment dans le cancer. Plusieurs études ont notamment montré leur implication dans l'angiogenèse tumorale [78-81].

### **III- Néogenèse vasculaire et ischémie tissulaire**

#### **III-a, Les principaux mécanismes de la néovascularisation post-ischémique**

L'importance relative des différents processus, vasculogénèse, angiogénèse et artériogénèse dans l'initiation de la néovascularisation associée à l'ischémie reste à définir [82]. Néanmoins, les trois processus agissent sans doute de concert pour établir un réseau vasculaire fonctionnel. Ainsi, il est probable que l'artériogénèse permet une augmentation importante du flux dans la zone lésée mais que le développement de nouveaux capillaires (angiogénèse) évite une destruction tissulaire massive du territoire ischémié. Enfin, même si les stimuli initiaux diffèrent probablement, vasculogénèse, angiogénèse et artériogénèse partagent les mêmes facteurs de croissance, chimokines et protéases qui peuvent activer et moduler différemment ces trois mécanismes.

#### **Angiogenèse post-ischémique.**

Le principal inducteur de l'angiogénèse est l'hypoxie qui implique notamment une activation de HIF-1.

*HIF et VEGF-A.* HIF-1 est un facteur de transcription nucléaire qui se lie à des éléments de réponse à l'hypoxie situés dans la région régulatrice de nombreux gènes. L'injection intramusculaire d'un plasmide codant pour HIF-1  $\alpha$  réduit la taille de l'infarctus et augmente la néovascularisation du myocarde ischémié [83]. L'administration de HIF-1 $\alpha$  accroît également le flux sanguin régional, le score angiographique et la densité capillaire dans un modèle d'ischémie du membre inférieur chez le lapin [84]. HIF-1 régule notamment l'expression du gène codant pour le VEGF-A [85] qui une fois sécrété va se lier à ses récepteurs à activité tyrosine kinase, VEGFR1 et VEGFR2, situés à la surface des cellules

endothéliales et musculaires lisses vasculaires. L'activation de ses récepteurs initie de multiples voies de signalisation à l'origine de la stimulation de l'angiogenèse. Le VEGF-A peut activer la prolifération et la survie cellulaire par des mécanismes dépendants de la phosphatidylinositol 3'kinase/AKT [86-88]. AKT pourrait contribuer à la réaction angiogénique en inhibant le processus apoptotique ou en phosphorylant l'enzyme de synthèse du monoxyde d'azote (NOS) de type endothéliale (NOSe) à l'origine d'une activation soutenue, indépendante du calcium, de l'enzyme. La NOSe joue également un rôle clé dans la néovascularisation post-ischémique. Les souris déficientes pour la NOSe présentent une altération de la néogenèse vasculaire dans la zone ischémisée [89]. Le NO contribue également directement à l'effet du VEGF. Dans le modèle d'ischémie périphérique chez la souris, la réponse angiogénique au VEGF requiert la présence de la NOSe [89]. De même, dans le coeur infarci, l'induction de l'angiogenèse est dépendante de la production de NO [90]. Finalement, l'administration par thérapie génique de la NOSe promeut la néovascularisation dans la patte ischémique de rat, soulignant ainsi l'importance du NO dans le processus de néogenèse vasculaire [91].

*Les espèces radicalaires de l'oxygène.* Les espèces radicalaires de l'oxygène (RLO) dont l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle et les dérivés nitrés comme le NO et le peroxyde nitrite sont des espèces biologiquement actives qui activent de multiples voies de signalisation par leur potentiel d'oxydo-réduction [92-94]. Chacune de ces espèces provient de réactions chimiques ou enzymatiques spécifiques. Les NADPH oxydases représentent une source prédominante de RLO dans le vaisseau [92, 93, 95]. Dans les cellules endothéliales, les NADPH oxydases sont constituées de deux sous-unités membranaires gp91<sup>phox</sup> (ou Nox 2) et p22<sup>phox</sup> et de deux composants cytosoliques p47<sup>phox</sup> et p67<sup>phox</sup>. La petite protéine G Rac1 est également nécessaire pour une activité totale de l'enzyme. Rac-1 et

gp91<sup>phox</sup> jouent un rôle majeur dans l'effet du VEGF-A sur la prolifération des cellules endothéliales [96]. De même, des souris invalidées pour la gp91<sup>phox</sup> présentent une altération de la néovascularisation post-ischémique soulignant également l'implication des RLO dans l'effet pro-angiogénique du VEGF-A dans le territoire ischémié [97, 98].

*Les autres VEGFs.* L'expression d'autres membres de la famille des VEGF est également induit par l'hypoxie. Par exemple, le Placenta Growth Factor (PlGF), qui se lie au récepteur VEGFR1, active la néovascularisation dans le tissu ischémié [99]. L'expression du VEGF-B est également augmentée dans la zone ischémiée et un traitement par un plasmide codant pour l'une des deux isoformes du VEGF-B, le VEGF-B167 ou le VEGF-B186 initie une revascularisation thérapeutique chez des souris avec une ischémie du membre inférieur [100]. Dans un modèle d'explants aortiques, les explants provenant de souris surexprimant le VEGF-B167 ou le VEGF-B186 dans les cellules endothéliales se développent fortement, suggérant un rôle direct du VEGF-B dans le processus angiogénique [101]. Le VEGF-C (ou VEGF-2) a été décrit comme un ligand spécifique pour les récepteurs endothéliaux de type tyrosine kinase, VEGFR-2 et VEGFR-3. In vitro, le VEGF-C a un effet mitogénique et chimiotactique dose-dépendant sur les cellules endothéliales, plus particulièrement sur les cellules endothéliales microvasculaires. Le VEGF-C stimule la libération de NO par les cellules endothéliales et augmente la perméabilité vasculaire. Enfin, l'expression constitutive de VEGF-C chez l'animal adulte facilite l'angiogenèse dans un modèle d'ischémie périphérique [102].

*Les protéines angiomatrices.* De nombreux autres facteurs (facteurs de croissance, facteurs de transcription, hormones, protéines kinase) ont la potentialité de moduler l'angiogenèse. De plus, le nombre de facteurs affectant la néogenèse vasculaire augmente de jour en jour,

certaines d'entre eux présentent pourtant un intérêt particulier. Ainsi, plusieurs protéines de la matrice extracellulaire sont associées à l'endothélium vasculaire et activent l'angiogenèse par un mécanisme dépendant des intégrines mais en l'absence d'addition exogène de facteurs de croissance. Parmi ces protéines « angiomatrice », il a été démontré que la protéine Del-1 (developmental endothelial locus-1) active l'angiogenèse et la néovascularisation post-ischémique en se fixant à l'intégrine  $\alpha v \beta 5$  sur l'endothélium quiescent, et par ce biais, augmente l'expression du facteur de transcription Hox D3 et l'intégrine  $\alpha v \beta 3$  [103, 104]. De même, l'analogue de Del-1, la lactadhérine est exprimée dans les cellules vasculaires et en interagissant avec l'intégrine  $\alpha v \beta 3$ , module la voie de signalisation dépendante de VEGF/VEGFR2. Enfin, la lactadhérine interagit avec les intégrines  $\alpha v \beta 3$  et  $\alpha v \beta 5$ , et par un mécanisme dépendant d'AKT est capable d'activer le développement de nouveaux vaisseaux dans un contexte ischémique en l'absence d'addition exogène de VEGF-A [105].

