

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



PCT

(43) Date de la publication internationale
1 février 2007 (01.02.2007)

(10) Numéro de publication internationale
WO 2007/012764 A2

(51) Classification internationale des brevets :
CI2N 5/10 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61K 35/14 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)

(74) Mandataire : BERTRAND, Didier; c/o SA Fedit-Loriot
& Autres Conseils en Propriété, Industrielle, 38, avenue
Hoche, F-75008 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2006/001837

(22) Date de dépôt international : 27 juillet 2006 (27.07.2006)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0508029 27 juillet 2005 (27.07.2005) FR

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : INSTITUT DES VAISSEAUX ET DU SANG [FR/FR]; Hôpital Lariboisière, 2, Rue Ambroise Paré, F-75475 Paris Cedex 10 (FR). UNIVERSITE PARIS 7-DENIS DIDEROT [FR/FR]; Bureau de la Valorisation et des Recherches, 2, Place Jussieu, F-75251 Paris Cedex 05 (FR).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: CELL/LIGAND MARKING SYSTEM, WHEREIN THE MARKER IS OF EPH TYPE, CELL MATERIAL COMPRISING SAID SYSTEM, METHOD FOR PREPARING SAME AND PROANGIOGENETIC USE

(54) Titre : SYSTÈME MARQUEUR CELLULAIRE/LIGAND, OÙ LE MARQUEUR EST DU TYPE EPH, MATÉRIAU CELLULAIRE COMPRENNANT CE SYSTÈME, PROCÉDÉ DE PRÉPARATION ET UTILISATION PROANGIOGÉNIQUE

(57) Abstract: The invention concerns a cell/ligand specific marking system, said system being characterized in that it comprises: (a) an endothelial precursor cell (EPC) including a cell marker selected among the group consisting of the Eph (in particular EphB4 or EphB1), and (b) a protein material of structure L-K, which consists of a ligand (L) specific of said marker and is associated or fused with a binding protein (K), said system being capable of providing a proangiogenic cell material of structure EPC-Eph-L-K. The invention also concerns said cell material as product capable of stimulating angiogenesis, its preparation method and its therapeutic use, in particular with respect to vascular insufficiencies.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un système du type marqueur cellulaire/ligand spécifique, ledit système, étant caractérisé en ce qu'il comprend : (a) un précurseur de cellule endothéliale (EPC) comportant un marqueur cellulaire choisi parmi l'ensemble constitué par les Eph (notamment EphB4 ou EphB1), et (b) un matériau protéinique de structure L-K, qui est constitué d'un ligand (L) spécifique dudit marqueur et est associé ou fusionné avec une protéine de liaison (K), ledit système étant capable de fournir un matériau cellulaire proangiogénique de structure EPC-Eph-L-K. Elle concerne également ce matériau cellulaire en tant que produit capable de stimuler l'angiogenèse, son procédé de préparation et son utilisation en thérapeutique, notamment vis-à-vis des insuffisances vasculaires.

WO 2007/012764 A2

5

Système marqueur cellulaire/ligand, où le marqueur est du type Eph, matériau cellulaire comprenant ce système, procédé de préparation et utilisation proangiogénique

Domaine de l'invention

La présente invention a trait à une nouvelle solution technique mettant en œuvre un système comprenant un marqueur cellulaire et un ligand spécifique dudit marqueur, où ledit marqueur est choisi parmi l'ensemble constitué par les Eph, notamment le marqueur EphB4. Elle concerne également le matériau cellulaire comprenant ce système ainsi que son procédé de préparation et son utilisation en thérapeutique en tant qu'agent proangiogénique.

15

Art antérieur

On sait que les membres de la famille des éphrines et de leurs récepteurs Eph à tyrosine kinase, qui ont été dans un premier temps mis en évidence dans le système nerveux pour le guidage des neurones, sont des facteurs intervenant dans l'angiogenèse. De nombreuses isoformes pour les récepteurs Eph et leurs ligands éphrines ont été décrites avec des spécificités d'expression tissulaire. Chez les vertébrés, on connaît au moins 16 récepteurs Eph, à savoir : 10 récepteurs EphA (EphA1 à EphA10) et 6 récepteurs EphB (EphB1 à EphB6), d'une part, et au moins 9 ligands éphrine, à savoir : éphrine-A1 à éphrine-A6 et éphrine-B1 à éphrine-B3, d'autre part. A l'origine, la subdivision en deux classes, EphA et EphB, était fondée sur l'homologie de la séquence de leur domaine extracellulaire, mais cette subdivision correspond aussi à la liaison préférentielle de leurs ligands, les ligands éphrine-A étant en général liés à la membrane par un glycosylphosphatidilinositol (GPI) et les ligands éphrine-B étant transmembranaires avec un domaine intracytoplasmique possédant undomaine de liaison PDZ.

25

30

35

Comme représenté à la figure 1 ci-après :

- le récepteur Eph comporte dans le domaine extracellulaire, des unités répétées de fibronectine de type III (en anglais : "fibronectin type III repeats"), une région riche en cystéine ("cystein rich region") et un domaine de liaison pour un ligand

spécifique ("ligand-binding domain") ; il présente en outre une prolongation dans le domaine intracellulaire comportant un domaine à activité tyrosine kinase, un motif α -stérile ("SAM") et un motif de liaison PDZ ("PDZ-binding motif") ;

- 5 • le ligand éphrine-A est accroché à la membrane par un GPI ("GPI anchor") ; et
- le ligand transmembranaire éphrine-B présente une prolongation intracellulaire comportant une queue cytoplasmique (en anglais : "cytoplasmic tail") et un motif de liaison PDZ.

10 Eu égard à l'interaction entre le récepteur Eph (notamment EphB4), à tyrosine kinase, et son ligand (notamment éphrine-B2), protéine transmembranaire, on a une "signalisation bidirectionnelle" ("bidirectionnal signaling") qui comprend une signalisation induite par le récepteur Eph dans la cellule exprimant Eph sur sa surface ("forward signaling"), et une signalisation "reverse" induite par le ligand éphrine dans la cellule exprimant éphrine à sa surface ("reverse signaling"). Cette signalisation bidirectionnelle joue un rôle lors des contacts cellules/cellules, de la migration, et de l'adhésion des cellules.

15 On connaît de l'article de Wang H. U. *et al.*, "Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor EphB4", *Cell*, 1998; 93: 741-753, la spécificité d'expression artério-veineuse du couple EphB4/éphrine-B2, EphB4 étant uniquement exprimé par les veines, et éphrine-B2 étant exprimé par les artères.

20 25 Les récepteurs EphB et leurs ligands éphrine-B sont exprimés particulièrement durant le développement embryonnaire. Selon Wang Z. *et al.*, "Ephrin receptor, EphB4, regulates ES cell differentiation of primitive mammalian hemangioblasts, blood, cardiomyocytes and blood vessels", *Blood*, 2004; 103: 100-109, EphB4 semble intervenir lors de la différenciation de cellules embryonnaires (ES) de souris en cellules endothéliales.

