

Développements actuels de la Thérapie Cellulaire  
dans le cadre des syndromes ischémiques cardiovasculaires

**Auteurs :**

Ph Hénon, S. Pasquet-Vallejo, H. Sovalat,

*Institut de Recherche en Hématologie et Transplantation (IRHT)*

*Hôpital du Hasenrain,*

*87 avenue d'Altkirch*

*68100 Mulhouse, FRANCE*

Développement actuels de la Thérapie Cellulaire dans le cadre des  
syndromes ischémiques cardiovasculaires

*Dr Philippe HENON*

**Résumé de l'article**

La “médecine régénératrice” est une nouvelle approche thérapeutique basée sur l'utilisation de cellules souches humaine sensées être capables de régénérer fonctionnellement et structurellement un tissu organique irrémédiablement lésé. L'utilisation de cellules souches adultes (CSA), de différents types et sources, représente pour le moment l'approche la plus facile et la plus réaliste.

Dans le cadre des syndromes ischémiques cardio-vasculaires (infarctus du myocarde, ischémie critique chronique des membres inférieurs), il se dégage des nombreux essais cliniques réalisés au cours de la dernière décade, que le type cellulaire semblant donner les améliorations cliniques les plus sensibles soit la population de cellules souches sanguines CD34+ contenant différentes sous-populations pré-différenciées dans le sens cardiaque et/ou endothélial.

Cette nouvelle approche thérapeutique pourrait représenter dans un futur très proche, un véritable traitement « de rupture » de ces syndromes ischémiques cardio-vasculaires, à ce jour non guérissables par les traitements actuels, qu'ils soient médicamenteux, interventionnels ou chirurgicaux.

## **Journées Internationales Francophones d'Angiologies – JIFA**

### Développement actuels de la Thérapie Cellulaire dans le cadre des syndromes ischémiques cardiovasculaires

*Dr Philippe HENON*

#### **Abstract**

The new concept of « regenerative medicine » is based on the therapeutic use of human stem cells supposed to be able to induce both the structural and the functional regeneration of organic tissues severely damaged. In this way, adult stem cells (ASC) presently represent the most realistic option.

From several clinical assays performed within the last decade in the field of cardio-vascular diseases (myocardial infarct or limb severe ischemia), it seems that the most efficient type of stem cells in terms of clinical improvement would be the blood CD34+ stem cell population, containing both cardiac muscle and endothelial progenitor cells.

This new therapeutic approach could actually represent in the very next future, a “disrupture” treatment of these cardio-vascular diseases, which are still non-curable whichever the currently available therapeutic options (drug, stents, cardiac surgery).

## Introduction

Le concept de « médecine régénératrice », fondé sur l'utilisation thérapeutique de cellules souches humaines (CS), est né avec ce siècle et promet d'y révolutionner le traitement de nombreuses maladies à ce jour incurables, liées au dysfonctionnement ou à la destruction irréversible de différents tissus organiques. Les CS seraient en effet capables, dans certaines conditions, de régénérer la structure et la fonction de tissus lésés.

L'utilisation thérapeutique de cellules souches embryonnaires (CSE) (issues du trophoblaste d'un embryon de 7 jours) serait, en théorie, la mieux appropriée compte-tenu du caractère pluripotent des CSE. Toutefois, même en faisant abstraction des débats éthiques conflictuels qu'elle déclenche, elle reste très hypothétique tant que n'auront pas été résolus les très nombreux problèmes techniques qui y sont liés.

Au contraire, l'utilisation de cellules souches « adultes » (CSA) représente une approche plus réaliste et plus facilement réalisable à court terme, de plus éthiquement irréprochable. En effet, si les greffes de cellules souches hématopoïétiques (CSH), médullaires ou sanguines, sont pratiquées de longue date dans le cadre du traitement des hémopathies malignes et représentent en fait le premier exemple de médecine régénératrice, de nouveaux développements expérimentaux et/ou cliniques ont commencé à diversifier les indications de cette option thérapeutique, au cours de la dernière décennie.

Différentes sources de CSA autologues ont été (et sont encore) étudiées en ce sens avec des résultats inégaux : moelle osseuse, sang périphérique, sang de cordon ombilical ou gelée de Wharton, muscle squelettique, tissu adipeux, cartilage,...