#### **Artériogenèse post-ischémique.**

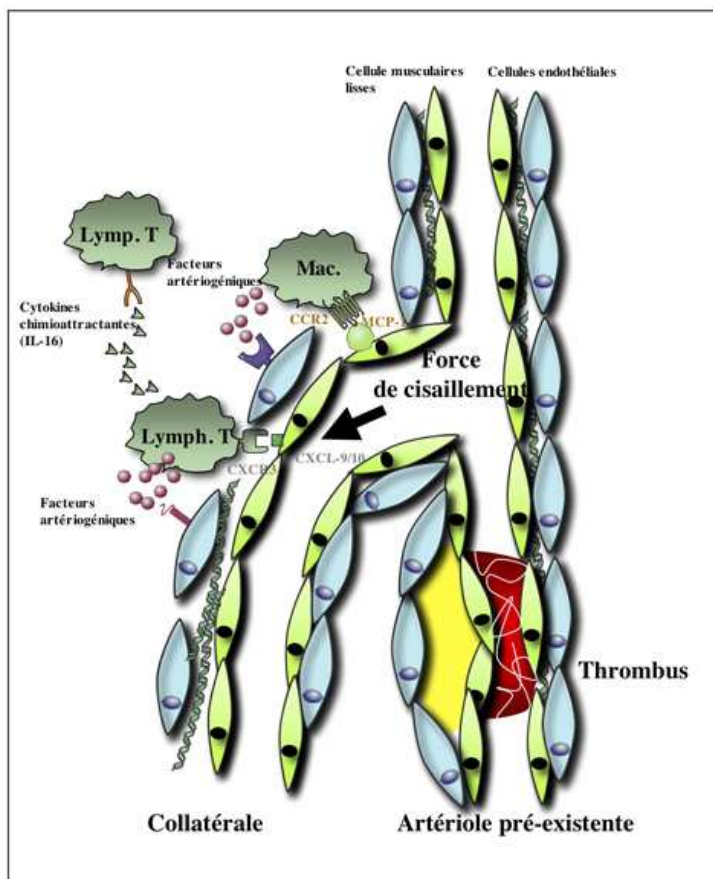
L'artériogenèse représente la croissance des artères collatérales à partir des anastomoses artério-artériolaires pré-existantes. Certains groupes ont assimilé l'artériogenèse post-natal dans le contexte ischémique au développement de vaisseaux collatéraux (ou collatéralisation) et les deux termes peuvent être usités indifféremment. L'artériogenèse est induite par un mécanisme indépendant de l'hypoxie qui semble reposer sur les modifications des forces hémodynamiques qui apparaissent dans les vaisseaux collatéraux consécutivement à une augmentation du flux. Cette augmentation du débit vasculaire provient de la différence de pression entre les artéioles pré-existantes connectées en amont du point d'occlusion et celles en aval. L'artériogenèse se traduit par une activation et une migration des cellules pariétales et un remodelage de la paroi vasculaire.



*Rôle des forces de cisaillement.* L'augmentation chronique des forces de cisaillement dépasse les restrictions anatomiques des vaisseaux collatéraux et restaure complètement la conductance des collatérales. Les forces de cisaillement activent les voies de signalisation dépendantes de Ras-ERK, Rho et du NO [106, 107]. La réponse primaire physiologique aux forces de cisaillement est une activation des cellules endothéliales et un grand nombre de gènes sont connus pour être contrôlés par des éléments de réponse aux forces de cisaillement localisés dans leur promoteur [108]. Parmi ceux-ci, les forces de cisaillement augmentent l'expression des gènes codant pour des cytokines activatrices ou chimioattractantes. Le MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) est augmenté au niveau des sites artériogéniques et la collatéralisation est accrue par un traitement avec du MCP-1 [109]. De même, l'atrophie musculaire est aggravée dans le membre inférieur ischémié de souris invalidées pour le récepteur CCR2 de MCP-1. L'analyse morphométrique montre également une réduction du diamètre des vaisseaux collatéraux dans ces conditions [110]. De plus, l'ischémie induite par une ligature de l'artère fémorale augmente le nombre de cellules infiltrées exprimant le récepteur CXCR3 et le niveau d'expression de ses ligands CXCL-9 et -10. Enfin, le score angiographique et la perfusion tissulaire sont diminués dans le membre inférieur ischémique de souris invalidées pour CXCR3 [111].

*Rôle des cellules inflammatoires.* L'augmentation de l'expression des cytokines chimioattractantes active l'infiltration des cellules inflammatoires dans le territoire ischémié. Ainsi, la migration des macrophages est sous le contrôle de la fixation de MCP-1 sur son récepteur CCR2. Le niveau de monocytes est directement corrélé avec l'intensité de la néovascularisation [112]. CXCL-9 et CXCL-10, de par leur interaction avec leur récepteur CXCR3, attirent les lymphocytes T qui modulent également la néogenèse vasculaire post-ischémique. Des souris Nude déficientes en lymphocytes T ou des souris déficientes en

lymphocytes CD4+ présentent une altération de la néovascularisation post-ischémique [113, 114]. De plus, l'absence de lymphocyte CD8 diminue l'expression de l'IL-16 et réduit le recrutement des lymphocytes T CD4+ au niveau des zones d'artériogénèse. L'administration exogène de lymphocyte T CD8 restaure un taux d'IL-16 conséquent, un nombre adéquat de lymphocytes T CD4+, et de fait active le développement de vaisseaux collatéraux [115]. On peut donc proposer le schéma suivant (Figure 4) : en réponse à une occlusion vasculaire, les lymphocyte T CD8 s'infiltrent au niveau des zone d'artériogénèse, et recrutent les lymphocyte T CD4 par la production d'IL-16. Les lymphocytes T CD4 contrôlent alors le développement de vaisseaux collatéraux en partie en activant le recrutement de macrophages qui libèrent des facteurs artériogéniques. En effet, la présence des cellules inflammatoires est associée à la libération locale de nombreuses molécules pro-artériogéniques comme des cytokines, interleukine-2 et tumor necrosis factor- $\alpha$ , des facteurs de croissance comme le VEGF et des métalloprotéinases [109, 116].