30 35 On sait en outre que certains récepteurs Eph, notamment EphB4, sont surexprimés dans les tumeurs. Cette observation suggère que ces récepteurs Eph jouent un rôle dans la progression tumorale. L'article de Noren N. K. *et al.*, "Interplay between EphB4 on tumor cells and vascular ephrin-B2

regulates tumor growth", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 5583-5588, démontre que l'activation de éphrine-B2 par EphB4 (signalisation reverse) stimule la croissance tumorale.

En revanche, ce qui est observé par la littérature antérieure c'est (i) une augmentation de l'expression d'éphrine-B2 au cours de la tumorigénèse, et subsidiairement (ii) une inquiétude, du fait de cette augmentation, qu'éphrine-B2 serait susceptible d'induire des tumeurs. Ceci explique que plusieurs publications proposent d'utiliser la détection d'éphrine-B2 comme marqueur tumoral, d'une part, ou d'inhiber éphrine-B2, d'autre part. Voir en particulier (i) WO 02/058538 A, qui préconise la détection du ligand éphrine-B2 en tant que marqueur de la vasculature tumorale et décrit une technique permettant de visualiser ladite vasculature tumorale, (ii) US 2003/0207447 A, qui propose de faire appel à un inhibiteur de Eph, notamment EphB4, ou à un inhibiteur d'éphrine, notamment d'éphrine-B2, 15 pour limiter l'angiogenèse en empêchant l'interaction entre le récepteur et le ligand, (iii) US 6864227 A et WO 03/102144 A, qui recommandent d'utiliser un anticorps, soit un anti(Eph) [notamment un anticorps anti(EphB4)], soit un anti(éphrine) [notamment anti(éphrine-B2)], pour réduire ou moduler l'angiogenèse.

En bref, les documents de brevet publiés relatifs au couple Eph/éphrine concernent des méthodes ayant trait notamment à :

- la signalisation des éphrine-B (signalisation reverse) par des protéines se liant au domaine PDZ, voir WO 02/079382 A et WO 00/031124 ;
- la modulation de l'expression d'éphrine-B2 ou d'EphB4, voir notamment US 2004/0110150 A, WO 04/006846 A et WO 04/080418 ;
- l'inhibition de l'interaction éphrine-B2/EphB4 en vue de traiter les cancers et les maladies associées à l'angiogenèse, voir notamment le document WO 04/080418 A précité, et WO 04/069264 A ; et
- l'utilisation d'éphrine-B2 en tant que marqueur de la vasculature tumorale, voir notamment le document WO 02/058538 A précité.

En outre, l'article de MAEKAWA HIROMITSU *et Al* « Ephrin-B2 induces migration of endothelial cells through the phosphatidylinositol-3 kinase pathway and promotes angiogenesis in adult vasculature », *Arteriosclerosis thrombosis and vascular biology*, 2003, 23 : 2008-2014, 35 montre que le ligand éphrine-B2, couplé à la protéine Fc (i.e. le fragment Fc

d'un anticorps), induit la migration de cellules endothéliales, les HUVECs.

Enfin, on connaît de US 6610534 B un adénovirus ayant la séquence codante de la sphingosine kinase et une séquence codante d'une protéine angiogénique. L'objectif de ce brevet est l'expression de la sphingosine kinase et de la protéine angiogénique, qui peut-être éphrine-B2, après injection locale dudit adénovirus. Par ailleurs, on connaît de la publication US 2005/0049194 A une méthode pour diminuer la prolifération anormale de cellules souches hématopoïétiques, qui comprend l'administration par injection d'un inhibiteur hydrosoluble d'éphrine-B2.

10 ***But de l'invention***

Selon l'invention on se propose de fournir une nouvelle solution, non décrite ni suggérée par l'art antérieur précité, au problème technique de la stimulation de l'angiogenèse. Plus précisément, on se propose ici de fournir une nouvelle solution technique mettant en œuvre un système marqueur cellulaire/ligand spécifique dudit marqueur, qui est appliqué à des cellules particulières, à savoir des précurseurs de cellules endothéliales, pour résoudre le problème de la stimulation angiogénique. Le but poursuivi est d'améliorer les thérapies cellulaires antérieurement connues en activant les cellules avant leur injection, pour avoir une efficacité supérieure des processus de revascularisation, notamment la revascularisation post-ischémique.

20 ***Objet de l'invention***

La nouvelle solution selon l'invention met en œuvre un système marqueur cellulaire/ligand, où le dit marqueur est associé à une cellule précurseur de cellules endothéliales. Dans ce système, le marqueur est un récepteur Eph, et le ligand spécifique d'Eph est un ligand éphrine.

Selon un premier aspect de l'invention, on fournit un nouveau système proangiogénique du type marqueur cellulaire/ligand spécifique, ledit système, dans lequel le marqueur cellulaire est présent sur la membrane extérieure de la cellule, étant caractérisé en ce qu'il comprend :

- (a) un précurseur de cellule endothéliale (EPC) comportant un marqueur cellulaire choisi parmi l'ensemble constitué par les Eph, notamment EphB4 ou EphB1, et
- (b) un matériau protéinique de structure :

L-K (I)

qui est constitué d'un ligand (L) spécifique dudit marqueur, et
est associé ou fusionné avec une protéine de liaison (K),
notamment un fragment Fc d'anticorps,
5 ledit système étant capable de fournir un matériau cellulaire de structure :

EPC-Eph-L-K (II)

10 stimulant l'angiogenèse.

En d'autres termes, pour stimuler l'angiogenèse on active les cellules EPCs comportant le marqueur Eph par le ligand L spécifique appartenant à la famille des éphrines. Le ligand L peut également être constitué d'un fragment peptidique d'une éphrine par exemple de éphrine-B2 qui aurait 15 alors la même activité biologique.

Selon un second aspect de l'invention, on fournit un matériau cellulaire capable de stimuler l'angiogenèse, caractérisé en ce qu'il a pour structure :

EPC-Eph-L-K (II)

où ledit ligand L est associé à ou fusionné avec une protéine de liaison K.

Ce matériau cellulaire est susceptible (i) de se présenter sous la forme d'une culture cellulaire substantiellement purifiée ou sous la forme d'une culture cellulaire en association avec d'autres cellules précurseurs, notamment des cellules mononucléées, et (ii) d'être; le cas échéant, 25 congelé.

Selon un troisième aspect de l'invention, on fournit un procédé pour la préparation dudit matériau cellulaire, ledit procédé étant caractérisé en ce 30 qu'il comprend les étapes consistant à :

- faire appel à des EPCs exprimant sur leur membrane extérieure un marqueur de la famille des Eph, notamment EphB4 ou EphB1, et
- mettre en contact *in vitro* lesdits EPCs avec un matériau protéinique L-K où L est un ligand spécifique dudit marqueur et

K une protéine de liaison associée ou fusionnée à L.

