

Université de Montréal

**Rôle des Cellules Endothéliales Progénitrices dans la Régulation
de la Fonction Plaquettaire**

Par

Haissam Abou-Saleh

Département des Sciences Biomédicales

Université de Montréal

Faculté de médecine

**Thèse présentée à la faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Biomédicales**

Décembre 2008

© Haissam Abou-Saleh

Université de Montréal

**Cette thèse intitulée :
Rôle des Cellules Endothéliales Progénitrices dans la Régulation
de la Fonction Plaquettaire**

**Présentée Par
Haissam Abou-Saleh**

a été évaluée par :

**Dre Céline Fiset.....Président rapporteur
Dr Yahye Merhi.....Directeur de recherche
Dr Guy Rousseau.....Membre du Jury
Dr Jacques Galipeau.....Examineur externe
Dre Lucie Parent.....Représentante du doyen**

Résumé

Les Cellules Endothéliales Progénitrices ("Endothelial Progenitor Cells", EPCs) sont des précurseurs endothéliaux qui jouent un rôle émergent en biologie vasculaire. Les EPCs ont été localisées dans le cordon ombilical, la moelle osseuse, le sang périphérique et dans certains tissus régénératoires. Les interactions des EPCs avec les cellules sanguines et vasculaires peuvent largement influencer leurs propriétés biologiques et dicter leur fonctionnement pendant la réparation endothéliale. Plus spécifiquement, les interactions des EPCs avec les plaquettes circulantes induisent leur migration, leur recrutement et leur différenciation en cellules endothéliales aux sites de lésions vasculaires. Cependant, l'impact d'une telle interaction sur la fonction plaquettaire n'a pas été recherché. Le but de mon projet était de : 1) générer des EPCs à partir des cellules mononucléaires du sang humain périphérique ("Peripheral Blood Mononuclear Cells", PBMCs); 2) étudier les interactions adhésives entre les EPCs et les plaquettes; 3) déterminer leur impact sur la fonction plaquettaire et la formation du thrombus et 4) décrire le mécanisme d'action des EPCs sur les plaquettes et le thrombus. Mises en culture sur une surface de fibronectine dans un milieu conditionné, les PBMCs fraîchement isolées possédaient une morphologie ronde et une petite taille. Après cinq jours, les PBMCs adhérentes donnaient naissance à des colonies, puis formaient une monocouche de cellules aplaties caractéristiques des EPCs après dix jours de culture. Les EPCs différenciées étaient positives pour l'Ulex-lectine et l'Acétyle des lipoprotéines de faible densité ("Acetylated Low Density Lipoprotein", Ac-LDL), exprimaient les marqueurs progéniteurs (CD34, P-sélectine, VEGFR2, vWF et VE-Cadhérine) tandis que les marqueurs leucocytaires (CD14, PSGL-1 et L-sélectine) étaient absents. Ces EPCs interagissaient avec les plaquettes activées par un mécanisme dépendant de la P-sélectine plaquettaire, inhibaient l'activation et l'agrégation plaquettaire et réduisaient significativement l'adhésion plaquettaire, principalement par l'action de prostacycline (PGI₂). En fait, ceci était associé avec une augmentation de l'expression de la cyclooxygénase-2 (COX-2) et du monoxyde d'azote (NO) synthétase inductible (iNOS). Toutefois, les effets inhibiteurs des EPCs sur la fonction plaquettaire ont été renversés par une inhibition de la COX et non pas du NO. Bien que les EPCs fussent en mesure de lier les plaquettes *via* la P-sélectine, leurs effets prédominants étaient médiés essentiellement par une sécrétion paracrine, impliquant la PGI₂. Néanmoins, un

rapprochement étroit ou un bref contact entre les EPCs et les plaquettes était requis pour que cette fonction soit complètement réalisée. D'ailleurs, cet aspect a été investigué chez des souris déficientes en P-sélectine (P-sel^{-/-}) et chez leurs congénères de phénotype sauvage (Wild Type, WT). Chez les souris WT, les EPCs inhibaient l'agrégation plaquettaire dans le sang complet de manière concentration-dépendante alors que dans les souris P-sel^{-/-}, l'action des EPCs n'avait pas d'effet significatif. De plus, en utilisant un modèle murin de thrombose artérielle, nous avons démontré que l'infusion systémique des EPCs altéraient la formation du thrombus et réduisaient significativement sa masse chez les souris WT, mais non pas chez les souris P-sel^{-/-}. En outre, le nombre des EPCs incorporées au niveau du thrombus et de la paroi vasculaire était visiblement réduit chez les P-sel^{-/-} par rapport aux souris WT.

Dans cette étude, nous sommes parvenus à différencier adéquatement des EPCs à partir des PBMCs, nous avons étudié les interactions adhésives entre les EPCs et les plaquettes, et nous avons décrit leur impact sur la fonction plaquettaire et la formation du thrombus. De plus, nous avons identifié la PGI₂ comme étant le principal facteur soluble sécrété par les EPCs en culture et responsable de leurs effets inhibiteurs sur l'activation, l'adhésion et l'agrégation plaquettaire *in vitro*. De surcroît, nous avons élucidé le mécanisme d'action des EPCs sur l'agrégation plaquettaire et la formation du thrombus, *in vivo*, et nous avons souligné le rôle de la P-sélectine plaquettaire dans ce processus. Ces résultats ajoutent de nouvelles connaissances sur la biologie des EPCs et définissent leur rôle potentiel dans la régulation de la fonction plaquettaire et la thrombogenèse.

Mots-clés: cellules endothéliales progénitrices ■ plaquettes ■ thrombose ■ prostacycline ■ P-sélectine.

Abstract

Endothelial Progenitor Cells (EPCs) are believed to contribute to vascular biology and endothelial repair. EPCs have been isolated from umbilical cord, bone marrow, peripheral blood and in some regenerative tissues. Interactions of EPCs with vascular and blood cells can largely influence their functional properties and predict their destiny in the target tissues. More specifically, interactions of EPCs with circulating platelets provide the critical signal to ensure their migration and homing at the sites of vascular injury and their differentiation into endothelial cells. However, the functional consequences of such interactions on platelets remain unknown. Accordingly, this project was designed to investigate the impact of EPCs on platelet function and the specific objectives of this study were to: 1) generate EPCs from human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs); 2) characterize the adhesive interactions between EPCs and platelets; 3) determine their impact on platelet function and thrombus formation and 4) elucidate the mechanistic action of EPCs on platelets and thrombus. Cultured on fibronectin in conditioned media, PBMCs differentiated, within ten days of culture, into EPCs, which were positive for Ulex-lectin and Ac-LDL (Acetylated Low Density Lipoprotein), and expressed progenitor markers (CD34, VEGFR2, vWF, and VE-Cadherin). These EPCs bind activated platelets through P-selectin-dependent mechanism, inhibited platelet activation, aggregation and adhesion, mainly via prostacyclin (PGI₂) secretion. Indeed, this was associated with up-regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide (NO) synthase (iNOS). However, the effects on platelets were reversed by COX, but not by NO inhibition. Although EPCs bound platelets via platelet P-selectin, their predominant effects occurred via a paracrine secretion, implying PGI₂. Nevertheless, a transitory link or brief contact between EPCs and platelets was required for this function to be fully realized. This was further depicted using a murine arterial thrombosis model in P-selectin deficient mice (P sel^{-/-}) and their wild-type counterparts (WT). EPCs significantly impaired, in a concentration dependent-manner, collagen-induced whole blood platelet aggregation in WT mice; whereas in P-sel^{-/-} mice, EPCs had no significant effect. Moreover, in murine model of arterial thrombosis, infusion of EPCs altered thrombus formation and significantly reduced the mass of thrombi generated in WT, but not in P-sel^{-/-} mice. Furthermore, the number of EPCs recruited within the thrombi and along the vascular wall was visually reduced in P-sel^{-/-} mice as compared to WT mice.