Quant aux indications thérapeutiques, les mieux explorées à ce jour sont les syndromes ischémiques cardio-vasculaires : infarctus du myocarde (IDM) et/ou insuffisance cardiaque post-ischémique, ischémie chronique des membres inférieurs.

### **I. Cardiomyoplastie cellulaire autologue**

Son but est de régénérer structurellement et fonctionnellement la zone myocardique ischémique post-infarctus, d'une part en y remplaçant les cellules myocardiques détruites par des cellules originaires d'un autre tissu mais (éventuellement) capable d'acquérir un phénotype myocardique, d'autre part en activant un processus de néo-angiogénèse permettant sa revascularisation. De nombreux essais cliniques pilotes et randomisés ont été réalisés, ces dernières années, utilisant différentes sources cellulaires avec des résultats très variables.

#### **Myoblastes :**

L'injection intra-cardiaque directe, au cours d'une opération de pontage, de myoblastes prélevés par biopsie dans le muscle de la cuisse puis multipliés en culture *in vitro*, avait, dans un premier temps, semblé améliorer sensiblement la contractilité segmentaire et l'activité métabolique (visualisée au TEPscan) de la zone cicatricielle chez des patients ayant fait un IDM relativement ancien (environ 1 ans), contrastant toutefois avec l'absence de toute néo-angiogénèse à ce niveau. En outre, 40% des patients avaient rapidement présenté une arythmie supra-ventriculaire sévère à risque léthal, nécessitant la pose d'un défibrillateur implantable, et résultant probablement d'une différence entre les propriétés contractiles et électrophysiques respectives des myoblastes réinjectés et des cardiomyocytes résiduels [1]. Malgré cela un essai Phase II randomisé multicentrique international

reprenant la même procédure (essai MAGIC) a pu être autorisé [2]. 300 patients atteints d'IDM devaient être inclus, avec pose systématique d'un défibrillateur implantable, ce qui pouvait toutefois paraître discutable, tant sur le plan éthique que financier. Une évaluation intermédiaire des 100 premiers patients à d'ailleurs conduit à l'arrêt définitif de cet essai, du fait de l'absence d'amélioration significative de la fonction myocardique et de la survenue de troubles du rythme supra-ventriculaires encore fréquents malgré le défibrillateur implantable.

### **Cellules mononucléées (CMN) de la moelle osseuse**

Les résultats de plusieurs travaux expérimentaux chez la souris ou le rat ayant suggéré que la CSH primitive de la moelle osseuse serait capable de se différencier en cardiomyocytes et/ou en cellules endothéliales (concept de « plasticité cellulaire ») [3-5] de nombreuses équipes ont rapidement cherché à exploiter cliniquement pour le traitement de l'IDM cette capacité potentielle au cours d'essais pilotes, puis d'essais Phase II randomisés. En fait, la plupart des équipes se sont contentées de prélever et de concentrer les CMN de la moelle osseuse de patients ayant fait un infarctus du myocarde et de les réinjecter soit directement dans la zone infarctée [6-8] soit par cathétérisation intra-coronaire [9-12]. Les résultats de ces essais ont été très disparates, certains montrant une amélioration significative de la fonction cardiaque, d'autres non.

En réalité, tout en ayant le mérite de démontrer la faisabilité et l'absence d'effets secondaires notables de ces deux modes d'injection, ces essais posent plus de problèmes qu'ils n'en résolvent, pour plusieurs raisons conceptuelles :

- Tout d'abord, les CMN médullaires représentent en fait un mélange de populations très hétérogènes (entre autres, CSH et cellules souches

mésenchymateuses (CSM)) : il est donc impossible de déterminer quel(s) type(s) cellulaire(s) serai(en)t éventuellement impliqué(s), après réinjection, dans le processus de régénération cardiaque, si c'est le cas, et, à fortiori, de pouvoir estimer les doses optimales de cellules à réinjecter. Par exemple, les quantités de cellules CD34+, contenus dans les greffons, lorsqu'elles ont été évaluées, sont sans doute trop faibles (2 à 3 X 10<sup>6</sup> au total) pour être efficaces, si elles sont impliquées dans la régénération cardiaque (cf. plus loin).