On préconise également un médicament utilisable pour reconstituer les vaisseaux lésés, caractérisé en ce qu'il comprend, en association avec un excipient physiologiquement acceptable, une quantité thérapeutiquement acceptable du matériau cellulaire selon l'invention, notamment en tant qu'ingrédient actif proangiogénique.

On fournit enfin, selon un autre aspect de l'invention, une nouvelle utilisation dudit matériau cellulaire, ladite utilisation étant caractérisée en ce que l'on fait appel audit matériau cellulaire, en tant qu'ingrédient actif proangiogénique, en association avec un excipient physiologiquement acceptable, pour la préparation d'une composition pour usage thérapeutique dans le traitement des insuffisances vasculaires, notamment dans la revascularisation des tissus ischémés, cardiaques, cérébraux ou périphériques.

1.5 *Brève description des dessins*

Dans les dessins annexés,

- la figure 1, présentée en détail plus haut, illustre l'état antérieur des connaissances et représente schématiquement les récepteurs à tyrosine kinase, Eph, et leurs ligands du type éphrine-A ou du type éphrine-B ; et
- 2.0 - les figures 2 à 4 montrent graphiquement les propriétés proangiogéniques, eu égard aux essais qui ont été entrepris, du matériau cellulaire selon l'invention.

Description détaillée de l'invention

On connaît, notamment de l'article de Pasquale E. B., *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1997; 9(5):608, les spécificités des composants du système récepteur Eph/ligand éphrine Par commodité le tableau I, donné plus loin et établi d'après cet article (comme indiqué dans US 6579683 A), fournit ces spécificités pour certains couples, les ligands étant placés dans la seconde colonne par affinité décroissante vis-à-vis de leurs récepteurs consignés dans la première colonne.

3.0 Dans le système marqueur cellulaire/ligand spécifique selon l'invention, on peut concevoir que les deux composants du couple peuvent se présenter chacun sous la forme d'une séquence d'aminoacides ou, le cas échéant, sous la forme d'une séquence d'acides nucléiques. Il est cependant nettement plutôt préférable de disposer au départ d'un récepteur Eph

exprimé sur la membrane de EPC sous la forme d'une séquence d'aminoacides. De même, le ligand éphrine sera très avantageusement utilisé sous la forme d'une séquence d'aminoacides ou bien d'un fragment peptidique éphrine. En effet, c'est sous la forme d'aminoacides que Eph et éphrine se lient, l'interaction protéine/protéine étant nécessaire pour observer l'activité proangiogénique. En conséquence, dans ce qui suit, Eph et éphrine interviennent chacun exclusivement sous la forme protéinique d'une séquence d'aminoacides.

En tant que marqueur Eph, on peut utiliser ici un EphA ou un EphB. 10 Cependant, on préfère plutôt selon l'invention que le marqueur Eph soit un EphB, dès lors que les marqueurs EphB sont impliqués de façon prépondérante dans l'angiogenèse, alors que (dans l'état actuel des connaissances) les marqueurs EphA semblent intervenir principalement au niveau du système nerveux.

15 Selon l'invention, de façon avantageuse le marqueur EphB sera EphB4 ou EphB1 ; parmi les marqueurs EphB, EphB4 sera préféré à EphB1.

Parmi les ligands éphrine, on préfère selon l'invention les ligands éphrine-B, notamment éphrine-B2 ou éphrine-B1. En outre, un variant de éphrine-B2, par exemple, qui correspond à un fragment peptidique de 20 éphrine-B2 présentant la même activité biologique peut également être approprié.

En conséquence, dans le système selon l'invention on utilisera avantageusement le marqueur EphB4 ou EphB1, d'une part, et le ligand éphrine-B2 ou éphrine-B1, d'autre part, le couple Eph/éphrine plus particulièrement préféré selon l'invention étant EphB4/éphrine-B2.

Pour que le ligand L puisse activer EPC-Eph, il est important, dans la majorité des cas, qu'il soit associé à ou fusionné avec une protéine de liaison K sous la forme d'un matériau protéinique de structure :

30

L-K

(I)

la protéine éphrine-B2 recombinante étant, à la connaissance du Déposant, une substance susceptible d'activer EPC-Eph seule sans l'apport de ladite protéine de liaison K.

35

Parmi les protéines de liaison K, qui conviennent selon l'invention, on

peut notamment cité les nombreux fragments Fc d'anticorps (par exemple ceux obtenus par clivage d'anticorps par la pepsine, la papaïne ou toute autre substance appropriée). Par commodité, on recommande ici un fragment Fc, aisément disponible sur le marché en tant que sous produit de la préparation d'anticorps tels que Fab' et F(ab)².

En variante et compte tenu de ce qui précède, ledit matériau protéinique L-K est susceptible d'être remplacé par la protéine éphrine-B2 recombinante, de préférence humaine.

Les EPCs, qui conviennent selon l'invention, sont des cellules qui comportent un marqueur cellulaire Eph (notamment un EphB, de préférence EphB1 ou mieux EphB4) exprimé au niveau de leur membrane extérieure. De telles cellules EPCs sont obtenues à partir de cellules mononucléées ou de cellules exprimant CD34 ou CD133, qui proviennent de la moelle osseuse, du sang périphérique ou mieux du sang de cordon ombilical.

15

Les cellules mononucléées sont produites au niveau de la moelle osseuse, où elles se trouvent à une concentration importante, passent dans la circulation sanguine et se retrouvent dans le sang de cordon et dans le sang périphérique. Elles constituent un matériau de choix, en ce sens que parmi leur ensemble, un nombre important de cellules possède le matériel génétique requis pour (i) exprimer le marqueur Eph (et plus particulièrement le marqueur EphB4), ou (ii) comporter sur leur membrane extérieure ledit marqueur déjà exprimé. Les cellules mononucléées préférées selon l'invention sont celles qui sont CD34⁺ ou CD133⁺, car elles fournissent après différenciation une quantité relativement importante de EPCs qui expriment ou comportent substantiellement le marqueur EphB4.

La concentration des EPCs produites par différenciation, qui sont contenues dans la population de cellules mononucléées, varie selon l'origine des cellules. Ladite concentration est à peu près équivalente dans la moelle osseuse et le sang de cordon ombilical. En revanche, elle est plus faible dans le sang périphérique.

Le matériau cellulaire selon l'invention, qui est représenté par la structure II ci-dessus, dans laquelle le matériau protéinique L-K est

5 susceptible d'être remplacé par la protéine éphrine-B2 recombinante, est constitué d'une ou plusieurs cellules, possédant chacune sur sa membrane extérieure un marqueur Eph, notamment EphB4 ou EphB1, lié à son ligand spécifique. En variante, ledit matériau cellulaire peut être constitué d'une culture contenant plusieurs cellules de structure II en association, le cas échéant, avec d'autres cellules non activées par ledit matériau protéinique ; une telle culture peut donc être un mélange cellulaire de EPCs activées, de EPCs non activées et de cellules mononucléées.