In this project, we succeeded in adequately differentiating EPCs from PBMCs, we characterized the adhesive interaction between EPCs and platelets, and we addressed the impact of EPCs on platelet function and thrombus formation. Moreover, we identified PGI₂ as the principal soluble factor secreted by cultured EPCs and responsible of their inhibitory effects on platelet function *in vitro*. In addition, using a murine model of arterial carotid injury in WT and P-sel^{-/-} mice, we elucidate the mechanistic action of EPCs on platelet aggregation and thrombus formation, *in vivo*, and we highlighted the role of platelet P-selectin in this process. These findings add new insights into the biology of EPCs and reveal a potential role for EPCs in regulating platelet function, which in turn may limit thrombogenesis and maintain hemostasis at the sites of vascular injury.

Key Words: endothelial progenitor cells ■ platelets ■ thrombosis ■ prostacyclin ■ P-selectin

Table des matières

Identification du Jury	i
Résumé	ii-iii
Abstract	iv-v
Table des matières	vi-viii
Liste des figures	ix-x
Liste des tableaux	xi
Liste des abréviations	xii-xiii
Remerciements	xiv
Chapitre 1 : Les Cellules Endothéliales Progénitrices	1-39
1.1 Généralités	2-3
1.2 La moelle osseuse et la théorie de l'hémangioblaste	3-6
1.3 Cellules souches et progénitrices : qu'est ce qui est quoi ?.....	6-7
1.4 L'histoire de la vasculogenèse adulte	7-9
1.5 Les EPCs : origine, lignage et différenciation	9-10
1.5.1 Les EPCs circulantes	11
1.5.2 Les EPCs dérivantes de la culture des cellules mononucléaires	12-13
1.6 Méthodes de culture des EPCs dérivées du sang périphérique	13-15
1.7 La biologie des EPCs	15-16
1.7.1 Mobilisation de la moelle osseuse	16-18
1.7.2 Adhésion et transmigration endothéliale	19-20
1.7.3 Chimiotactisme et invasion	20
1.7.4 Différenciation	20-21
1.8 Conditions et facteurs influençant l'activité des EPCs	21-25
1.9 Les EPCs et les facteurs de risque cardiovasculaire	25
1.9.1 L'hypertension	25
1.9.2 Le diabète	26-27
1.9.3 L'hyperlipidémie	27
1.9.4 Le tabagisme	27
1.9.5 La sédentarité	27
1.9.6 Le stress oxydatif	28
1.9.7 Le vieillissement	28-29
1.9.8 Autres facteurs de risque	29-30

1.10	Implication des EPCs dans l'homéostasie vasculaire	30-32
1.10.1	Les EPCs dans la réparation endothéliale	32-33
1.10.2	Les EPCs dans la néovascularisation	34-35
1.10.3	Les EPCs dans l'athérosclérose	35-36
1.10.4	Les EPCs dans la resténose	36-38
1.10.5	Les EPCs dans la thrombose	38-39
1.11	Limites et perspectives	39
Chapitre 2 : Les plaquettes		40-62
2.1	Origine et structure des plaquettes	41-42
2.2	Molécules d'adhésion plaquettaire	43-49
2.3	Rôle physiopathologique des plaquettes	49-50
2.3.1	Adhésion des plaquettes à l'endothélium	50
2.3.2	Adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliale	50-51
2.3.3	Activation plaquettaire	52-54
2.3.4	Sécrétion plaquettaire	55-56
2.4	Agrégation plaquettaire, thrombose et coagulation	56-57
2.4.1	Mécanismes moléculaires de l'agrégation plaquettaire	57-58
2.4.2	Interaction plaquette-leucocyte.....	58-59
2.4.3	La cascade de coagulation	59-61
2.4.4	Propagation de la réaction thrombotique	61
2.4.5	La fin de la formation du thrombus	61-62
Chapitre 3 : Interaction EPC – Plaquette		63-72
3.1	Implication des plaquettes dans la biologie des EPCs	64-65
3.2	Rôle de l'interaction EPC - plaquette dans la réparation vasculaire	65-67
3.3	Mécanismes de recrutement des EPCs dans la paroi vasculaire	67-70
3.4	Mise en perspective	70
3.5	Hypothèse et objectifs	71
Chapitre 4 : Contribution scientifique		72-130
4.1	Premier article: Endothelial Progenitor Cells Bind and Inhibit Platelet Function and Thrombus Formation	75-104
4.2	Deuxième article: Essential role of P-selectin in Endothelial Progenitor Cells Cells-Induced Inhibition of Platelet Aggregation and Thrombus Formation	107-130

Discussion	131-143
Conclusions et directions futures	144-146
Bibliographie	147-171
Liste des publications	172-173

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1.1 :	L'angiogenèse et la vasculogenèse dans la néovascularisation post-natale	3
Figure 1.2 :	L'hémangioblaste, précurseur commun des cellules souches vasculaires et hémato-poïétiques	5
Figure 1.3 :	Caractérisation phénotypique des EPCs en culture	13
Figure 1.4 :	Méthodes de culture des EPCs dérivées des cellules mononucléaires de sang humain périphérique	14
Figure 1.5 :	Mécanismes de recrutement des EPCs	16
Figure 1.6 :	Mobilisation, migration et différenciation des EPCs	18
Figure 1.7 :	Implication des EPCs dans les maladies cardiovasculaires	26
Figure 1.8 :	L'apoptose et la régénération de l'endothélium	31

Chapitre 2

Figure 2.1 :	Représentation schématique de la structure de la GPIIb/IIIa	47
Figure 2.2 :	Représentation schématique de la structure des sélectines	48
Figure 2.3 :	Représentation schématique de l'adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliale	52
Figure 2.4 :	Images par microscopie électronique à balayage d'une plaquette au repos et activée	53
Figure 2.5 :	Les voies de signalisation activées par la phospholipase C	54
Figure 2.6 :	Représentation schématique de l'interaction des leucocytes avec les plaquettes activées au site de la lésion vasculaire	59