**Figure 4 :** Sous l'influence des forces de cisaillement qui augmentent l'expression de molécules chimioattractantes, les cellules inflammatoires infiltrent le tissu. Les lymphocyte T (Lymph. T) de type CD8 produisent de l'interleukine-16 et attirent les lymphocytes T de type CD4. Ces derniers permettent aux macrophages d'infiltrer la zone et de participer par la libération de

facteurs artériogéniques au processus de collatéralisation.

Des cytokines comme l'interleukine  $1\beta$  augmentent également l'activité de HIF- $1\alpha$  dénotant ainsi un rôle trans-activateur de HIF- $1\alpha$  dans le processus inflammatoire [117]. Durant la réaction inflammatoire, des cytokines anti-inflammatoires sont produites et modulent l'intensité de l'inflammation. La néovascularisation est augmentée dans le membre inférieur ischémié de souris déficientes pour la cytokine anti-inflammatoire IL-10 [118]. Cet effet est bloqué par un traitement avec un inhibiteur des métalloprotéinases, malgré une activation persistante du VEGF-A [119]. L'infiltration des leukocytes dans le coeur infarci et la collatéralisation sont diminuées chez des souris invalidées pour l'activateur du plasminogène de type urokinase ou pour la métalloprotéinase de type 9 [120]. De même, des souris déficientes en MMP-9 présentent une réduction de la collatéralisation dans un modèle d'ischémie du membre inférieur soulignant le lien étroit entre cellules inflammatoires, métalloprotéinases et artériogénèse [121].

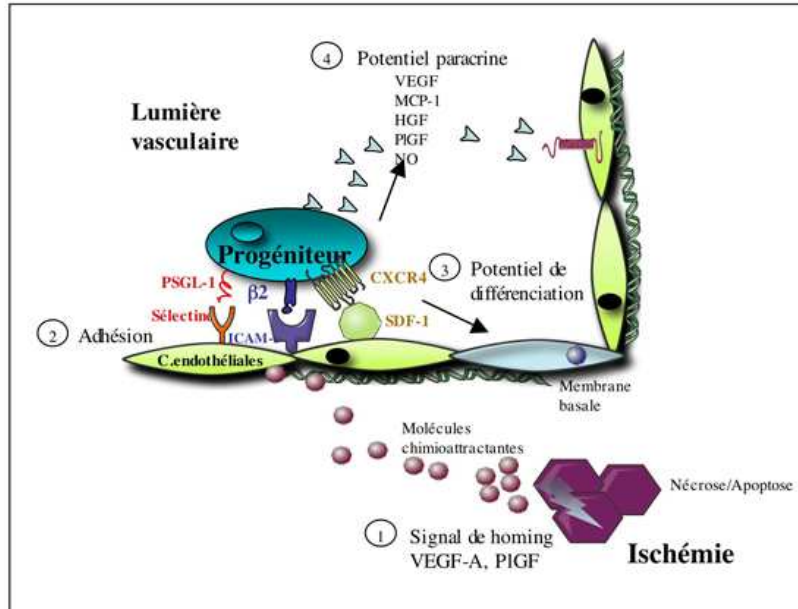
### **Vasculogénèse post-ischémique.**

La néovascularisation post-ischémique ne dépend pas uniquement des processus angiogénique et artériogénique mais implique également les progéniteurs circulants de cellules vasculaires provenant de la moelle osseuse. En réponse à une ischémie tissulaire, les précurseurs des cellules endothéliales sont mobilisés de la moelle osseuse vers la circulation périphérique et migrent vers le tissu ischémié. Le recrutement des EPC exprimant CXCR4 est médié par l'hypoxie et le facteur de transcription HIF- $1\alpha$  qui active l'expression de SDF-1 (Stroma-derived factor 1) [122]. Les cellules mononuclées ou les EPCs provenant d'animaux hétérozygote pour CXCR4 présentent une diminution de l'expression de CXCR4 et de leur capacité à stimuler la reperfusion tissulaire chez des souris Nude [123]. L'hypoxie locale libère également des facteurs solubles chimioattractants pour les EPCs circulantes. Un

candidat potentiel est le VEGF dont le niveau est accru par l'hypoxie et qui induit SDF-1 dans les structures vasculaires et périvasculaires [124]. Les chimiokines et les plaquettes permettent aussi la capture des EPCs au niveau des zones de lésions vasculaires [111, 125, 126]. Une fois recrutées, l'arrêt des EPCs sur l'endothélium activé par l'ischémie découle de l'activité des molécules d'adhésion présentes à la surface des cellules vasculaires comme l'intégrine beta2 et la sélectine de type L [127-129]. Après leur recrutement et leur adhésion au niveau de l'endothélium activé par l'ischémie, les EPCs exercent leurs effets bénéfiques sur la néogenèse vasculaire par des mécanismes différents (Figure 5).

Il a d'abord été suggéré que les progéniteurs s'incorporent dans le site de néovascularisation où la différenciation en cellules endothéliales se termine [3, 130, 131]. Cependant, la relative contribution des EPCs à la vasculature est très variable et semble dépendre du modèle expérimentale, du type et du sous-type de progéniteurs ou encore de la méthode d'isolement des EPCs [132, 133, 134, 135]. Certains travaux expérimentaux suggèrent même que ces progéniteurs ne s'incorporent pas dans les néocapillaires mais agissent en tant que cellules de soutien. Ainsi, les progéniteurs médullaires s'accumulent autour des vaisseaux collatéraux et se différencient en fibroblastes, leukocytes et péricytes qui produisent plusieurs facteurs de croissance et chimiokines [133]. La libération de SDF-1 par les plaquettes favorise la mobilisation et le recrutement des progéniteurs CXCR4+/VEGFR1+ autour des structures vasculaires qui dès lors promeuvent le développement de vaisseaux collatéraux [136]. De même, le VEGF induit le homing des cellules mononuclées myéloïdes, permet leur positionnement périvasculaire et leur rétention par l'activation de SDF-1 [124]. Enfin, les progéniteurs dérivés de sang de cordon humain peuvent se différencier en progéniteurs endothéliaux précoces et tardifs. Les EPC précoces expriment des marqueurs de la lignée monocyttaire et présentent un fort potentiel paracrine de libération de facteurs pro-

angiogéniques alors que les EPC tardifs expriment des marqueurs endothéliaux et possèdent de vraies capacités vasculogéniques [137].



**Figure 5 :** Après leur adhésion à l'endothélium activé, les cellules progénitrices vasculaires pourraient initier la néogenèse vasculaire par deux mécanismes principaux : leur capacité à se différencier en cellules endothéliales et leur potentiel paracrine de

libération de facteurs pro-angiogénique et pro-artériogéniques.

Ainsi, le rôle premier des progéniteurs pourraient être de libérer des facteurs angiogéniques et artériogéniques et de contribuer à la genèse vasculaire par des effets paracrines. Enfin, les cellules progénitrices possèdent également un potentiel vasoactif susceptible de participer à l'amélioration de la perfusion tissulaire dans le territoire ischémié [138].