10 Selon un mode particulier de l'invention, ledit matériau cellulaire est obtenu par incubation

- 15 (a) d'un précurseur de cellule endothéliale (EPC) comportant un marqueur cellulaire choisi parmi l'ensemble constitué par les Eph, notamment EphB4 ou EphB1, avec
(b) un matériau protéinique de structure :

20 L-K (I)

25 qui est constitué d'un ligand (L) spécifique dudit marqueur, et est associé ou fusionné avec une protéine de liaison (K), notamment un fragment Fc d'anticorps, avant d'être amené à son site d'administration.

30 Selon un mode avantageux de réalisation, l'incubation est effectuée *in vitro* pendant une durée de 10 à 60 minutes, notamment pendant 30 minutes, cette durée d'incubation se situant juste avant l'administration du matériau cellulaire.

35 En variante, ledit matériau cellulaire peut se trouver sous la forme d'une culture cellulaire qui est purifiée ou qui est un mélange de cellules contenant (i) des cellules EPCs activées par L-K ou la protéine éphrine-B2 recombinante, et (ii) des précurseurs non activé, par exemple des cellules mononucléées et/ou EPCs, qui ne sont pas activées par L-K ou ladite protéine éphrine-B2 recombinante. De plus, le matériau cellulaire peut être conservé à l'état congelé.

40 Le matériau cellulaire préféré selon l'invention, eu égard à ce qui a été indiqué plus haut, est de structure II où ledit marqueur est EphB4 ou EphB1, et où ledit ligand est éphrine-B2 ou éphrine-B1.

Suivant un mode préféré de mise en œuvre, le procédé de l'invention pour préparer ledit matériau cellulaire, comprend les étapes suivantes :

- 5 (1°) faire appel à des cellules mononucléées provenant de la moelle osseuse, du sang périphérique ou du sang de cordon ombilical,
- (2°) différencier lesdites cellules de l'étape précédente pour obtenir des EPCs pourvues du marqueur Eph, et
- (3°) activer *in vitro* les EPCs, ainsi obtenues à l'étape (2°), par fixation d'éphrine sur Eph.

10 Ledit procédé comprend, le cas échéant, une étape supplémentaire entre les étapes (1°) et (2°), à savoir :

- (1a°) isoler les cellules mononucléées CD34⁺ et/ou CD133⁺.

15 L'étape (1a°) implique un processus ternaire (1°) + (1a°) + (2°). Toutefois, la mise en œuvre de ladite étape (1a°) augmente les coûts de production par rapport au processus binaire (1°) + (2°). En pratique, comme les cellules EPCs non activées servent à la dilution des cellules EPCs activées dans le milieu cellulaire les contenant, sans gêner leur action, le processus binaire est à l'heure actuelle manifestement plus rentable que le processus ternaire.

20 Selon le procédé de l'invention, ledit ligand L est associé à ou fusionné avec une protéine de liaison K pour fournir un matériau cellulaire de structure :

25 EPC-Eph-L-K (II)

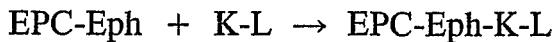
où avantageusement ledit marqueur Eph est EphB4 ou EphB1, et ledit ligand L est éphrine-B2 ou éphrine-B1.

30 En tant que médicament, le matériau cellulaire selon l'invention est utilisable pour traiter notamment les insuffisances vasculaires, en particulier dans la revascularisation des tissus ischémés cardiaques, cérébraux ou périphériques.

Le matériau cellulaire selon l'invention peut être conditionné sous forme de dose unitaire, chaque dose contenant le matériau de structure II.

35 En variante, on peut prévoir un conditionnement selon lequel les

composants dudit matériau II, à savoir EPC-Eph et le matériau protéinique L-K, ne sont pas en contact ; l'incubation selon le mécanisme réactionnel :



5

étant effectuée avant administration, notamment pendant les 10 à 60 minutes (de préférence pendant les 20 à 30 minutes) qui précèdent cette administration.

10 Dans ce cas, on préconise une composition médicamenteuse, qui est caractérisée en ce qu'elle comprend, une quantité thérapeutiquement acceptable des deux composants du système proangiogénique selon l'invention, qui sont conditionnés séparément, chacun dans un excipient physiologiquement acceptable, les deux dits composants étant incubés avant administration pour donner un matériau cellulaire de structure II.

15 Comme indiqué plus haut, le matériau cellulaire selon l'invention est utile pour régénérer les tissus vasculaires qui ont été endommagés notamment au niveau cardiaque, cérébral ou périphérique. Il convient en particulier pour la préparation d'une composition destinée au traitement de l'artérite, de l'insuffisance vasculaire coronarienne, ou cardiaque, et de 20 l'insuffisance vasculaire cérébrale. Sur un modèle animal, il a fourni de bons résultats dans le traitement de l'ischémie dite critique des membres inférieurs, d'une part, et l'assurance d'une guérison permettant d'éviter l'amputation.

25 Le matériau cellulaire selon l'invention peut être administré chez le mammifère et en particulier chez l'homme selon un mode connu en soi. Par exemple ledit matériau cellulaire est susceptible d'être (i) injecté au niveau ou au voisinage de la lésion vasculaire, (ii) injecté dans le sang par voie IV, ou encore (iii) amené au site de la lésion au moyen d'un vecteur approprié. En variante, on peut administrer séparément par voie injectable (notamment 30 par voie IV) les cellules EPC-Eph, d'une part, et le matériau protéinique lié à un vecteur connu dans le domaine de la thérapie génique, d'autre part.

Chez l'homme adulte, on peut administrer par injection IV des cellules de structure II contenues, le cas échéant, dans un mélange cellulaire de EPCs non activées. Un tel mélange cellulaire peut comporter un total 35 d'environ 10^5 à 10^9 cellules par injection.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention seront mieux compris à la lecture qui va suivre d'exemples de préparation et d'essais pharmacologiques. Bien entendu, l'ensemble de ces éléments n'est pas limitatif mais est donné à titre d'illustration, le matériau cellulaire utilisé 5 étant : EPC-EphB4-éphrine-B2-Fc.

Exemple 1

Obtention de EPC-EphB4

(A) On prélève des échantillons (de 30 à 50 ml chacun) de sang de cordon ombilical humain que l'on place dans des tubes stériles contenant 10 une solution anticoagulante d'héparine sodique. On isole, par centrifugation de gradient de densité au moyen de Pancoll (1,077 g/ml, produit commercialisé par la société dite DOMINIQUE DUTSCHER S.A, Brumath, France), les cellules mononucléées du sang de cordon ombilical. Les cellules mononucléées sont ensuite séparées des cellules adhérentes par 15 culture sur des boites en plastique pendant 24 heures à 37°C. On obtient un mélange cellulaire contenant des cellules mononucléées exprimant le marqueur EphB4 et des cellules mononucléées n'exprimant pas ledit marqueur.

(B) Le mélange cellulaire, obtenu à l'issue de l'exemple 1(A), est placé 20 dans les puits d'une plaque à 6 puits revêtus de collagène de type I (produit commercialisé par la société dite SIGMA-ALDRICH, Saint-Quentin, France) dans un milieu de culture contenant hVEGF pour différenciation (comme défini dans l'article de Le Ricousse-Roussanne S. et al., *Cardiosvasc. Res.*, 2004; 62: 176-184). Après 15 jours de culture, 25 on recueille un mélange cellulaire enrichi en EPC-EphB4.