- Le fait que, dans la plupart des protocoles, la réinjection cellulaire ait été systématiquement associée à la reperméabilisation interventionnelle ou chirurgicale de la zone infarctée, ne permet pas de savoir ce qui, en cas d'amélioration de la fonction cardiaque, revient à l'une ou à l'autre procédure.

- En outre, il a été démontré que la réinjection intra-coronaire des cellules ne permet qu'à une petite fraction d'entre elles (10 à 15%) de migrer et se fixer dans la zone myocardique lésée [13], ce qui ne peut que minimiser l'éventuel processus de régénération et explique probablement les résultats moins significatifs des protocoles utilisant cette voie d'administration par rapport à ceux utilisant la réinjection intracardiaque directe [14, 15].

- Enfin, la plupart des patients inclus dans ces essais cliniques présentaient un IDM de moyenne sévérité avec fonction ventriculaire gauche relativement préservée et risques faibles de développement d'insuffisance cardiaque et/ou de mortalité, rendant difficilement interprétable une amélioration de quelques points seulement de la fraction d'éjection.

## **Cellules souches mésenchymateuses (CSM)**

Quelle que soit leur source (moelle osseuse, gelée de Wharton, par exemple), les CSM ont été ou sont utilisées dans plusieurs protocoles de cardiomyoplastie clinique dont la plupart sont en cours d'évaluation finale [16]. Une fois réinjectées dans la zone myocardique lésée, elles semblent simplement capables de limiter l'extension du processus fibro-cicatriciel aux tissus myocardiques « sidérés » péri-lesionnels, en favorisant leur néo-vascularisation grâce à la libération de facteurs néo-angiogénétiques. En aucun cas la régénération du tissu musculaire myocardique n'a par contre été observée. On observe certes une amélioration rapide de la fraction d'éjection, mais restant très modérée et ne progressant plus au fil des mois.

## **Les cellules CD34+ sanguines**

L'antigène CD34, identifié par C. Civin en 1984 sur la membrane des CSH [17], a été d'abord considéré comme spécifique de ces dernières, alors considérées comme « cellules CD34+ ». Ces cellules CD34+ peuvent être mobilisées de la moelle osseuse vers le sang périphérique après chimiothérapie aplasante et/ou injection d'un facteur de croissance hématopoïétique par exemple le G-CSF. C'est en utilisant cette propriété que quelques équipes, dont la nôtre [18], ont pu développer dès 1986 la technique dite « de greffe de cellules souches sanguines » qui a maintenant quasiment supplanté la greffe de moelle osseuse dans le traitement des hémopathies malignes.

Cependant, dès la fin des années 1990, il est apparu que cette population supposée homogène de cellules CD34+, contenait en fait différentes sous-populations de cellules souches ayant différentes capacités de différenciation, ne représentant à chaque fois qu'un faible pourcentage (~ 1% en moyenne chaque) des

cellules CD34+ totales : CSH proprement dites [19], progéniteurs endothéliaux (PE) [20]. En outre, plusieurs travaux expérimentaux chez la souris suggéraient l'hypothèse que la CSH murine pourrait se différencier, sous certaines conditions, en cardiomyocytes [5, 21] capables de « réparer » un tissu myocardique lésé après IDM expérimental.

Notre équipe a pu par la suite démontrer pour la première fois que, au moins chez l'homme, dans le sang périphérique, il existait en fait une sous-population de cellules CD34<sup>+</sup> supplémentaire, **non hématopoïétique**, ayant toutes les caractéristiques immunophénotypiques, moléculaires et fonctionnelles de précurseurs cardiomyocytaires [22].