### ***III-b Perspectives thérapeutiques***

Les trois principaux processus, vasculogénèse, angiogénèse et artériogénèse caractérisent le remodelage tissulaire consécutif à des pathologies vasculaires ischémiées chroniques ou aiguës. Ils constituent la cible des stratégies d'angiogénèse thérapeutique proposées pour développer un traitement alternatif chez des patients présentant des artériopathies des membres inférieurs ou des maladies coronariennes. De nombreuses

stratégies d'angiogenèse thérapeutique fondées sur l'administration de facteurs de croissance, de cellules souches, de molécules pharmacologiques, de protéines de la matrice extracellulaire ont été proposées et présentent des potentialités plus ou moins intéressantes. Cependant, celles actuellement testées dans des essais cliniques sont basées sur l'administration de facteurs de croissance ou de cellules progénitrices.

### **Facteurs de Croissance.**

Les essais cliniques sont essentiellement basés sur l'administration de VEGF-A et de FGF-1 ou 2. L'échec des études VIVA, FIRST et TRAFFIC suggèrent que l'administration intravasculaire de protéines est insuffisante pour induire une néovascularisation thérapeutique [139] [140] [141]. Ceci est sans doute lié au mode d'administration (intraveineux ou intracoronaire) et au choix d'injecter des protéines dont la demi-vie tissulaire est courte. Au contraire, les essais REVASC et EUROINJECT-1, basées sur des stratégies de transfert de gènes codants pour différentes isoformes de VEGF-A directement dans la zone ischémique montrent des résultats intéressants sur la fonction cardiaque [142] [143]. Les essais pré-cliniques ont prouvé l'efficacité de différents facteurs de croissance pour stimuler la néogenèse vasculaire dans des modèles d'ischémie cardiaque ou du membre inférieur mais en utilisant des animaux jeunes, sans facteurs de risque cardiovasculaire associés. L'induction d'une réponse pro-angiogénique similaire chez des patients âgés, sans autres alternatives thérapeutiques avec des lésions athéromateuses marquées est un challenge thérapeutique clairement plus marqué. La sélection des patients candidats à un stent ou à un pontage pourrait permettre d'augmenter l'efficacité et la faisabilité des thérapies pro-angiogéniques et de considérer l'angiogenèse thérapeutique comme une thérapie complémentaire à la revascularisation chirurgicale conventionnelle. De même, le choix des patients présentant des signes d'angor ou de claudication pourrait signaler la présence de tissus ischémiques mais

encore viables et donc potentiellement capables de répondre à la revascularisation thérapeutique [144]. Enfin, l'administration de plusieurs facteurs de croissance avec des cibles cellulaires distinctes serait susceptible d'activer simultanément plusieurs processus impliqués dans la néogenèse vasculaire. Ainsi, il a été démontré que la co-administration de FGF et de PDGF-BB ou de VEGF-A et de PlGF était beaucoup plus efficace que l'injection d'un seul facteur de croissance dans des modèles d'angiogenèse dans la cornée ou d'ischémie cardiaque et périphérique [145] [146].

### **Cellules progénitrices.**

Même si de nombreux travaux expérimentaux suggèrent la présence de progéniteurs vasculaires dans d'autres tissus comme le cœur, le tissu adipeux ou dans le sang, l'administration de précurseurs d'origine médullaire constitue la base des thérapies cellulaires pro-angiogéniques [147] [148]. Ainsi, l'injection de progéniteurs endothéliaux provenant de la moelle-osseuse restaure le flux cutané et la densité capillaire dans des modèles expérimentaux d'ischémie cardiaque ou de membre inférieur chez le rongeur [149, 150]. L'injection d'EPC humaines augmente également la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans le territoire infarcté [151]. Enfin, des études récentes ont suggéré que les cellules mononuclées provenant de la moelle osseuse sans différenciation et purification en EPC, sont capables de favoriser le développement vasculaire dans le territoire ischémié [151, 152]. L'administration de cellules mononuclées médullaires provenant d'animaux contrôles est également efficace dans des modèles expérimentaux de diabète et d'hypercholestérolémie [153, 154]. Ces thérapies cellulaires sont actuellement testées au niveau clinique dans des petites cohortes de patients. Une implantation autologue de cellules mononuclées médullaires dans le membre ischémié de patients souffrant d'une maladie artérielle périphérique ou de thromboangiopathie oblitérante améliorent la vascularisation et le processus cicatriciel [155]

[156]. Cependant, un certain nombre de ces patients présentent des effets secondaires ou transitoires [156]. De même, la transplantation intracoronaire de cellules mononuclées médullaires dans le myocarde de patients ayant une ischémie aigue augmente la perfusion et la fonction du tissu ischémié [157, 158, 159]. Dans ce contexte également, certaines études montrent des effets transitoires voire pas d'effets, soulignant ainsi la nécessité de poursuivre l'analyse de l'efficacité thérapeutique de ces stratégies basées sur l'administration de cellules souches [160] [161].



## **Bibliographie**

1. His W. Lecithoblast und angioblast der Wirbeltiere. *Aghandl Math-Phys Ges Wiss* 1900; 26: 171-328
2. Urbich C, and Dimmeler S. Endothelial progenitor cells functional characterization. *Trends Cardiovasc Med.* 2004; 14: 318-322.
3. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, and Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; 85: 221-228
4. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, and Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-967
5. 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, and Rafii S. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med.* 2001; 7: 1194-1201.
6. Vajkoczy P, Blum S, Lamparter M, Mailhammer R, Erber R, Engelhardt B, Vestweber D, and Hatzopoulos AK. Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis. *J Exp Med.* 2003; 197: 1755-1765.
7. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM, and Asahara T. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation.* 2001; 103: 634-637.

8. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, and 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.
9. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, and Asahara T. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97: 3422-3427.
10. Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Dernbach E, Zeiher AM, and Dimmeler S. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation.* 2003; 108: 2511-2516. Epub 2003 Oct 2527.
11. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, and Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999; 85: 221-228.
12. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, and Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997; 275: 964-967.
13. Pardanaud L, and Eichmann A. Identification, emergence and mobilization of circulating endothelial cells or progenitors in the embryo. *Development.* 2006; 133: 2527-2537. Epub 2006 May 2525.
14. Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res.* 1985; 43: 175-203.
15. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003; 9: 653-660.
16. Bergers G, and Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3: 401-410.