Chapitre 3

Figure 3.1 :	Rôle des plaquettes dans le recrutement des EPCs au site de la lésion vasculaire	67
Figure 3.2 :	Mécanismes d'interaction des EPCs avec les plaquettes au site de la lésion vasculaire	69

<u>Article # 1</u>	Endothelial Progenitor Cells Bind and Inhibit Platelet Function and Thrombus Formation.	
Figure 1:	Caractérisation des cellules en culture	98
Figure 2:	Les EPCs interagissent avec les plaquettes et inhibent leur activation	99
Figure 3:	Effet des EPCs sur l'agrégation plaquettaire	100
Figure 4:	Les EPCs sécrètent la PGI ₂ et le NO et surexpriment COX-2 et iNOS	101
Figure 5:	Les EPCs réduisent l'adhésion plaquettaire au collagène	102
Figure 6:	Les EPCs réduisent la formation du thrombus in vivo	103
Figure 7:	Les EPCs sont recrutées dans le thrombus artériel in vivo et réduisent la formation du thrombus	104
<u>Article # 2:</u>	Essential Role of P-Selectin in Endothelial Progenitor Cells-induced Inhibition of Platelet Aggregation and Thrombus Formation.	
Figure 1:	Adhésion, changements séquentiels et développement des EPCs	125
Figure 2:	Expression des marqueurs de surface	126
Figure 3:	Effet des EPCs sur l'agrégation plaquettaire stimulée par le collagène	127
Figure 4:	Effet inhibiteur des EPCs sur la formation du thrombus	128
Figure 5:	Analyses histologiques et morphométriques du thrombus	129
Figure 6:	Recrutement des EPCs dans le thrombus et la paroi vasculaire	130

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1.1: Principaux marqueurs de surface cellulaire pour la
caractérisation des EPCs11

Tableau 1.2 : Conditions et facteurs influençant la physiologie des EPCs24-25

Chapitre 2

Tableau 2.1 : Constituants essentiels des granules plaquettaires43

Abréviations

Ac-LDL :	Lipoprotéines de faible densité Acétylées ("Acetylated Low Density Lipoprotein")
AMPc :	Adénosine MonoPhosphate cyclique
Ang-1 :	Angiopoïétine-1
ApoE	Apolipoprotéine E
CEC :	Cellules Endothéliales Circulantes
CFU :	Unité de Formation de Colonies ("Colony Forming Unit")
CRP :	Protéine Réactive C ("C Reactive Protein")
DAG :	DiAcylGlycérol
eNOS :	Oxyde Nitrique Synthétase endothéliale ("endothelial Nitric Oxide Synthase")
EPC :	Cellule Endothéliale Progénitrice ("Endothelial Progenitor Cell")
G-CSF :	Facteur de Stimulation de Colonie de Granulocytes ("Granulocyte-Colony Stimulating Factor")
GM-CSF :	Facteur de Stimulation de Colonie de Granulocytes-Monocytes ("Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor")
GMPc :	Guanosine MonoPhosphate cyclique
HSC :	Cellule Souche Hématopoïétique ("Hematopoeitic Stem Cells")
iNOS :	Oxyde Nitrique Synthétase inductible ("inducible Nitric Oxide Synthase")
IP ₃ :	Inositol triPhosphate 3
MMPs :	Métalloprotéinases de la Matrice ("Matrix Metalloproteinases")
PBMCs :	Cellules Mononucléaires du Sang Périphérique ("Peripheral Blood Mononuclear Cells")

PECAM-1 :	Molécule -1 d'Adhésion Cellulaire des Plaquettes et l'Endothélium "Platelet Endothelial Cellular Adhesion Molecule-1"
PGD ₂ :	Prostaglandine D ₂
PGE ₂ :	Prostaglandine E ₂
PGI ₂ :	Prostacycline
PIGF :	Facteur de Croissance Placentaire ("Placental Growth Factor")
PKC :	Protéine Kinase C
PPAR γ :	Récepteur γ au Facteur Activé de Prolifération des Peroxysomes ("Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ ")
P-sel ^{-/-} :	Déficientes en P-sélectine
PSGL-1 :	Ligand-1 Glycoprotéique de la P-sélectine ("P-Selectin Glycoprotein Ligand-1")
SDF-1 α :	Facteur-1 α Dérivé des Cellules Stromales ("Stromal Cell-Derived Factor-1 α ")
TF :	Facteur Tissulaire ("Tissue Factor")
Tie-2 :	Tyrosine kinases-2 qui contient les domaines des Immunoglobulines et de facteur de croissance épidermique ("Tyrosine Kinases that contain Ig and EGF domains-2")
TNF:	Facteur de Nécrose Tumorale ("Tumor Necrosis Factor")
TXA ₂ :	Thromboxane A ₂
VE-Cad :	Cadhérine de l'Endothélium Vasculaire ("Vascular Endothelial-Cadherin")
VEGF :	Facteur de Croissance Vasculaire Endothélial ("Vascular Endothelial Growth Factor")
VEGFR2 :	Récepteur 2 du Facteur de Croissance Vasculaire Endothélial ("Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2")
vWF :	Facteur von Willebrand ("vonWillebrand Factor")
WT :	Type Sauvage ("Wild Type")

Remerciements

Je voudrais saluer particulièrement Dr Yahye Merhi, mon directeur de recherche, qui m'a accompagné durant toutes ces années en m'encourageant à persévérer sans relâche. Je me permets de dire combien j'ai apprécié sa passion pour la recherche et son encadrement efficace, mais aussi sa grande culture, sa rigueur scientifique, ses remarques pertinentes et critiques et surtout, ses vifs conseils qui m'ont été d'un très grand secours pour l'achèvement de cette thèse et pour la suite de ma carrière. Merci Yahye, j'ai appris beaucoup auprès de toi.

Mes remerciements vont aussi à mes collègues de travail Dr Jean-François Théorêt et M. Daniel Yacoub avec qui je travaille depuis près de six ans. Leurs assistances et leurs participations à plusieurs reprises m'avaient permis de mener à bout cette étude. Merci les amis, d'avoir eu la chance d'œuvrer avec vous.

Je ne peux oublier cependant mes autres collègues, je cite M. Ahmed Hachem qui a toujours été ma ressource en informatique ainsi que M. Firass Dandashli pour son grand sens de l'humour et M^{lle} Lara Bou Khzam pour son aimable caractère.

Enfin, je remercie vivement le personnel de recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal : chercheurs et chercheuses, associé(e)s, assistant(e)s, infirmier(e)s, et technicien(ne)s de recherche et mes camarades étudiant(e)s, pour toute l'aide qu'il (elle)s m'ont apportée dans la réalisation de mon projet.