Exemple 2

Obtention de EPC-EphB4

(A) A partir du mélange cellulaire obtenu à l'issue de l'exemple 1(A), on isole et purifie les cellules CD34⁺ des cellules non adhérentes par une 30 technique de séparation immunomagnétique standard, notamment au moyen du matériel "CD34 isolation Kit" (commercialisé par la société dite MILTENYI BIOTECH, Paris France), qui comporte un anticorps monoclonal anti-CD34. L'analyse des cellules, ainsi obtenues, par cytométrie de flux et en utilisant un anticorps monoclonal anti-CD34 (de 35 préférence différent du précédent) couplé au FITC, montre que 75% (\pm

5,6%) d'entre elles possèdent le marqueur CD34.

(B) Le mélange cellulaire, ainsi obtenu, qui contient $1,5 \times 10^6$ à $3,5 \times 10^6$ cellules CD34⁺, peut être placé dans les puits d'une plaque à 6 puits revêtus d'une matrice contenant fibronectine, laminine, sulfate sodique 5 d'héparane, et collagène de type I et IV (produits commercialisés par la société dite SIGMA-ALDRICH précitée) et dans un milieu de culture contenant hVEGF, bFGF et IGF1 (produits commercialisés par la société dite R&D SYSTEMS INC., Oxford, Royaume-Uni). Après 15 jours de culture, on recueille un mélange cellulaire enrichi en EPC-EphB4.

10 **Exemple 3**

Obtention de EPC-EphB4-éphrine-B2-Fc

Après obtention du mélange cellulaire selon l'exemple 1(B), qui contient des cellules EPCs pourvues du marqueur EphB4, on le traite avec 15 $3\mu\text{g}/\text{ml}$ de protéine de fusion Ephrine-B2-Fc, EphB4-Fc ou CD6-Fc (CD6-Fc intervenant en tant que contrôle négatif pour la démonstration de l'effet observé par l'activation des EPCs par éphrine-B2) pendant une durée d'incubation de 30 minutes à 37 °C. On écarte par rinçage chaque protéine de fusion non lié (au moins deux rinçages sont effectués ici).

On obtient trois mélanges cellulaires dont l'un contient le matériau 20 cellulaire selon l'invention de structure EPC-EphB4-éphrine-B2-Fc, le second contient le matériau cellulaire résultant de l'activation de EPC par la protéine de fusion EphB4-Fc, et le troisième contient le matériau cellulaire résultant de l'activation de EPC par la protéine de fusion CD6-Fc.

Exemple 4

Obtention de EPC-EphB4-éphrine-B2-Fc

On procède comme indiqué à l'exemple 3 pour l'obtention de cellules de structure EPC-EphB4-éphrine-B2-Fc, avec la différence que le mélange cellulaire de départ est celui obtenu à l'issue de l'exemple 2(B). On obtient les cellules activées annoncées.

30 **Protocole des essais**

A l'instant T = 0, on procède à la ligature de l'artère fémorale droite de souris mâles Nude âgées de 7 semaines (un lot de 6 animaux par essai et par produit à tester, y compris les témoins PBS, EPCs non activées et HUVEC) pour induire une ischémie. A l'instant T = + 4,5 h, on met en œuvre 35 l'incubation selon l'exemple 3 pour obtenir le matériau cellulaire de

structure EPC-EphB4-éphrine-B2-Fc selon l'invention et les deux autres matériaux cellulaires de comparaison. Ensuite, à l'instant $T = + 5$ h, on injecte par voie intraveineuse au niveau du sinus rétro-orbital chacun des trois mélanges cellulaires obtenus à l'exemple 3 (10^6 cellules/souris). A 5 l'instant $T = + 12$ j, les souris sont sacrifiées et les muscles gastrocnemius de la patte ischémie et de la patte non ischémie sont prélevés. On détermine :

- 10
- le score angiographique ;
 - la densité capillaire (i. e. le nombre de capillaires/mm²) ; et
 - le flux sanguin cutané.

Dans les figures 2-4, les valeurs numériques obtenues sont présentées sous la forme : moyenne \pm SEM.

Essai 1

Score angiographique

15 Le score angiographique (i. e. densité des vaisseaux) a été déterminé par micro-angiographie. Plus précisément, la densité des vaisseaux dans le membre ischémie par rapport au membre non ischémie est mesurée par une micro-angiographie de haute définition (voir modalités opératoires dans l'article de Sivestre J. S *et al.*, *Cir. Res.*, 2001; 89: 259-264). Les résultats 20 obtenus, présentés sous forme de rapport (patte ischémie/patte non ischémie), sont consignés graphiquement à la figure 2.

25 On observe que l'injection des EPCs non activées ou activées par la protéine de fusion EphB4-Fc ou CD6-Fc augmentet légèrement, et à des niveaux comparables, la densité des vaisseaux par rapport au groupe contrôle ayant reçu le PBS. Lorsque les cellules EPCs sont activées par la protéine de fusion éphrine-B2-Fc, on constate que l'augmentation de la densité des vaisseaux est de 25,5% plus importante que celle observée après injection des EPCs non activées, soit une augmentation du score angiographique de 1,34 fois.

30 *Essai 2*

Densité capillaire (nombre de capillaires/mm²)

La densité capillaire du muscle ischémie a été étudiée par marquage de coupes du muscle gastrocnemius au moyen d'un anticorps dirigé contre le marqueur CD31, qui est spécifique des cellules endothéliales, par rapport 35 aux coupes du même muscle du membre non ischémie. Les résultats

obtenus, présentés sous forme de rapport (patte ischémiee/patte non ischémiee), sont consignés graphiquement à la figure 3.

On observe que la densité capillaire est de 36,7% plus importante lorsque les souris ont été traitées par injection avec les EPCs activées avec 5 la protéine de fusion éphrine-B2-Fc selon l'invention, par rapport aux EPCs non activées, soit une augmentation de la densité capillaire de 1,57 fois.

Essai 3

Flux sanguin cutané

Une évaluation quantitative du flux sanguin, exprimée par le ratio du 10 flux sanguin membre ischémie/membre non ischémie, a aussi été réalisée afin de vérifier que la variation du nombre de vaisseaux correspond à une adaptation fonctionnelle et donc à une variation de la perfusion du membre ischémie. Les résultats obtenus sont consignés graphiquement à la figure 4.

On observe que l'injection des EPCs activées selon l'invention par la 15 protéine de fusion éphrine-B2-Fc augmente le ratio du flux sanguin du membre ischémie à celui du membre non ischémie de 1,37 fois (augmentation de 27,1%).

Exemple 5

Rôle du marqueur EphB4

Dans ce dernier exemple, le rôle du marqueur EphB4 a été démontré grâce à des préparations cellulaires dans lesquelles la synthèse protéinique du marqueur EphB4 a été inhibée.