- Analysant par cytométrie en flux (CMF) les produits de cytophérèse de patients cancéreux et de sujets cardiaques inclus dans un essai Phase 1 (voir plus loin) nous avons pu ainsi mettre en évidence l'existence en nombre significatif, quoique faible, de cellules co-exprimant l'antigène CD34 et l'antigène Troponine T cardiaque, spécifique de la cellule myocardique. L'analyse par RTQ-PCR des mêmes cellules a permis d'y mettre en évidence soit l'expression du gène NKx-2.5, caractérisant des progéniteurs myocardiques très immatures, ou du gène c-Troponine-T, caractéristique des progéniteurs cellulaires plus engagés dans la voie de différenciation myocardique. Enfin nous avons pu démontrer en culture *in vitro* sur le milieu spécifique MV06™ que nous avons développé, qu'une fraction des cellules CD34<sup>+</sup> immatures exprimait par RTQ-PCR au 7<sup>ème</sup> jour de culture, le gène c-Troponine-T par RTQ-PCR, et, au 14<sup>ème</sup> jour de culture, étaient marquée en immunofluorescence, par les anti-corps anti-c-Troponine-T et anti-actine- $\alpha$ -sarcomérique (marqueur du muscle strié).

En parallèle, nous avons pu aussi confirmer, en utilisant les mêmes méthodologies, l'existence dans les mêmes produits de cytophérèse évalués en CMF de précurseurs cellulaires endothéliaux CD34<sup>+</sup>133<sup>+</sup>VEGFR-2<sup>+</sup>, exprimant les gènes VEGFR-2 (progéniteurs endothéliaux immatures), eNOS (progéniteurs endothéliaux plus mature) en analyse RTQ-PCR après culture sur MV06™, et marqués par l'anticorps anti-von Willebrand en immunofluorescence.

Au total, l'expression de gènes myocardiques et endothéliaux tant au niveau ARN que protéique démontre donc la présence dans les produits sanguins obtenus après mobilisation par G-CSF de progéniteurs cellulaires myocardiques et endothéliaux à différents stades de maturation [23].

En parallèle avec cette étude biologique, nous avons, dès fin 2002, lancé un essai Phase I pour juger de l'effet thérapeutique de l'injection intra-cardiaque directe de cellules CD34<sup>+</sup> mobilisées par G-CSF, collectées par cytophérèse et purifiées *in vitro* chez des patients ayant fait un IDM sévère, au maximum 6 mois avant l'inclusion dans l'étude. Les critères d'inclusion étaient ; l'âge < 70ans ; une fraction d'éjection ventriculaire gauche < 35% ; une akinésie complète de la zone infarctée en échographie cardiaque tri-dimensionnelle, correspondant à une zone muette au TEPscan, tant après injection de glucose marqué (<sup>18</sup>Fi-FDG) que d'ammonium marqué (<sup>201</sup>Ti-Chloride) ; l'impossibilité de reperfuser la zone infarctée par pose de stent ou pontage coronaire mais indication de pontage coronaire de dérivation « compassionnel » ; et bien sûr, l'autorisation écrite du patient après information éclairée. Sur les 10 patients initialement inclus avec FEVG < 35%, 3 ont été secondairement écartés, le TEPscan initial montrant une fixation résiduelle du glucose marqué, signifiant un tissu myocardique capable d'auto-régénération au moins partielle. Chez les 7 autres, l'ensemble de la procédure a pu être réalisée. Il

est à signaler que trois de ces patients étaient prévus pour une transplantation cardiaque [23].

Outre la faisabilité de l'ensemble de la procédure, et l'absence de tout évènement indésirable secondaire à court ou moyen terme (en particulier, aucun trouble du rythme supra-ventriculaire n'a été observé), les résultats thérapeutiques sont apparus comme très significatifs. En effet, tous les patients – à l'exception du premier, qui avait fait son infarctus 8 ans avant la procédure de transplantation cellulaire – ont montré une amélioration progressive des paramètres de surveillance cardiaque à partir du 3<sup>ème</sup> mois, pour atteindre un plateau à 3 ans. (tableau I)

La FEVG à cette date montrait une amélioration moyenne de 65% (+20 points, extrêmes +2 - +35), par rapport aux données initiales, correspondant à une reprise de la contractilité de la zone infarctée. En outre, dès le 6<sup>ème</sup> mois, mais de façon encore plus probante à 1 an, le TEPScan montrait à nouveau, chez tous les malades (sauf le 1<sup>er</sup>), la fixation aussi bien du glucose que de l'ammonium marqué au niveau de la zone initialement muette, signant à la fois la régénération du muscle cardiaque lésé et sa revascularisation. Si le 1<sup>er</sup> malade est décédé à 4 ans et demi, les 6 autres sont vivants (y compris les 3 qui étaient justiciables d'une transplantation cardiaque), ont une qualité de vie sensiblement normale, avec un recul moyen de 66 mois. Ils ne prennent par ailleurs que très peu de médicaments à visée cardiaque.