À vous tous et toutes, un grand Merci!

Chapitre 1

Les Cellules Endothéliales Progénitrices

1.1 Généralités

Les cellules de l'organisme requièrent de l'oxygène et des nutriments pour leur croissance et dépendent de la proximité d'un système vasculaire intact pour délivrer ces éléments essentiels. À mesure que les cellules se divisent et les organes se développent, le réseau vasculaire dont ils dépendent devra aussi s'étendre afin de soutenir la survie de l'organisme.

Chez l'embryon en développement, les vaisseaux sanguins sont initialement assemblés par un processus appelé vasculogénèse^{1,2}, la différenciation "*in situ*" des cellules souches primitives, les angioblastes, en cellules endothéliales. La vasculogénèse débute par la formation d'un amas de cellules ou îlots sanguins, constitué par un noyau de cellules souches hématopoïétiques au centre, entouré par une couronne de cellules angioblastiques à la périphérie. Ces îlots sanguins se connectent pour former les premiers vaisseaux qui communiquent avec le cœur tubulaire.^{2,3} Une fois qu'un réseau vasculaire primitif est mis en place, l'expansion du système vasculaire dépend de l'angiogénèse, un mécanisme de croissance vasculaire distinct au cours duquel un réseau de vaisseaux sanguins prolifère par division de cellules pré-existantes à l'intérieur du réseau vasculaire.

Dans la vie adulte, la revascularisation est essentielle pour la croissance de l'organisme et la survie des tissus ischémiques et lésés. Pour de nombreuses années, il a été admis que le développement de nouveaux réseaux vasculaires se produit par une division de cellules endothéliales des veinules post-capillaires ou par une maturation et une croissance "de novo" de conduits collatéraux des artères de gros diamètre suivis par la myogénèse vasculaire. Ces deux mécanismes de formation de nouveaux vaisseaux sanguins sont appelés l'angiogénèse et l'artériogénèse, respectivement.^{4,5}

Plusieurs évidences ont évoqué que la moelle osseuse adulte est une source de cellules qui peuvent participer dans la vasculogénèse postnatale. Ceci est un véritable paradigme qui s'éloignait de la pensée originale qui limitait le processus de néovascularisation adulte à l'angiogénèse. Les cellules vedettes de ce processus, les EPCs, peuvent être assimilées aux angioblastes embryonnaires dans le sens où elles peuvent circuler, proliférer et participer dans le développement de réseaux vasculaires en se différenciant en cellules endothéliales (figure 1.1).⁶

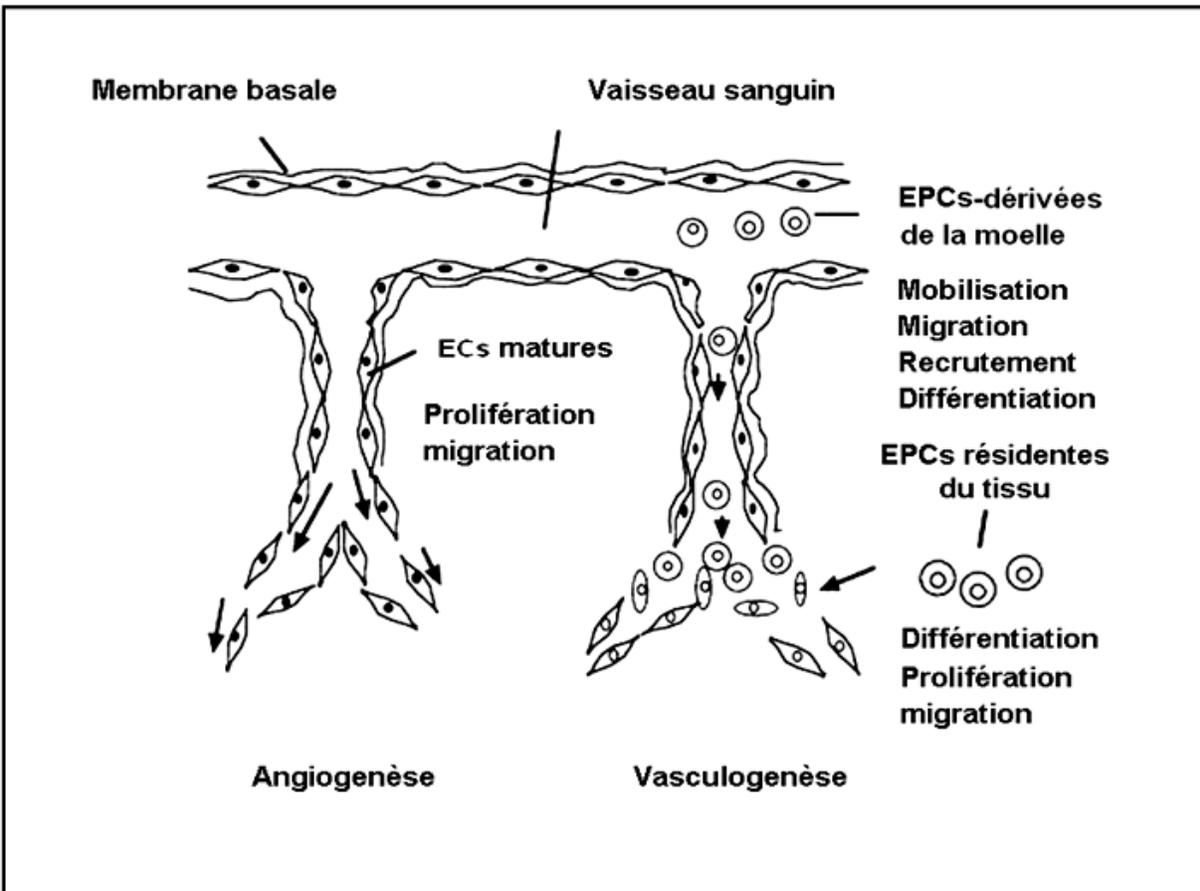


Figure 1.1 : L'angiogenèse et la vasculogenèse dans la néovascularisation post-natale. L'angiogenèse et la vasculogenèse sont initiées par l'activation des cellules endothéliales matures (ECs) *in situ* et les différentes populations de cellules endothéliales progénitrices (EPCs), respectivement. Adapté de Masuda et al. Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularisation in tissue regeneration. Cardiovascular Research. 2003 ; 58(2) : 391.

1.2 La moelle osseuse et la théorie de l'hémangioblaste

Très anciennement en 1871, Cohnheim a noté que "toutes les cellules dérivent du sang et par conséquent, au travers des observations subséquentes, de la "moelle osseuse".⁷ À ses yeux, le sang était le principe vital et l'élixir de vie.