17. Short E. Alveolar epithelium in relation to growth of the lung. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 1950; 235: 35-87
18. Caduff JH, Fischer LC, and Burri PH. Scanning electron microscope study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung. *Anat Rec.* 1986; 216: 154-164.
19. Burri PH, and Djonov V. Intussusceptive angiogenesis--the alternative to capillary sprouting. *Mol Aspects Med.* 2002; 23: S1-27.
20. Burri PH, Hlushchuk R, and Djonov V. Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn.* 2004; 231: 474-488.
21. Patan S, Munn LL, and Jain RK. Intussusceptive microvascular growth in a human colon adenocarcinoma xenograft: a novel mechanism of tumor angiogenesis. *Microvasc Res.* 1996; 51: 260-272.
22. Patan S, Tanda S, Roberge S, Jones RC, Jain RK, and Munn LL. Vascular morphogenesis and remodeling in a human tumor xenograft: blood vessel formation and growth after ovariectomy and tumor implantation. *Circ Res.* 2001; 89: 732-739.
23. Djonov V, Andres AC, and Ziemiecki A. Vascular remodelling during the normal and malignant life cycle of the mammary gland. *Microsc Res Tech.* 2001; 52: 182-189.
24. Djonov V, Schmid M, Tschanz SA, and Burri PH. Intussusceptive angiogenesis: its role in embryonic vascular network formation. *Circ Res.* 2000; 86: 286-292.
25. Wigle JT, and Oliver G. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell.* 1999; 98: 769-778.
26. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, and Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol.* 2004; 5: 74-80. Epub 2003 Nov 2003.

27. Schneider M, Othman-Hassan K, Christ B, and Wilting J. Lymphangioblasts in the avian wing bud. *Dev Dyn.* 1999; 216: 311-319.
28. Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, and Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 1998; 125: 725-732.
29. Chung YS, Zhang WJ, Arentson E, Kingsley PD, Palis J, and Choi K. Lineage analysis of the hemangioblast as defined by FLK1 and SCL expression. *Development.* 2002; 129: 5511-5520.
30. Pardanaud L, Luton D, Prigent M, Bourcheix LM, Catala M, and Dieterlen-Lievre F. Two distinct endothelial lineages in ontogeny, one of them related to hemopoiesis. *Development.* 1996; 122: 1363-1371.
31. Pardanaud L, and Dieterlen-Lievre F. Manipulation of the angiopoietic/hemangiopoietic commitment in the avian embryo. *Development* 1999; 126: 617-627.
32. Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC, Bergwerff M, and Poelmann RE. Smooth muscle cell origin and its relation to heterogeneity in development and disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 1589-1594.
33. DeRuiter MC, Poelmann RE, VanMunsteren JC, Mironov V, Markwald RR, and Gittenberger-de Groot AC. Embryonic endothelial cells transdifferentiate into mesenchymal cells expressing smooth muscle actins in vivo and in vitro. *Circ Res.* 1997; 80: 444-451.
34. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, and Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246: 1306-1309
35. Plouet J, Schilling J, and Gospodarowicz D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *Embo J* 1989; 8: 3801-3806
36. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, and Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature.* 1995; 376: 66-70.

37. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, and Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 1995; 376: 62-66.
38. Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Gressens P, Van Vlaenderen I, Demunck H, Kasper M, Breier G, Evrard P, Muller M, Risau W, Edgington T, and Collen D. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature*. 1996; 383: 73-75.
39. Ferrara N, Menditto C, Di Marino MP, Ciccarelli A, Gerosolima G, and Menditto V. Subchorionic placental cyst: histopathological and clinical aspects in two cases. *Pathologica*. 1996; 88: 439-443.
40. Fong GH, Zhang L, Bryce DM, and Peng J. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development*. 1999; 126: 3015-3025.
41. Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD, Glazer N, Holash J, McDonald DM, and Yancopoulos GD. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med*. 2000; 6: 460-463.
42. Carlson TR, Feng Y, Maisonpierre PC, Mrksich M, and Morla AO. Direct cell adhesion to the angiopoietins mediated by integrins. *J Biol Chem*. 2001; 276: 26516-26525. Epub 2001 May 26; 19.
43. Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science*. 1997; 277: 48-50.
44. 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, and Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*. 1997; 277: 55-60.

45. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, and Wiegand SJ. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science*. 1999; 284: 1994-1998.
46. Eklund L, and Olsen BR. Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Exp Cell Res*. 2006; 312: 630-641. Epub 2005 Oct 2012.
47. Pepper MS, Rosnoble C, Di Sanza C, and Kruithof EK. Synergistic induction of t-PA by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor and localization of t-PA to Weibel-Palade bodies in bovine microvascular endothelial cells. *Thromb Haemost*. 2001; 86: 702-709.
48. Jackson C. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2002; 11: 295-299.
49. Lutun A, Dewerchin M, Collen D, and Carmeliet P. The role of proteinases in angiogenesis, heart development, restenosis, atherosclerosis, myocardial ischemia, and stroke: insights from genetic studies. *Curr Atheroscler Rep*. 2000; 2: 407-416.
50. Suchting S, Bicknell R, and Eichmann A. Neuronal clues to vascular guidance. *Exp Cell Res*. 2006; 312: 668-675. Epub 2005 Dec 2005.
51. Hellstrom M, Gerhardt H, Kalen M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, and Betsholtz C. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol*. 2001; 153: 543-553.
52. Hood JD, and Cheresh DA. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2: 91-100.
53. Hynes RO. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat Med*. 2002; 8: 918-921.

54. Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oostuyse B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D, and Dejana E. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell*. 1999; 98: 147-157.
55. Simon AM, and McWhorter AR. Vascular abnormalities in mice lacking the endothelial gap junction proteins connexin37 and connexin40. *Dev Biol*. 2002; 251: 206-220.
56. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W, and Qin Y. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature*. 1995; 376: 70-74.
57. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, and Yancopoulos GD. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*. 1996; 87: 1171-1180.
58. Hellstrom M, Kalen M, Lindahl P, Abramsson A, and Betsholtz C. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*. 1999; 126: 3047-3055.
59. Lamszus K, Heese O, and Westphal M. Angiogenesis-related growth factors in brain tumors. *Cancer Treat Res*. 2004; 117: 169-190.
60. Augustin HG, and Reiss Y. EphB receptors and ephrinB ligands: regulators of vascular assembly and homeostasis. *Cell Tissue Res*. 2003; 314: 25-31. Epub 2003 Aug 2002.
61. Gale NW, Baluk P, Pan L, Kwan M, Holash J, DeChiara TM, McDonald DM, and Yancopoulos GD. Ephrin-B2 selectively marks arterial vessels and neovascularization sites in the adult, with expression in both endothelial and smooth-muscle cells. *Dev Biol*. 2001; 230: 151-160.