Les résultats d'un essai phase I-IIa, randomisé portant sur 24 patients, réalisé aux USA, sponsorisé par Baxter Healthcare Corporation, et reproduisant à plus grande échelle notre essai Phase I, semblent pleinement confirmer nos propres résultats [24]. Un essai Phase II enrôlant 150 patients, mené par la même équipe selon le même protocole, est en cours d'évaluation. Les résultats préliminaires confortent les résultats de l'essai Phase I-IIa.

La réinjection intra-cardiaque directe de cellules CD34<sup>+</sup> sanguines autologues purifiées, sans reperfusion associée de la zone infarctée, chez des patients ayant présenté un IDM très sévère, pourrait donc représenter un véritable traitement « de rupture » permettant de prévenir la survenue d'une insuffisance cardiaque de mauvais pronostic à court terme.

## **II. Thérapie cellulaire de l'ischémie critique chronique (ICCM) des membres inférieurs.**

Les résultats de l'essai randomisé initial de Tateishi-Yuyama en 2002 [25] dans lequel des CMN de moelle osseuse autologues étaient directement réinjectées dans les muscles du mollet de patients atteints d'ICCM, ayant montré une diminution sensible des troubles trophiques et une amélioration, du périmètre de marche corrélés à une amélioration de la micro-circulation, ont entraîné la réalisation de nombreux autres essais randomisés dans cette indication.

Dans la plupart des cas, les cellules utilisées étaient des CMN, incluant des progéniteurs endothéliaux soit de moelle osseuse [26, 27], soit de sang périphérique après mobilisation par G-CSF [28-31]. Tous les résultats de ces essais vont dans le même sens d'une amélioration sensible des troubles trophiques, des douleurs, du périmètre de marche et de la micro-vascularisation. Toutefois, très peu d'essais à ce jour ont utilisés des cellules CD34<sup>+</sup> sanguines autologues purifiées. La conjonction des résultats des travaux de Pesce et al en 2003 [30] - démontrant que les cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon humain injectées dans les membres inférieurs de souris, après réalisation d'une ischémie expérimentale donnait naissance à de progéniteurs endothéliaux et à des cellules musculaires squelettiques responsables d'une néo-

vascularisation et une régénération de la masse musculaire squelettique – et de nos propres travaux [23], devraient, à notre sens, inciter à développer de nouveaux essais dans cette direction. Il est en effet plus facile et moins traumatisant de prélever des cellules dans le sang périphérique que dans la moelle osseuse, d'autant plus que de nouvelles procédures industrialisées d'expansion *in vitro* de cellules CD34<sup>+</sup> permettant une production standardisée de greffons de cellules CD34<sup>+</sup> autologues à partir d'une simple prise de sang sont en cours de développement.

## **Conclusions**

La thérapie cellulaire semble promise à un avenir radieux dans le domaine des pathologies ischémiques, en particulier l'IDM et l'ischémie chronique des MI. L'utilisation de cellules CD34<sup>+</sup> purifiées, prélevées dans le sang circulant, et éventuellement amplifiées « industriellement » par expansion cellulaire *in vitro*, devrait permettre une large diffusion de ces traitements de rupture dans les années à venir.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet*. 2001;357:279-280.
- [2] Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, Bel A, Sarateanu S, Scorsin M, Schwartz K, Bruneval P, Benbunan M, Marolleau JP, Duboc D. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:1078-1083.
- [3] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964-967.
- [4] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001;410:701-705.
- [5] Yeh ET, Zhang S, Wu HD, Korbling M, Willerson JT, Estrov Z. Transdifferentiation of human peripheral blood CD34+-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo. *Circulation*. 2003;108:2070-2073.
- [6] Patel AN, Geffner L, Vina RF, Saslavsky J, Urschel HC, Jr., Kormos R, Benetti F. Surgical treatment for congestive heart failure with autologous adult stem cell transplantation: a prospective randomized study. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005;130:1631-1638.
- [7] Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Silva GV, Mesquita CT, Belem L, Vaughn WK, Rangel FO, Assad JA, Carvalho AC, Branco RV, Rossi MI, Dohmann HJ, Willerson JT. Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. *Circulation*. 2004;110:II213-218.