De point de vue histologique, la moelle osseuse est constituée de deux sortes de tissus : la moelle jaune et la moelle rouge. La moelle jaune, riche en graisses, occupe le canal axial des os longs. Elle participe activement à la croissance et au renouvellement de l'os, car elle contient des cellules spécialisées dans la destruction de la substance osseuse. La moelle rouge, logée dans le tissu spongieux des os courts et des extrémités des os longs, est le site de l'hématopoïèse : fabrication des cellules sanguines adultes à partir des cellules souches. La moelle osseuse rouge

contient deux types de cellules spécifiques : les cellules souches hématopoïétiques ("Hematopoietic Stem Cells", HSCs) et les cellules du stroma médullaire. Les HSCs sont dites totipotentes : elles sont capables de se différencier en chacun des types de cellules sanguines; chaque fois qu'une HSC se divise en deux, une cellule va permettre le maintien du stock des HSCs et l'autre va s'engager dans l'un des quatre lignages hématopoïétiques : la lymphopoïèse, la granulopoïèse, l'érythropoïèse et la thrombopoïèse. Les cellules stromales constituent un tissu de soutien qui permet la multiplication des HSCs et leur différenciation. Elles sont elles aussi capables de se différencier en de nombreux types cellulaires.

Avant la naissance, l'hématopoïèse peut s'effectuer dans plusieurs endroits. Chez le jeune embryon, les cellules souches du sang apparaissent dans le sac vitellin. Plus tard, le foie commence à fonctionner comme organe hématopoïétique puis l'hématopoïèse se fait dans la rate et les nodules lymphatiques. Les os se développant entre le quatrième et le cinquième mois de la vie intra-utérine, l'hématopoïèse commence dans les cavités médullaires et à la naissance se poursuit exclusivement au niveau de la moelle osseuse. De la naissance à l'âge adulte, le nombre des sites hématopoïétiques diminue, bien que la moelle osseuse reste le siège de l'hématopoïèse.

Les lignages des cellules hématopoïétiques et des cellules endothéliales sont les premiers à se différencier à partir du mésoderme de l'embryon en développement. La première étape du développement vasculaire débute par la différenciation d'un précurseur mésodermique en hémangioblaste. L'hémangioblaste a une polarité double, celle de donner naissance à des HSCs et à l'angioblaste, précurseur des cellules endothéliales impliquées dans la formation du plexus capillaire primitif (figure 1.2). La réalité de l'hémangioblaste a été longtemps débattue, mais semble bien établie actuellement du fait de l'existence de plusieurs types de relations entre l'angiogenèse et l'hématopoïèse au cours de l'embryogenèse :

- relation spatiale : présence de cellules souches hématopoïétiques dans la région ventrale de l'aorte dorsale et intégration de ces cellules dans la paroi vasculaire
- relation temporelle : coïncidence du développement des amas cellulaires para-aortiques et de la colonisation des organes hématopoïétiques
- relation génétique : présence d'un précurseur commun hémangioblastique dans les corps embryonnaires et expression spécifique de gènes à la fois dans les cellules endothéliales et les HSCs.

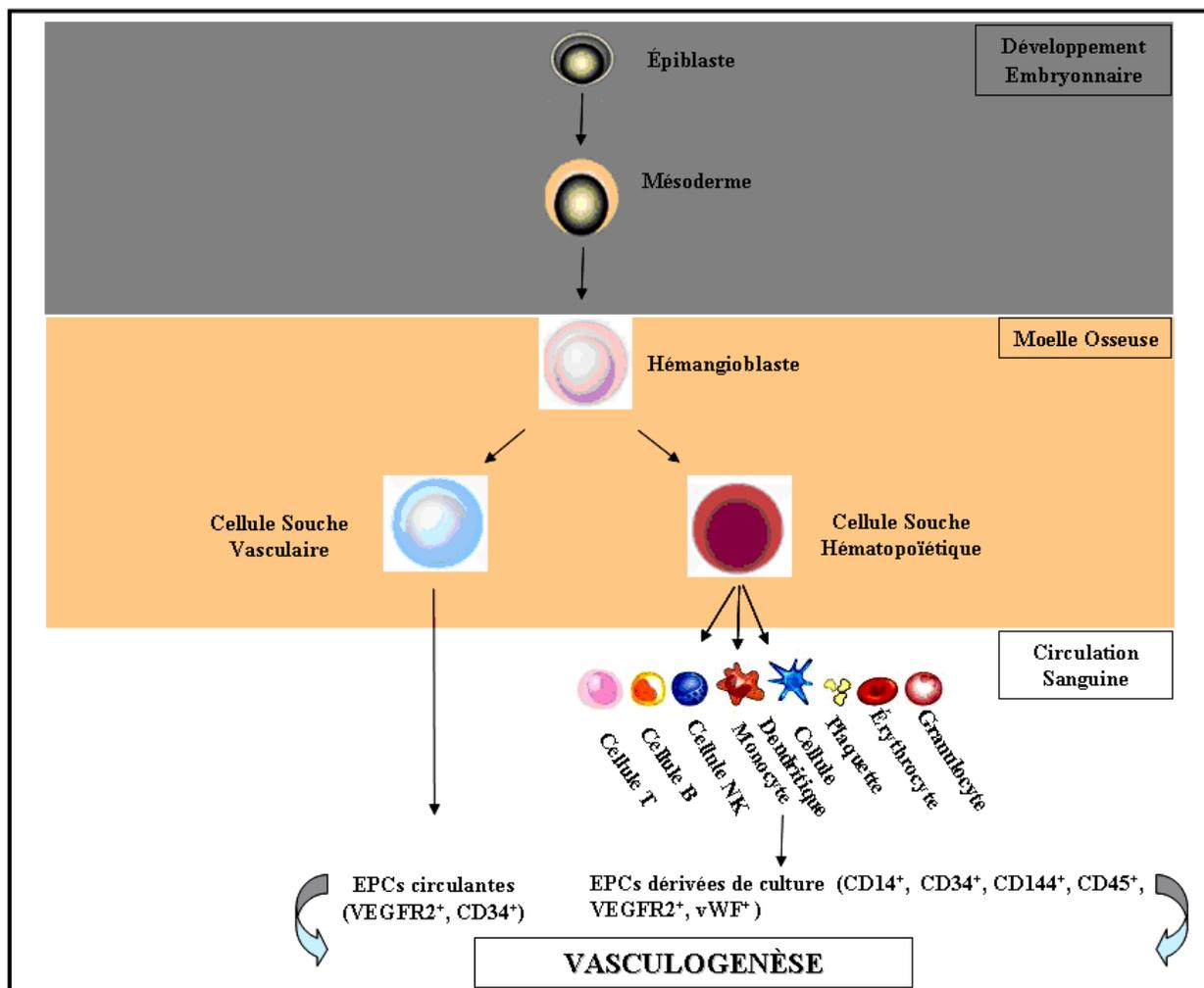


Figure 1.2 : L'hémangioblaste, précurseur commun des cellules souches vasculaires et hématopoïétiques. Sous l'action de signaux spécifiques, l'hémangioblaste peut se différencier vers l'une ou l'autre lignée souche : la lignée vasculaire ou hématopoïétique. Les EPCs circulantes sont issues des cellules souches vasculaires et expriment certains marqueurs hématopoïétiques, tandis que les EPCs dérivées de culture des mononucléaires expriment des marqueurs monocytiques et hématopoïétiques. Légende : EPCs (Cellules Endothéliales Progénitrices), VEGFR2 (Récepteur 2 du Facteur de Croissance Vasculaire Endothélial), vWF (Facteur von Willebrand). Inspiré de Marsboom et al. Endothelial progenitor cell: new perspectives and applications in cardiovascular therapies. Expert.Rev.Cardiovasc. Ther.6(5): 689; © Future Science Group Ltd (2008).