62. Shin D, Garcia-Cardena G, Hayashi S, Gerety S, Asahara T, Stavrakis G, Isner J, Folkman J, Gimbrone MA, Jr., and Anderson DJ. Expression of ephrinB2 identifies a stable genetic difference between arterial and venous vascular smooth muscle as well as endothelial cells, and marks subsets of microvessels at sites of adult neovascularization. *Dev Biol.* 2001; 230: 139-150.
63. Ribatti D, Urbinati C, Nico B, Rusnati M, Roncali L, and Presta M. Endogenous basic fibroblast growth factor is implicated in the vascularization of the chick embryo chorioallantoic membrane. *Dev Biol.* 1995; 170: 39-49.
64. Djonov VG, Galli AB, and Burri PH. Intussusceptive arborization contributes to vascular tree formation in the chick chorio-allantoic membrane. *Anat Embryol (Berl).* 2000; 202: 347-357.
65. Lee SH, Schloss DJ, and Swain JL. Maintenance of vascular integrity in the embryo requires signaling through the fibroblast growth factor receptor. *J Biol Chem.* 2000; 275: 33679-33687.
66. Rousseau B, Dubayle D, Sennlaub F, Jeanny JC, Costet P, Bikfalvi A, and Javerzat S. Neural and angiogenic defects in eyes of transgenic mice expressing a dominant-negative FGF receptor in the pigmented cells. *Exp Eye Res.* 2000; 71: 395-404.
67. Javerzat S, Auguste P, and Bikfalvi A. The role of fibroblast growth factors in vascular development. *Trends Mol Med.* 2002; 8: 483-489.
68. Makanya AN, Stauffer D, Ribatti D, Burri PH, and Djonov V. Microvascular growth, development, and remodeling in the embryonic avian kidney: the interplay between sprouting and intussusceptive angiogenic mechanisms. *Microsc Res Tech.* 2005; 66: 275-288.
69. Kurz H, Burri PH, and Djonov VG. Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function. *News Physiol Sci.* 2003; 18: 65-70.



70. Djonov V, Baum O, and Burri PH. Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell Tissue Res.* 2003; 314: 107-117. Epub 2003 Oct 2023.
71. Huang LE, Gu J, Schau M, and Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95: 7987-7992.
72. Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL, Wood SM, Gatter KC, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, and Maxwell PH. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood.* 1998; 92: 2260-2268.
73. Pugh CW, and Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med.* 2003; 9: 677-684.
74. Adelman DM, Gertsenstein M, Nagy A, Simon MC, and Maltepe E. Placental cell fates are regulated in vivo by HIF-mediated hypoxia responses. *Genes Dev.* 2000; 14: 3191-3203.
75. Maltepe E, Schmidt JV, Baunoch D, Bradfield CA, and Simon MC. Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature.* 1997; 386: 403-407.
76. Kotch LE, Iyer NV, Laughner E, and Semenza GL. Defective vascularization of HIF-1alpha-null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Dev Biol.* 1999; 209: 254-267.
77. Peng J, Zhang L, Drysdale L, and Fong GH. The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2alpha plays an important role in vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97: 8386-8391.
78. Acker T, Diez-Juan A, Aragonés J, Tjwa M, Brusselmans K, Moons L, Fukumura D, Moreno-Murciano MP, Herbert JM, Burger A, Riedel J, Elvert G, Flamme I, Maxwell PH,

Collen D, Dewerchin M, Jain RK, Plate KH, and Carmeliet P. Genetic evidence for a tumor suppressor role of HIF-2alpha. *Cancer Cell*. 2005; 8: 131-141.

79. Kung AL, Wang S, Klco JM, Kaelin WG, and Livingston DM. Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. *Nat Med*. 2000; 6: 1335-1340.

80. Tsuzuki Y, Fukumura D, Oosthuysen B, Koike C, Carmeliet P, and Jain RK. Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulation by targeting hypoxia-inducible factor-1alpha--> hypoxia response element--> VEGF cascade differentially regulates vascular response and growth rate in tumors. *Cancer Res*. 2000; 60: 6248-6252.

81. 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, and Keshert E. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*. 1998; 394: 485-490.

82. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 9: 653-660

83. Shyu KG, Wang MT, Wang BW, Chang CC, Leu JG, Kuan P, and Chang H. Intramyocardial injection of naked DNA encoding HIF-1alpha/VP16 hybrid to enhance angiogenesis in an acute myocardial infarction model in the rat. *Cardiovasc Res* 2002; 54: 576-583

84. Vincent KA, Shyu KG, Luo Y, Magner M, Tio RA, Jiang C, Goldberg MA, Akita GY, Gregory RJ, and Isner JM. Angiogenesis is induced in a rabbit model of hindlimb ischemia by naked DNA encoding an HIF-1alpha/VP16 hybrid transcription factor. *Circulation* 2000; 102: 2255-2261

85. Shweiki D, Itin A, Soffer D, and Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359: 843-845

86. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, and Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the

phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998; 273: 30336-30343

87. Dimmeler S, and Zeiher AM. Akt takes center stage in angiogenesis signaling. *Circ Res* 2000; 86: 4-5

88. Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC, and Walsh K. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med* 2000; 6: 1004-1010

89. Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symes JF, Fishman MC, Huang PL, and Isner JM. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* 1998; 101: 2567-2578

90. Matsunaga T, Warltier DC, Weihrauch DW, Moniz M, Tessmer J, and Chilian WM. Ischemia-induced coronary collateral growth is dependent on vascular endothelial growth factor and nitric oxide. *Circulation* 2000; 102: 3098-3103

91. Smith RS, Jr., Lin KF, Agata J, Chao L, and Chao J. Human endothelial nitric oxide synthase gene delivery promotes angiogenesis in a rat model of hindlimb ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1279-1285

92. Griendling KK, and FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 2003; 108: 1912-1916

93. Griendling KK, and FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation* 2003; 108: 2034-2040

94. Li JM, and Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287: R1014-1030

95. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 181-189

96. Ushio-Fukai M, Tang Y, Fukai T, Dikalov SI, Ma Y, Fujimoto M, Quinn MT, Pagano PJ, Johnson C, and Alexander RW. Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ Res* 2002; 91: 1160-1167
97. Tojo T, Ushio-Fukai M, Yamaoka-Tojo M, Ikeda S, Patrushev N, and Alexander RW. Role of gp91phox (Nox2)-containing NAD(P)H oxidase in angiogenesis in response to hindlimb ischemia. *Circulation* 2005; 111: 2347-2355
98. Ebrahimian TG, Heymes C, You D, Blanc-Brude O, Mees B, Waeckel L, Duriez M, Vilar J, Brandes RP, Levy BI, Shah AM, and Silvestre JS. NADPH oxidase-derived overproduction of reactive oxygen species impairs postischemic neovascularization in mice with type 1 diabetes. *Am J Pathol* 2006; 169: 719-728
99. Lutun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y, Angelillo-Scherrer A, Liao F, Nagy JA, Hooper A, Priller J, De Klerck B, Compernelle V, Daci E, Bohlen P, Dewerchin M, Herbert JM, Fava R, Matthys P, Carmeliet G, Collen D, Dvorak HF, Hicklin DJ, and 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
100. Silvestre JS, Tamarat R, Ebrahimian TG, Le-Roux A, Clergue M, Emmanuel F, Duriez M, Schwartz B, Branellec D, and Levy BI. Vascular endothelial growth factor-B promotes in vivo angiogenesis. *Circ Res* 2003; 93: 114-123
101. Mould AW, Greco SA, Cahill MM, Tonks ID, Bellomo D, Patterson C, Zournazi A, Nash A, Scotney P, Hayward NK, and Kay GF. Transgenic overexpression of vascular endothelial growth factor-B isoforms by endothelial cells potentiates postnatal vessel growth in vivo and in vitro. *Circ Res* 2005; 97: e60-70
102. Witzienbichler B, Asahara T, Murohara T, Silver M, Spyridopoulos I, Magner M, Principe N, Kearney M, Hu JS, and Isner JM. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-