- [8] Stamm C, Kleine HD, Choi YH, Dunkelmann S, Lauffs JA, Lorenzen B, David A, Liebold A, Nienaber C, Zurakowski D, Freund M, Steinhoff G. Intramyocardial delivery of CD133+ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: safety and efficacy studies. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007;133:717-725.
- [9] 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, Zeiher AM. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006;355:1222-1232.
- [10] Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, Endresen K, Ilebakk A, Mangschau A, Fjeld JG, Smith HJ, Taraldsrud E, Grogaard HK, Bjornerheim R, Brekke M, Muller C, Hopp E, Ragnarsson A, Brinchmann JE, Forfang K. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006;355:1199-1209.
- [11] 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, Zeiher AM. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006;355:1210-1221.
- [12] Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet.* 2004;364:141-148.
- [13] Goussetis E, Manginas A, Koutelou M, Peristeri I, Theodosaki M, Kollaros N, Leontiadis E, Theodorakos A, Paterakis G, Karatasakis G, Cokkinos DV, Graphakos S. Intracoronary infusion of CD133+ and CD133-CD34+ selected autologous bone marrow

progenitor cells in patients with chronic ischemic cardiomyopathy: cell isolation, adherence to the infarcted area, and body distribution. *Stem Cells*. 2006;24:2279-2283.

[14] Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, Kalantzi M, Herbots L, Sinnaeve P, Dens J, Maertens J, Rademakers F, Dymarkowski S, Gheysens O, Van Cleemput J, Bormans G, Nuyts J, Belmans A, Mortelmans L, Boogaerts M, Van de Werf F. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2006;367:113-121.

[15] Kuethe F, Richartz BM, Sayer HG, Kasper C, Werner GS, Hoffken K, Figulla HR. Lack of regeneration of myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans with large anterior myocardial infarctions. *Int J Cardiol*. 2004;97:123-127.

[16] Berry MF, Engler AJ, Woo YJ, Pirolli TJ, Bish LT, Jayasankar V, Morine KJ, Gardner TJ, Discher DE, Sweeney HL. Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290:H2196-2203.

[17] Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol*. 1984;133:157-165.

[18] Henon PR, Liang H, Beck-Wirth G, Eisenmann JC, Lepers M, Wunder E, Kandel G. Comparison of hematopoietic and immune recovery after autologous bone marrow or blood stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant*. 1992;9:285-291.

[19] Henon P, Sovalat H, Becker M, Arkam Y, Ojeda-Urbe M, Raidot JP, Hussein F, Wunder E, Bourderont D, Audhuy B. Primordial role of CD34<sup>+</sup> 38<sup>-</sup> cells in early and late trilineage haemopoietic engraftment after autologous blood cell transplantation. *Br J Haematol*. 1998;103:568-581.

- [20] Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000;95:952-958.
- [21] Badorff C, Brandes RP, Popp R, Rupp S, Urbich C, Aicher A, Fleming I, Busse R, Zeiher AM, Dimmeler S. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation*. 2003;107:1024-1032.
- [22] Henon P, Ojeda M, Arkam Y, Sovalat H, Bischoff N, Monassier J, Brink I. Intracardiac reinjection of purified autologous blood CD34+ cells mobilized by G-CSF can significantly improve myocardial function in cardiac patients. *Blood*. 2003;Suppl 1:335a (abstract).
- [23] Pasquet S, Sovalat H, Henon P, Bischoff N, Arkam Y, Ojeda-Urbe M, Bouar R, Rimelen V, Brink I, Dallemand R, Monassier JP. Long-term benefit of intracardiac delivery of autologous granulocyte-colony-stimulating factor-mobilized blood CD34+ cells containing cardiac progenitors on regional heart structure and function after myocardial infarct. *Cytotherapy*. 2009;11:1002-1015.
- [24] Losordo DW, Schatz RA, White CJ, Udelson JE, Veereshwarayya V, Durgin M, Poh KK, Weinstein R, Kearney M, Chaudhry M, Burg A, Eaton L, Heyd L, Thorne T, Shturman L, Hoffmeister P, Story K, Zak V, Dowling D, Traverse JH, Olson RE, Flanagan J, Sodano D, Murayama T, Kawamoto A, Kusano KF, Wollins J, Welt F, Shah P, Soukas P, Asahara T, Henry TD. Intramyocardial transplantation of autologous CD34+ stem cells for intractable angina: a phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial. *Circulation*. 2007;115:3165-3172.
- [25] Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T.

Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002;360:427-435.

[26] Huang P, Li S, Han M, Xiao Z, Yang R, Han ZC. Autologous transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells improves critical limb ischemia in diabetes. *Diabetes Care*. 2005;28:2155-2160.

[27] Saigawa T, Kato K, Ozawa T, Toba K, Makiyama Y, Minagawa S, Hashimoto S, Furukawa T, Nakamura Y, Hanawa H, Kodama M, Yoshimura N, Fujiwara H, Namura O, Sogawa M, Hayashi J, Aizawa Y. Clinical application of bone marrow implantation in patients with arteriosclerosis obliterans, and the association between efficacy and the number of implanted bone marrow cells. *Circ J*. 2004;68:1189-1193.

[28] Ishida A, Ohya Y, Sakuda H, Ohshiro K, Higashiuesato Y, Nakaema M, Matsubara S, Yakabi S, Kakihana A, Ueda M, Miyagi C, Yamane N, Koja K, Komori K, Takishita S. Autologous peripheral blood mononuclear cell implantation for patients with peripheral arterial disease improves limb ischemia. *Circ J*. 2005;69:1260-1265.

[29] Kawamura A, Horie T, Tsuda I, Ikeda A, Egawa H, Imamura E, Iida J, Sakata H, Tamaki T, Kukita K, Meguro J, Yonekawa M, Kasai M. Prevention of limb amputation in patients with limbs ulcers by autologous peripheral blood mononuclear cell implantation. *Ther Apher Dial*. 2005;9:59-63.

[30] Pesce M, Orlandi A, Iachininoto MG, Straino S, Torella AR, Rizzuti V, Pompilio G, Bonanno G, Scambia G, Capogrossi MC. Myoendothelial differentiation of human umbilical cord blood-derived stem cells in ischemic limb tissues. *Circ Res*. 2003;93:e51-62.

[31] Zafarghandi MR, Ravari H, Aghdami N, Namiri M, Moazzami K, Taghiabadi E, Fazel A, Pournasr B, Farrokhi A, Sharifian RA, Salimi J, Moini M, Baharvand H. Safety and efficacy of granulocyte-colony-stimulating factor administration following autologous

intramuscular implantation of bone marrow mononuclear cells: a randomized controlled trial in patients with advanced lower limb ischemia. *Cytotherapy*. 2010;12:783-791.

# Tableau 1

Patient	Age/ Sexe	Temps entre IM et injection	FE (%)					Régénération du myocarde	Amélioration FE		
			Pre- injection	12m	18m	24m	36m		48m	Points	%
1	39 M	8 y	34	38		35	36	36	NON	+ 2	6 % *
2	49 F †	6 w.	30	44		51	54	55	OUI	+ 25	83 % *
3	61 F	12 w.	33	61		63	64	76	OUI	+ 44	230% *
4	33 M †	6 w.	21	23	30	31	33	33	OUI	+ 12	57 % *
5	70 M †	24 w	27	32	35	39	42	42	OUI	+ 15	56 % *
6	63 M	12w	20	53	52	55	55	NA	OUI	+ 35	175 %**
7	57 M	8 w	30	42	43	45	45	NA	OUI	+15	50 %**

(\*) à 48 mois

(\*\*) à 36 mois

NA Non Atteint

† Ces patients étaient initialement programmés pour une transplantation cardiaque