Par ailleurs, l'hypothèse de «l'endothélium homogénique» émise par Jordan en 1916 a été démontrée par des études *in vitro*, et *in vivo*.^{2, 8-12} En particulier, il a été démontré que le récepteur 2 du facteur de croissance vasculaire endothélial ("Vascular Endothelial Growth Factor-2", VEGFR2) membranaire joue un rôle capital dans la différenciation de l'hémangioblaste vers l'une ou l'autre lignée souche à savoir les angioblastes ou les précurseurs hématopoïétiques.^{8, 13-21} Dans cette optique, il a été suggéré que la liaison du VEGFR2 à son ligand le facteur de croissance vasculaire

endothélial ("Vascular Endothelial Growth Factor", VEGFR) est requise pour la différenciation endothéliale, tandis qu'un autre ligand du VEGFR2 est important pour le développement des cellules hématopoïétiques.¹⁷ Ainsi, la théorie de l'hémangioblaste, un précurseur commun des cellules hématopoïétiques et endothéliales, longtemps recherché, se trouve donc formellement confirmée.

1.3 Cellules souches et progénitrices : qu'est ce qui est quoi ?

Il ne fait nul doute que les cellules souches sont la panacée du demain. D'ailleurs, tant la communauté scientifique que la société s'y intéressent et diffusent chacune des avancées de la recherche. Cependant, malgré l'engouement autour des cellules souches et des espoirs qu'elles suscitent, plusieurs controverses entourent leur identification, leur utilisation et leur potentiel thérapeutique. Avant de se lancer dans le vif du sujet, entendons-nous d'abord sur quelques définitions.

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées d'un organe ou d'un tissu et qui possède trois caractéristiques principales : 1) l'auto-renouvellement, 2) la capacité de différenciation dans certaines conditions en différents types de cellules fonctionnelles, 3) le pouvoir de reconstitution, *in vivo*, d'un tissu donné. Ces cellules, n'ayant pas encore fait leur choix de fonction, apparaissent très tôt au cours du développement. Selon leur stade de différenciation, on distingue quatre types de cellules souches :

- **Les cellules souches totipotentes** : se trouvent au sommet dans l'hierarchie des cellules souches. Elles peuvent produire tous les tissus et tous les organes du corps donc elles peuvent engendrer un être humain dans sa totalité : ovule fécondé ou cellules issues des premières divisions de cet œuf jusqu'au quatrième jour.
- **Les cellules souches pluripotentes** : elles peuvent donner toutes les lignées cellulaires du corps adulte à l'exception des cellules placentaires ou du tissu de soutien nécessaire au développement du fœtus dans l'utérus humain : cellules souches embryonnaires.
- **Les cellules souches multipotentes** : engagées dans un programme tissulaire spécifique, elles peuvent générer plusieurs types de cellules spécialisées d'un lignage cellulaire donné : HSCs de la moelle osseuse qui sont à l'origine de toutes les cellules du sang ou les cellules mésenchymales qui peuvent se différencier en divers types de cellules.

➤ **Les cellules souches unipotentes ou progénitrices** : engagées dans un lignage défini, elles sont capables de générer un seul type de cellule différenciée. Elles possèdent un potentiel de régénération similaire aux autres cellules souches mais leurs fonctions futures sont déjà bien déterminées. Toutefois, de par leurs critères de cellules souches, cette détermination reste toujours réversible et des cellules progénitrices non-endothéliales ont démontré la capacité de se différencier en EPCs. Par exemple, des EPCs fonctionnelles ont été obtenues à partir des cellules souches adipeuses,^{22, 23} cardiaques²⁴ et neurales.^{25, 26} Cependant, et contrairement aux autres cellules souches, les cellules progénitrices ne possèdent pas la capacité de s'auto-renouveler. Les cellules progénitrices ont été localisées dans de nombreux tissus, incluant le sang, le cœur, le muscle, le cerveau, le tissu adipeux et la peau. Le rôle primordial d'une cellule souche progénitrice dans un organisme vivant est de maintenir et de réparer le tissu dans lequel elle se trouve : cellules souches endothéliales, cellules souches neurales, cellules souches hépatocytaires, cellules souches pancréatiques. Il n'est pas encore bien connu si les organes auto-régénérateurs possèdent une réserve déterminée de cellules souches (appelées les cellules souches spécifiques du tissu) ou bien si un approvisionnement continu par une source de cellules souches (e.g moelle osseuse) prendra place.^{27, 28} Il est possible que chaque organe auto-régénérateur contienne une petite réserve de cellules souches spécifiques du tissu qui répond au turn-over cellulaire. Toutefois, si une lésion se produit, cette réserve n'est plus en mesure de produire des quantités suffisantes de cellules spécifiques du tissu. Dans cette situation, les cellules souches/progénitrices peuvent être mobilisées de la moelle osseuse (réserve centrale) et dirigées vers les tissus ou les organes lésés.

1.4 L'histoire de la vasculogénèse adulte

Pour longtemps et jusqu'à la fin de l'année 1997, l'idée de l'existence des hémangioblastes embryonnaires chez l'adulte était évasive et l'angiogénèse fut considérée comme étant l'unique et le seul moyen de néovascularisation adulte. Toutefois, au début des années 1930, une étude décrivant la formation de vaisseaux dans des cultures de cellules sanguines a été publiée.²⁹ Plus tard en 1950, une autre étude a décrit la formation de vaisseaux sanguins dans une culture de la moelle osseuse.³⁰ Ensuite, les recherches sur la néovascularisation adulte se sont intensifiées, et des études initiales ont décrit le phénomène d'endothélialisation des prothèses artérielles par des cellules dérivant du sang.^{31, 32} Vers les années 1990, l'apparition de nouvelles études ont remis ces études initiales en relief et ont relancé le débat sur la néovascularisation adulte.³³⁻³⁶ En particulier, une élégante étude