Pour cela, on a fait appel à des « ARN interférences » ou « siRNA », 25 en langue anglaise, capables notamment, de dégrader spécifiquement les ARN messagers codant pour un gène donné, et en particulier ici pour le gène exprimant le marqueur EphB4. L'action spécifique de ces ARN interférences est dénommée transfection.

Ces préparations cellulaires ont été administrées à des souris mâles 30 Nude selon un protocole d'essais analogue au protocole d'essais précité.

En premier lieu, des cellules endothéliales progénitrices, ou EPCs sont cultivées jusqu'à 80 % de confluence. Des solutions de siRNA EphB4, c'est-à-dire contenant l'ARN interférence, capable d'inhiber la synthèse protéinique du marqueur EphB4 sont dilués dans un milieu M199 ne 35 contenant ni antibiotiques, ni sérum et incubées pendant cinq minutes à

température ambiante. Par ailleurs, une solution de « siRNA contrôle » ne correspondant à aucun gène particulier, est diluée dans les mêmes conditions. Cette dernière solution diluée qui n'a donc aucun effet biologique sur l'expression du marqueur EphB4 va simplement permettre de vérifier que les ARN interférences n'ont pas d'activité propre indépendamment de leur rôle d'inhibiteur.

Par ailleurs, un agent de transfection, le Dharmafect2 (Dharmacon, Perbio) est préparé dans les mêmes conditions que les solutions précitées, puis mélangé à ces solutions, lesquelles sont alors incubées ensuite.

Ces solutions incubées sont alors mises en contact avec les cellules endothéliales progénitrices EPCs de manière à, dans une première préparation cellulaire, provoquer l'inhibition de la synthèse protéinique du marqueur EphB4, et dans une deuxième préparation cellulaire où l'expression du gène codant pour le marqueur EphB4 n'est pas inhibée, à constituer un témoin.

Ces deux préparations cellulaires seront à leur tour respectivement divisées en deux et l'une d'entre elles sera stimulée avec la protéine de fusion éphrine-B2-Fc avant d'être injectée par voie intraveineuse aux souris ayant subi une ligature de l'artère fémorale droite. De la sorte, quatre préparations cellulaires différentes seront administrées aux souris.

On trouvera dans le tableau I suivant, une synthèse des résultats de cet exemple 5.

Tableau I

25

N°	PBS	1	2	3	4
Score Angiographie	100	161,5 +/- 10,7	218,8 +/- 12,8	153,5 +/- 2,9	158,9 +/- 12,5
Flux Sanguin	100	144,5 +/- 4,5	193,5 +/- 4,7	151,1 +/- 8	138,5 +/- 14,1
Densité Capillaire	100	147,4 +/- 10,7	201,7 +/- 12,8	142,6 +/- 11	140,8 +/- 11,3

1 : EPCs transfectées avec le siRNA contrôle et non stimulées avant injection ;

- 2 : EPCs transfectées avec le siRNA contrôle et stimulées avec éphrine-B2-Fc avant injection
- 3 : EPCs transfectées avec le siRNA EphB4 et non stimulées avant injection ;
- 5 4 : EPCs transfectées avec le siRNA EphB4 et stimulées avec éphrine-B2-Fc avant injection.

On notera là encore, que les mesures du score angiographique, du flux sanguin et de la densité capillaire pour les quatre préparations cellulaires administrées, évoluent de manière sensiblement parallèle.

10 Par ailleurs, il apparaît immédiatement que le résultat des mesures des préparations cellulaires n° 1, 3 et 4 sont sensiblement identiques alors que le résultat de la préparation cellulaire n°2 est supérieur de près de 40 %.

15 L'hypothèse étant bien évidemment que l'activité pro-angiogénique est favorisée par l'association du marqueur EphB4 et du matériau protéinique éphrine-B2-Fc, on constate à la lecture du tableau I, en comparant les résultats des préparations cellulaires n° 1 et 4, que l'effet des cellules endothéliales progénitrices incorporant le « siRNA contrôle » mais non associées au matériau protéinique éphrine-B2-Fc est sensiblement équivalent à l'effet des cellules endothéliales progénitrices dont l'expression 20 du marqueur EphB4 est inhibée mais qui elles sont associées au matériau protéinique éphrine-B2-Fc. Ainsi, il est montré que les ARN interférences n'ont pas d'activité propre indépendamment de leur rôle d'inhibiteur et que les cellules endothéliales progénitrices EPCs exprimant le marqueur EphB4 n'ont pas plus d'activité que les cellules endothéliales progénitrices EPCs 25 n'exprimant pas le marqueur et qui sont associés au matériau protéinique éphrine-B2-Fc.

Par ailleurs, en comparant les résultats des mesures des préparations cellulaires n° 1 et 3, il est montré que les cellules endothéliales progénitrices EPCs seules, exprimant le marqueur EphB4 ou ne l'exprimant pas ont une activité comparable.

30 En outre, et c'est là l'essentiel, il est bien montré au vu des résultats de la préparation cellulaire n°2 et en comparaison de l'une quelconque des autres préparations, que l'association spécifique du marqueur EphB4 et du matériau protéinique éphrine-B2-Fc présente une activité pro-angiogénique 35 importante.

Tableau II

Spécificités pour quelques couples Eph/éphrine

5

Récepteurs Eph	Ligands éphrine (par affinité décroissante)
EphA1	éphrine-A1
EphA2	éphrine-A3, -A1, -A5, -A4
EphA3	éphrine-A5, -A2, -A3, -A1
EphA4	éphrine-A5, -A1, -A3, -A2, -B2, -B3
EphA5	éphrine-A5, -A1, -A2, -A3, -A4
EphA6	éphrine-A2, -A1, -A3, -A4, -A5
EphA7	éphrine-A2, -A3, -A1
EphA8	éphrine-A5, -A3, -A2
EphB1	éphrine-B2, -B1, -A3
EphB2	éphrine-B1, -B2, -B3
EphB3	éphrine-B1, -B2, -B3
EphB4	éphrine-B2, -B1

REVENDICATIONS

1. Système proangiogénique du type marqueur cellulaire/ligand spécifique, ledit système, dans lequel le marqueur cellulaire est présent sur la membrane extérieure de la cellule, étant caractérisé en ce qu'il comprend :
- 5 (a) un précurseur de cellule endothéliale (EPC) comportant un marqueur cellulaire choisi parmi l'ensemble constitué par les Eph, notamment EphB4 ou EphB1, et
- 10 (b) un matériau protéinique de structure :

L-K (I)

15 qui est constitué d'un ligand (L) spécifique dudit marqueur, et est associé ou fusionné avec une protéine de liaison (K), notamment un fragment Fc d'anticorps A,
ledit système étant capable de fournir un matériau cellulaire de structure :

EPC-Eph-L-K (II)

20 20 stimulant l'angiogenèse.