C/VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia. *Am J Pathol* 1998; 153: 381-394

103. Ho HK, Jang JJ, Kaji S, Spektor G, Fong A, Yang P, Hu BS, Schatzman R, Quertermous T, and Cooke JP. Developmental endothelial locus-1 (Del-1), a novel angiogenic protein: its role in ischemia. *Circulation* 2004; 109: 1314-1319

104. Zhong J, Eliceiri B, Stupack D, Penta K, Sakamoto G, Quertermous T, Coleman M, Boudreau N, and Varner JA. Neovascularization of ischemic tissues by gene delivery of the extracellular matrix protein Del-1. *J Clin Invest* 2003; 112: 30-41

105. Silvestre JS, Thery C, Hamard G, Boddaert J, Aguilar B, Delcayre A, Houbron C, Tamarat R, Blanc-Brude O, Heeneman S, Clergue M, Duriez M, Merval R, Levy B, Tedgui A, Amigorena S, and Mallat Z. Lactadherin promotes VEGF-dependent neovascularization. *Nat Med* 2005; 11: 499-506

106. Eitenmuller I, Volger O, Kluge A, Troidl K, Barancik M, Cai WJ, Heil M, Pipp F, Fischer S, Horrevoets AJ, Schmitz-Rixen T, and Schaper W. The range of adaptation by collateral vessels after femoral artery occlusion. *Circ Res* 2006; 99: 656-662

107. Pipp F, Boehm S, Cai WJ, Adili F, Ziegler B, Karanovic G, Ritter R, Balzer J, Scheler C, Schaper W, and Schmitz-Rixen T. Elevated fluid shear stress enhances postocclusive collateral artery growth and gene expression in the pig hind limb. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1664-1668

108. Shyy JY, Li YS, Lin MC, Chen W, Yuan S, Usami S, and Chien S. Multiple cis-elements mediate shear stress-induced gene expression. *J Biomech* 1995; 28: 1451-1457

109. Ito WD, Arras M, Winkler B, Scholz D, Schaper J, and Schaper W. Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res* 1997; 80: 829-837

110. Heil M, and Schaper W. Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis). *Circ Res* 2004; 95: 449-458
111. Waeckel L, Mallat Z, Potteaux S, Combadiere C, Clergue M, Duriez M, Bao L, Gerard C, Rollins BJ, Tedgui A, Levy BI, and Silvestre JS. Impairment in postischemic neovascularization in mice lacking the CXC chemokine receptor 3. *Circ Res* 2005; 96: 576-582
112. Heil M, Ziegelhoeffer T, Pipp F, Kostin S, Martin S, Clauss M, and Schaper W. Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H2411-2419
113. Stabile E, Burnett MS, Watkins C, Kinnaird T, Bachis A, la Sala A, Miller JM, Shou M, Epstein SE, and Fuchs S. Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in CD4-knockout mice. *Circulation* 2003; 108: 205-210
114. Couffinhal T, Silver M, Kearney M, Sullivan A, Witzgenbichler B, Magner M, Annex B, Peters K, and Isner JM. Impaired collateral vessel development associated with reduced expression of vascular endothelial growth factor in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Circulation* 1999; 99: 3188-3198
115. Stabile E, Kinnaird T, la Sala A, Hanson SK, Watkins C, Campia U, Shou M, Zbinden S, Fuchs S, Kornfeld H, Epstein SE, and Burnett MS. CD8<sup>+</sup> T lymphocytes regulate the arteriogenic response to ischemia by infiltrating the site of collateral vessel development and recruiting CD4<sup>+</sup> mononuclear cells through the expression of interleukin-16. *Circulation* 2006; 113: 118-124
116. Sunderkotter C, Goebeler M, Schulze-Osthoff K, Bhardwaj R, and Sorg C. Macrophage-derived angiogenesis factors. *Pharmacol Ther* 1991; 51: 195-216

117. Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, and Jelkmann W. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 1999; 94: 1561-1567
118. Silvestre JS, Mallat Z, Duriez M, Tamarat R, Bureau MF, Scherman D, Duverger N, Branellec D, Tedgui A, and Levy BI. Antiangiogenic effect of interleukin-10 in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb. *Circ Res* 2000; 87: 448-452
119. Silvestre JS, Mallat Z, Tamarat R, Duriez M, Tedgui A, and Levy BI. Regulation of matrix metalloproteinase activity in ischemic tissue by interleukin-10: role in ischemia-induced angiogenesis. *Circ Res* 2001; 89: 259-264
120. Heymans S, Lutun A, Nuyens D, Theilmeier G, Creemers E, Moons L, Dyspersin GD, Cleutjens JP, Shipley M, Angellilo A, Levi M, Nube O, Baker A, Keshet E, Lupu F, Herbert JM, Smits JF, Shapiro SD, Baes M, Borgers M, Collen D, Daemen MJ, and Carmeliet P. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med* 1999; 5: 1135-1142
121. Johnson C, Sung HJ, Lessner SM, Fini ME, and Galis ZS. Matrix metalloproteinase-9 is required for adequate angiogenic revascularization of ischemic tissues: potential role in capillary branching. *Circ Res* 2004; 94: 262-268
122. Ceradini DJ, and Gurtner GC. Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue. *Trends Cardiovasc Med* 2005; 15: 57-63
123. Walter DH, Haendeler J, Reinhold J, Rochwalsky U, Seeger F, Honold J, Hoffmann J, Urbich C, Lehmann R, Arenzana-Seisdesdos F, Aicher A, Heeschen C, Fichtlscherer S, Zeiher AM, and Dimmeler S. Impaired CXCR4 signaling contributes to the reduced neovascularization capacity of endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease. *Circ Res* 2005; 97: 1142-1151

124. Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Yung S, Chimenti S, Landsman L, Abramovitch R, and Keshet E. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 2006; 124: 175-189
125. Spring H, Schuler T, Arnold B, Hammerling GJ, and Ganss R. Chemokines direct endothelial progenitors into tumor neovessels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 18111-18116
126. Langer H, May AE, Daub K, Heinzmann U, Lang P, Schumm M, Vestweber D, Massberg S, Schonberger T, Pfisterer I, Hatzopoulos AK, and Gawaz M. Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro. *Circ Res* 2006; 98: e2-10
127. Chavakis E, Aicher A, Heeschen C, Sasaki K, Kaiser R, El Makhfi N, Urbich C, Peters T, Scharffetter-Kochanek K, Zeiher AM, Chavakis T, and Dimmeler S. Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *J Exp Med* 2005; 201: 63-72
128. Biancone L, Cantaluppi V, Duo D, Deregibus MC, Torre C, and Camussi G. Role of L-selectin in the vascular homing of peripheral blood-derived endothelial progenitor cells. *J Immunol* 2004; 173: 5268-5274
129. Yoon CH, Hur J, Oh IY, Park KW, Kim TY, Shin JH, Kim JH, Lee CS, Chung JK, Park YB, and Kim HS. Intercellular Adhesion Molecule-1 Is Upregulated in Ischemic Muscle, Which Mediates Trafficking of Endothelial Progenitor Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006:
130. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, and Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999; 5: 434-438



131. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, and Imaizumi T. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001; 103: 2776-2779
132. Rajantie I, Ilmonen M, Alminante A, Ozerdem U, Alitalo K, and Salven P. Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells. *Blood* 2004; 104: 2084-2086
133. Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S, Heil M, Voswinckel R, Helisch A, and Schaper W. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res* 2004; 94: 230-238
134. Peters BA, Diaz LA, Polyak K, Meszler L, Romans K, Guinan EC, Antin JH, Myerson D, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW, and Lengauer C. Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat Med* 2005; 11: 261-262
135. Hattori K, Dias S, Heissig B, Hackett NR, Lyden D, Tateno M, Hicklin DJ, Zhu Z, Witte L, Crystal RG, Moore MA, and Rafii S. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 2001; 193: 1005-1014
136. Jin DK, Shido K, Kopp HG, Petit I, Shmelkov SV, Young LM, Hooper AT, Amano H, Avezilla ST, Heissig B, Hattori K, Zhang F, Hicklin DJ, Wu Y, Zhu Z, Dunn A, Salari H, Werb Z, Hackett NR, Crystal RG, Lyden D, and Rafii S. Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4<sup>+</sup> hemangiocytes. *Nat Med* 2006; 12: 557-567
137. Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, Oh BH, Lee MM, and Park YB. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 288-293

138. You D, Waeckel L, Ebrahimian TG, Blanc-Brude O, Foubert P, Barateau V, Duriez M, Lericousse-Roussanne S, Vilar J, Dejana E, Tobelem G, Levy BI, and Silvestre JS. Increase in vascular permeability and vasodilation are critical for proangiogenic effects of stem cell therapy. *Circulation* 2006; 114: 328-338
139. Henry TD, Annex BH, McKendall GR, Azrin MA, Lopez JJ, Giordano FJ, Shah PK, Willerson JT, Benza RL, Berman DS, Gibson CM, Bajamonde A, Rundle AC, Fine J, and McCluskey ER. The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation* 2003; 107: 1359-1365
140. Simons M, Annex BH, Laham RJ, Kleiman N, Henry T, Dauerman H, Udelson JE, Gervino EV, Pike M, Whitehouse MJ, Moon T, and Chronos NA. Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation* 2002; 105: 788-793
141. Lederman RJ, Mendelsohn FO, Anderson RD, Saucedo JF, Tenaglia AN, Hermiller JB, Hillegass WB, Rocha-Singh K, Moon TE, Whitehouse MJ, and Annex BH. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet* 2002; 359: 2053-2058
142. Stewart DJ, Hilton JD, Arnold JM, Gregoire J, Rivard A, Archer SL, Charbonneau F, Cohen E, Curtis M, Buller CE, Mendelsohn FO, Dib N, Page P, Ducas J, Plante S, Sullivan J, Macko J, Rasmussen C, Kessler PD, and Rasmussen HS. Angiogenic gene therapy in patients with nonrevascularizable ischemic heart disease: a phase 2 randomized, controlled trial of AdVEGF(121) (AdVEGF121) versus maximum medical treatment. *Gene Ther* 2006; 13: 1503-1511
143. Kastrup J, Jorgensen E, Ruck A, Tagil K, Glogar D, Ruzyllo W, Botker HE, Dudek D, Drvota V, Hesse B, Thuesen L, Blomberg P, Gyongyosi M, and Sylven C. Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165 gene therapy in patients

with stable severe angina pectoris A randomized double-blind placebo-controlled study: the Euroinject One trial. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 982-988

144. Lekas M, Lekas P, Latter DA, Kutryk MB, and Stewart DJ. Growth factor-induced therapeutic neovascularization for ischaemic vascular disease: time for a re-evaluation? *Curr Opin Cardiol* 2006; 21: 376-384

145. Cao R, Brakenhielm E, Pawliuk R, Wariaro D, Post MJ, Wahlberg E, Leboulch P, and Cao Y. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nat Med* 2003; 9: 604-613

146. 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, Communi D, Shibuya M, Collen D, Conway EM, and 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

147. Rafii S, and Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003; 9: 702-712

148. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Penicaud L, and Casteilla L. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004; 109: 656-663

149. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, and Asahara T. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 3422-3427

150. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM, and Asahara T. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001; 103: 634-637
151. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Sasaki K, Duan J, and Imaizumi T. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 2001; 103: 897-903
152. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, and 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
153. 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, and 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
154. Tamarat R, Silvestre JS, Le Ricousse-Roussanne S, Barateau V, Lecomte-Raclet L, Clergue M, Duriez M, Tobelem G, and 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
155. 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, and 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
156. Miyamoto K, Nishigami K, Nagaya N, Akutsu K, Chiku M, Kamei M, Soma T, Miyata S, Higashi M, Tanaka R, Nakatani T, Nonogi H, and Takeshita S. Unblinded pilot

study of autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells in patients with thromboangiitis obliterans. *Circulation* 2006; 114: 2679-2684

157. Schachinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali ND, Vogl TJ, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, and Zeiher AM. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 1690-1699

158. Assmus B, Honold J, Schachinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, Teupe C, Pistorius K, Martin H, Abolmaali ND, Tonn T, Dimmeler S, and Zeiher AM. Transcatheter transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 355: 1222-1232

159. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, and Zeiher AM. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 355: 1210-1221

160. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, Endresen K, Ilebakk A, Mangschau A, Fjeld JG, Smith HJ, Taraldsrud E, Groggaard HK, Bjornerheim R, Brekke M, Muller C, Hopp E, Ragnarsson A, Brinchmann JE, and Forfang K. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 355: 1199-1209

161. Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, Hecker H, Schaefer A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, and Drexler H. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation* 2006; 113: 1287-1294