s'est penchée sur l'effet de la livraison "*in situ*" de VEGF sur l'endothélialisation des carotides dénudées dans un modèle de lésion carotidienne bilatérale.³⁷ L'utilisation de VEGF a montré une augmentation considérable de l'endothélialisation de l'artère traitée de même que de l'artère non-traitée. Ceci a suggéré que les cellules sanguines répondaient à une stimulation par le VEGF présent dans le microenvironnement de la lésion et que cette stimulation induisait l'endothélialisation de l'artère non-traitée. Ces études ont pointé vers la présence des hémangioblastes, des cellules endothéliales circulantes ou de leurs précurseurs dans le sang et/ou la moelle osseuse et ont été en faveur de l'existence de la vasculogenèse chez l'adulte. Cependant, d'autres études sont venues contredire la possibilité que des cellules endothéliales circulantes ou des angioblastes adultes puissent être à l'origine de la ré-endothélialisation puisque ces dernières sont rares dans le sang et non-fonctionnelles.³⁸⁻⁴⁰ Étant donné que les hémangioblastes n'ont pas été encore bien caractérisés à cette époque, il apparaissait que les angioblastes adultes partageaient plusieurs déterminants antigéniques avec les HSCs adultes. Parmi ceux-ci, l'antigène CD34 était souvent considéré comme le marqueur primaire des HSCs, des cellules endothéliales embryonnaires et des cellules endothéliales adultes activées.⁴¹⁻⁴⁴ En se basant sur ce fait, une étude originale menée par Asahara et al. en 1997 a montré que le sang humain périphérique contenait des EPCs qui adhéraient sur une matrice de fibronectine, formaient une monocouche de cellules fusiformes et des structures ressemblant aux tubes ("tube-like structures") et se différenciaient *in vitro* en cellules endothéliales.³ Ces cellules différenciées exprimaient l'acide ribonucléique messager (ARNm) de l'oxyde nitrique synthétase endothéliale ("endothelial Nitric Oxide Synthase", eNOS), les récepteurs des antigènes de CD34, VEGFR2, CD31 et des Tyrosine kinases-2 qui contiennent les domaines des Immunoglobulines et de facteur de croissance épidermique "Tyrosine Kinases that contain Ig and EGF domains-2", Tie-2); liaient l'Ulex-lectine; assimilaient l' Acétyle des Lipoprotéines de faible densité ("Acetyl-Low Density Lipoprotein", Ac-LDL) et produisaient du NO en réponse à l'acétylcholine et au VEGF de manière dose-dépendante. Afin de savoir si ces cellules progénitrices pouvaient contribuer à l'angiogenèse *in vivo*, elles ont été isolées, marquées et injectées systémiquement chez des lapins et des souris irradiés dans des modèles d'ischémie de membres inférieurs. Tel que prévu, ces cellules s'intégraient au niveau de l'endothélium néoformé dans le territoire ischémique. D'autre part, ces cellules étaient positives pour le CD34⁺, le VEGFR2⁺, le CD31 et le Tie-2.³ Une année plus tard, Shi et coll. ont apporté une autre évidence que des cellules souches issues de la moelle osseuse pouvaient se différencier, *in*

vitro, en cellules endothéliales et contribuaient à la néovascularisation active dans les tissus ischémiques.⁴⁵ Ces deux études ont remis la théorie de l'existence d'EPCs circulantes dans le sang en relief et ont apporté une preuve définitive que l'angiogenèse et la vasculogenèse pouvaient avoir lieu simultanément chez l'adulte. Dès lors, la recherche sur la vasculogenèse chez l'adulte a connu un essor fulgurant si bien qu'aujourd'hui elle fasse couler beaucoup d'encre dans maintes sphères de la recherche : cardiologie, neurologie, thérapie cellulaire, ingénierie tissulaire, la recherche en biomatériaux et la nanotechnologie.

En conclusion, il existe très vraisemblablement des précurseurs endothéliaux circulants chez l'adulte, originaires de la moelle osseuse. Il est possible de pratiquer une expansion *ex-vivo* de ces progéniteurs en culture et d'obtenir des cellules possédant le phénotype complet de cellules endothéliales. Les progéniteurs de cellules endothéliales peuvent s'intégrer dans l'endothélium vasculaire aux sites de néoangiogenèse notamment en cas d'ischémie et participer ainsi au renouvellement de l'endothélium. Une vasculogenèse serait donc présente chez l'adulte, ce qui ouvre des possibilités thérapeutiques potentielles de transplantation de cellules endothéliales.

1.5 Les EPCs : Origine, lignage et différenciation

Depuis l'étude d'Asahara vers la fin des années 90, un nombre impressionnant de travaux s'est consacré à la caractérisation des EPCs et pourtant, aucun consensus n'a été atteint pour une définition uniforme des EPCs. Une controverse concernant leur origine, leur isolation et leur fonctionnement règne toujours. Aujourd'hui, le terme EPCs est amplement utilisé en littérature pour décrire différentes populations d'EPCs dépendamment de leur tissu d'origine, de leur phénotype et leur degré de différenciation : cellules précurseurs de cellules endothéliales ("endothelial precursor cells"),⁴⁶ cellules endothéliales circulantes ("circulating endothelial cells"),⁴⁷ cellules ressemblant aux cellules endothéliales ("endothelial-like cells"),⁴⁸ angioblastes circulantes ("circulating angioblasts"),⁴⁹ unités de formation de cellules endothéliales ("endothelial cells colony-forming units"),^{50, 51} cellules de formation de colonies endothéliales ("endothelial colony-forming cells")^{50, 51} et cellules angiogéniques circulantes ("circulating angiogenic cells").^{51, 52} Cette liste n'est pas exhaustive et des EPCs fonctionnelles ont été obtenues à partir d'autres lignées cellulaires et ont démontré une application thérapeutique en néovascularisation : les cellules souches adipeuses,^{22, 23} les cellules souches mésenchymales,⁵³ cardiaques²⁴ et neurales.^{25, 26} En effet, quelque soit l'origine potentiel des EPCs et sous des conditions favorisant la différenciation

endothéliale, ces cellules subissent des transformations morphologiques et phénotypiques, expriment certaines caractéristiques endothéliales et se différencient en cellules matures vasculaires. Les EPCs ont été initialement localisées dans trois tissus principaux : le sang de cordon ombilical, la moelle osseuse et le sang périphérique.

Le sang de cordon ombilical est une source très riche en EPCs et contient un nombre plus élevé en cellules CD34⁺ et CD133⁺ que le sang périphérique adulte.⁵⁴ De plus, les EPCs différenciées *in vitro* à partir de culture du sang de cordon présentent un taux de prolifération élevé et expriment la télomérase, une caractéristique fonctionnelle de cellules souches qui est plus faible ou absente dans les autres populations d'EPCs.⁵⁴ Toutefois, le potentiel thérapeutique des EPCs du cordon ombilical reste relativement inexploité à ce jour, et de nombreux enjeux éthiques et scientifiques doivent être considérés avant que ces cellules puissent être utilisées adéquatement.