2. Système suivant la revendication 1, caractérisé en ce que ledit marqueur Eph est sous la forme d'une séquence d'aminoacides.
3. Système suivant la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que ledit marqueur Eph est un EphB.
- 25 4. Système suivant l'une quelconque de revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ledit marqueur est EphB4 ou EphB1, et en ce que ledit ligand est éphrine-B2 ou éphrine-B1.
5. Système suivant l'une quelconque de revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ledit ligand (L) est un fragment peptidique d'éphrine.
- 30 6. Système suivant la revendication 1, caractérisé en ce que ledit matériau protéinique L-K est remplacé par la protéine éphrine-B2 recombinante.
7. Système suivant l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que les EPCs sont obtenues à partir de cellules
- 35

mononucléées ou de cellules exprimant CD34 ou CD133, qui proviennent de la moelle osseuse, du sang périphérique ou mieux du sang de cordon ombilical.

8. Système suivant l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que les EPCs sont obtenues à partir de sang périphérique ou de sang de cordon ombilical.

9. Matériau cellulaire capable de stimuler l'angiogenèse, caractérisé en ce qu'il a pour structure :

EPC-Eph-L-K (II)

10

où ledit ligand L est associé à ou fusionné avec une protéine de liaison K, ledit matériau cellulaire étant susceptible (i) de se présenter sous la forme d'une culture cellulaire substantiellement purifiée ou sous la forme d'une culture cellulaire en association avec d'autres cellules précurseurs, notamment des cellules mononucléées, et (ii) d'être; le cas échéant, congelé.

10. Matériau cellulaire suivant la revendication 8, caractérisé en ce qu'il est obtenu par incubation

- (a) d'un précurseur de cellule endothéliale (EPC) comportant un marqueur cellulaire choisi parmi l'ensemble constitué par les Eph, notamment EphB4 ou EphB1, avec
- (b) un matériau protéinique de structure :

L-K (I)

25

qui est constitué d'un ligand (L) spécifique dudit marqueur, et est associé ou fusionné avec une protéine de liaison (K), notamment un fragment Fc d'anticorps, avant d'être amené à son site d'administration.

30 11. Matériau cellulaire suivant la revendication 9 ou 10, caractérisé en ce que ledit marqueur est EphB4 ou EphB1, et en ce que ledit ligand est éphrine-B2 ou éphrine-B1.

12. Matériau cellulaire selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisé en ce que ledit ligand est un fragment peptidique d'éphrine.

35 13. Procédé pour la préparation d'un matériau cellulaire selon l'une

quelconque des revendications 7 à 8, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

- faire appel à des EPCs exprimant sur leur membrane extérieure un marqueur de la famille des Eph, notamment EphB4 ou EphB1, et
- mettre en contact *in vitro* lesdits EPCs avec un matériau protéinique L-K où L est un ligand spécifique dudit marqueur et K une protéine de liaison associée ou fusionnée à L.

14. Procédé suivant la revendication 13, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- (1°) faire appel à des cellules mononucléées provenant de la moelle osseuse, du sang périphérique ou du sang de cordon ombilical,
- (2°) différencier lesdites cellules de l'étape précédente pour obtenir des EPCs pourvues du marqueur Eph, et
- (3°) activer *in vitro* les EPCs, ainsi obtenues à l'étape (2°), par fixation d'éphrine sur Eph.

15. Procédé suivant la revendication 14, caractérisé en ce qu'il comprend, entre les étapes (1°) et (2°), une étape supplémentaire :

20 (1a°) isoler les cellules mononucléées CD34⁺ et/ou CD133⁺.

16. Procédé suivant la revendication 14, caractérisé en ce que, à l'étape (1°), les cellules mononucléées proviennent du sang périphérique ou du sang de cordon ombilical.

17. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 13 à 16, caractérisé en ce que ledit ligand L est associé à ou fusionné avec une protéine de liaison K pour fournir un matériau cellulaire de structure :

EPC-Eph-L-K (II)

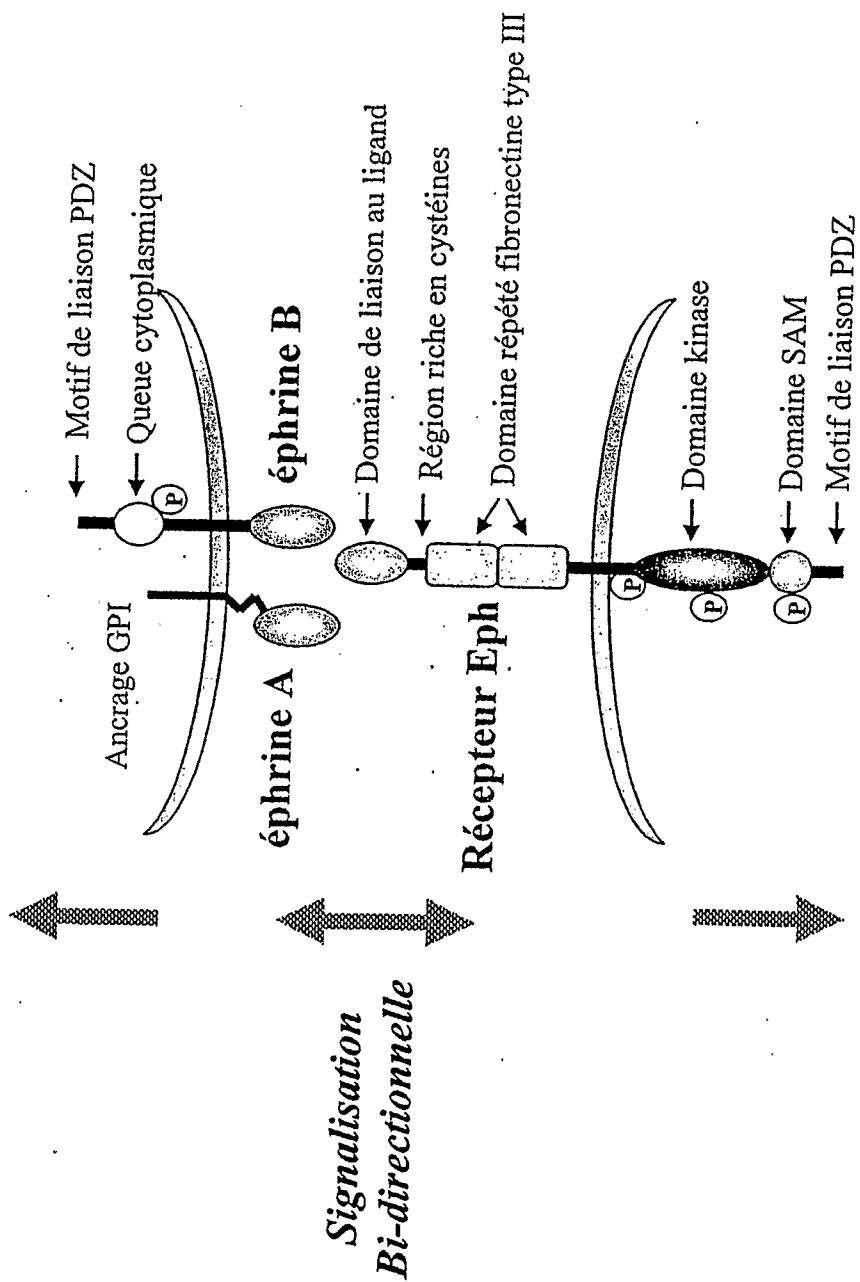
30 où K est Fc.

18. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 13 à 17, caractérisé en ce que le marqueur est EphB4 ou EphB1, et en ce que ledit ligand L est éphrine-B2 ou éphrine-B1.

19. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 13 à 18, caractérisé en ce que ledit ligand est un fragment peptidique d'éphrine.

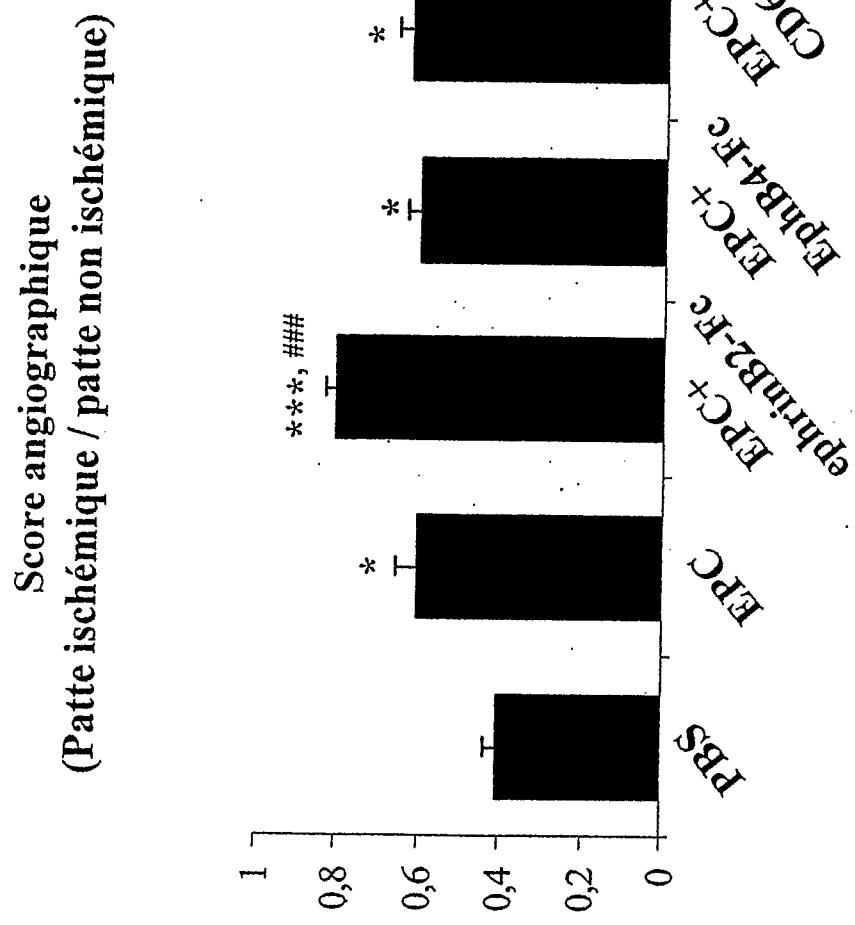
20. Médicament utilisable pour reconstituer les vaisseaux lésés, caractérisé en ce qu'il comprend, en association avec un excipient physiologiquement acceptable, une quantité thérapeutiquement acceptable d'un matériau cellulaire selon l'une quelconque des revendications 9 à 12,
5 notamment en tant qu'ingrédient actif proangiogénique.
21. Composition médicamenteuse pour reconstituer les vaisseaux lésés, caractérisée en ce qu'elle comprend, une quantité thérapeutiquement acceptable des deux composants d'un système proangiogénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, qui sont conditionnés séparément,
10 chacun dans un excipient physiologiquement acceptable, les deux dits composants étant incubés avant administration pour donner un matériau cellulaire de structure II.
22. Utilisation d'un matériau cellulaire, ladite utilisation étant caractérisée en ce que l'on fait appel à un matériau cellulaire selon l'une quelconque des revendications 9 à 12, en tant qu'ingrédient actif proangiogénique, en association avec un excipient physiologiquement acceptable, pour la préparation d'une composition pour usage thérapeutique dans le traitement des insuffisances vasculaires, notamment dans la revascularisation des tissus ischémiques, cardiaques, cérébraux ou périphériques.
15
23. Utilisation suivant la revendication 22, caractérisée en ce que ladite composition est destinée au traitement de l'artérite, de l'insuffisance coronarienne, de l'insuffisance cardiaque ou de l'insuffisance cérébrale.
20

Fig. 1



2/4

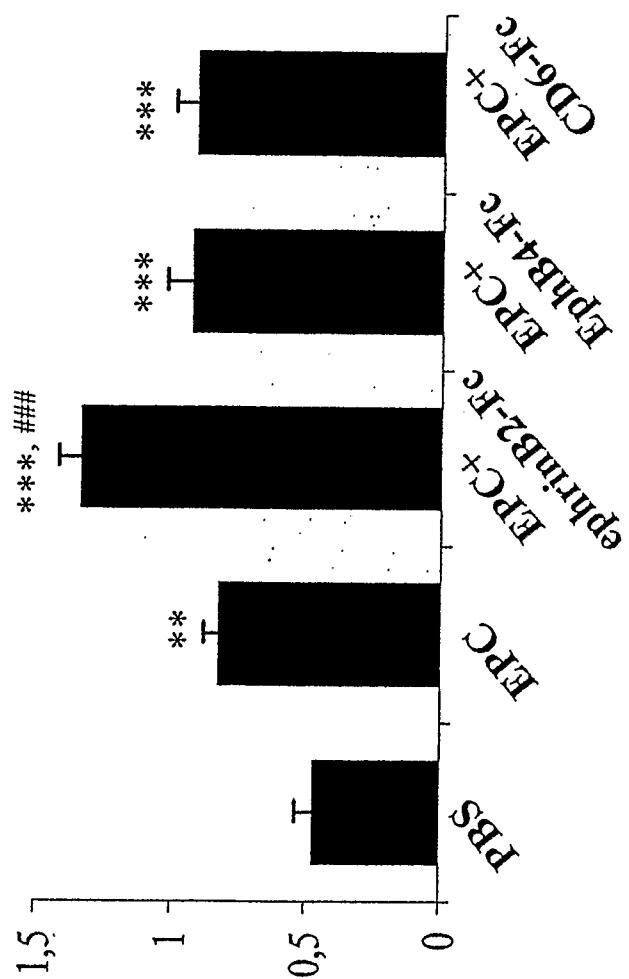
Fig. 2



3/4

Nombre de capillaire (marquage CD31) / mm²
(Patte ischémique / patte non ischémique)

Fig. 3



4/4

Fig. 4

Flux sanguin cutané
(Patte ischémique / patte non ischémique)