La moelle osseuse est la source d'EPCs la mieux caractérisée. Dans la moelle, les EPCs se trouvent ancrées parmi d'autres cellules souches dans la niche stromale où elles existent sous un état quiescent et sont engagées à se différencier et à se mobiliser dans la circulation en réponse à des signaux spécifiques mettant en jeu une variété de protéinases, de cytokines, de facteurs de croissance et des récepteurs membranaires.⁵⁵⁻⁵⁷

Le sang périphérique adulte reste cependant, le tissu le plus sollicité pour l'isolation des EPCs. Dans le sang, les EPCs peuvent se répartir en deux catégories. La première catégorie se réfère aux cellules circulantes originaires de la moelle osseuse et se caractérisent par l'expression de certains marqueurs de surfaces (CD34, VEGFR2, CD133) en commun avec les HSCs,^{46, 58} tandis que la deuxième catégorie se réfère aux cellules mononucléaires de la lignée myéloïde qui, mises en culture en présence de facteurs de croissance angiogéniques, subissent des changements morphologiques, expriment des marqueurs progéniteurs/endothéliaux (CD34, VEGFR2, vWF) et se différencient en EPCs^{52, 58-60}. En l'occurrence, les EPCs peuvent être obtenues par deux méthodes principales : la première méthode consiste à isoler les EPCs à partir du sang de cordon ombilical, de la moelle osseuse et du sang périphérique par enrichissement cellulaire avec un marqueur spécifique (CD34, VEGFR2, CD133), tandis que la deuxième méthode consiste à différencier les EPCs, *in vitro*, par culture de cellules mononucléaires de cordon, de la moelle et du sang périphérique.⁵⁸ Dans cette thèse, je me limiterai essentiellement à la caractérisation des EPCs obtenues à partir du sang périphérique adulte (tissu facilement accessible) et mises en culture, *in vitro*.

1.5.1 Les EPCs circulantes

Les essais de purification et de caractérisation des EPCs circulantes sont entravés, d'une part, par la présence de cellules endothéliales circulantes matures (CECs) dans le sang et, d'autre part, par l'absence de marqueurs spécifiques pour distinguer entre les EPCs, proprement dit, et les cellules hématopoïétiques et/ou présentant un potentiel progéniteur (tableau 1.1). Or, un nombre élevé de CECs a été observé chez les patients souffrant de maladies associées aux lésions vasculaires.⁶¹⁻⁶³ Contrairement aux EPCs, les CECs peuvent se détacher de l'endothélium vasculaire, bien qu'il soit fort possible qu'une fraction de CECs détectées dans le sang périphérique dérive des EPCs issues de la moelle.⁶⁴ Toutefois, les CECs semblent avoir un rôle minime dans la vasculogénèse postnatale.^{65, 66} Le pourcentage de CECs et d'EPCs circulantes demeure extrêmement faible dans le sang adulte périphérique (0.01% et 0.0001%, respectivement) et par conséquent, la rareté de ces cellules circulantes a contribué à la controverse dans l'identification et la compréhension de leur biologie *in vitro* et *in vivo*.⁶⁷

Tableau 1.1 : Principaux marqueurs de surface cellulaire pour la caractérisation des EPCs

Marqueur	Nom alternatif	Fonction	Localisation
CD14	-	Co-récepteur de lipopolysaccharides bactériens	Monocytes, macrophages, EPCs dérivées de la lignée myéloïde
CD31	PECAM-1	Interaction Cellule-Cellule	ECs, EPCs, plaquettes, neutrophiles, monocytes, lymphocytes T
CD34	-	Domiciliation (Homing) de cellules	HSCs, EPCs, ECs
CD45	Antigène leucocytaire commun	Transduction de signaux	Toutes les cellules de la lignée hématopoïétiques à l'exception des érythrocytes
CD117	c-Kit	Récepteur de SCF	HSCs
CD133 AC133	Prominin-1	Ligand inconnu Fonction inconnue	HSCs, EPCs, cellules souches neurales, cellules épithéliales
CD144	VE-cadhérine	Molécule d'adhésion inter-endothéliale; maintien de l'intégrité vasculaire	EPCs, ECs, cellules folliculaires dendritiques, macrophages tissulaires
VEGFR2	KDR (humain) Flk-1 (souris)	Régulation de la néovascularisation; Survie de cellules endothéliales	EPCs, ECs, sous-population de cellules souches
vWF	Antigène relié au facteur VII	Hémostase (stabilisateur de facteur VII)	EPCs, ECs, plasma (après sa sécrétion), plaquettes, mégacaryocytes
Tie-2	Tek	Récepteur des angiopoïétines	HSCs, EPCs, ECs

Légende : ECs (Cellules Endothéliales), EPCs (Cellules Endothéliales Progénitrices), HSCs (Cellules Souches Hématopoïétiques), PECAM-1 (Molécule -1 d'Adhésion Cellulaire des Plaquettes et l'Endothélium), SCF (Facteur de Cellules Souches), Tie-2 (Tyrosine kinases-2 qui contient les domaines des Immunoglobulines et de facteur de croissance épidermique), VEGFR2 (Récepteur 2 du Facteur de Croissance Vasculaire Endothélial), vWF (Facteur von Willebrand). Inspiré de Marsboom et al. Endothelial progenitor cell : new perspectives and applications in cardiovascular therapies. *Expert.Rev.Cardiovasc. Ther.*6(5): 688.

1.5.2 Les EPCs dérivant de la culture des cellules mononucléaires

Plusieurs études ont rapporté que les cellules mononucléaires du sang périphérique regroupent plusieurs populations de cellules qui possèdent la faculté de se différencier *in vitro* en EPCs.^{3, 50, 52, 54, 59, 60, 68-72} Par ailleurs, ces cellules ont une application thérapeutique potentielle en régénération vasculaire, en ingénierie tissulaire et en thérapie cellulaire.^{65, 73-80} Or, la population de cellules mononucléaires qui peut se différencier le long de ce lignage est très hétérogène et comporte plusieurs sous-populations. Toutefois, il est bien documenté que les cellules CD14⁺/CD34⁻ qui représentent la fraction la plus commune et la plus abondante des cellules mononucléaires, constituent une source possible de précurseurs endothéliaux.^{48, 70, 80-82} En effet, la plupart des investigateurs utilisent un gradient de densité pour isoler des cellules mononucléaires du sang humain périphérique et les incubent sur une matrice de fibronectine, de gélatine, ou de collagène, en présence de facteurs de croissance angiogéniques. Dans de telles conditions, ces cellules subissent des transformations morphologiques et phénotypiques, perdent les marqueurs des monocytes/macrophages et expriment certaines caractéristiques/fonctions des cellules endothéliales.^{50, 58, 59, 72} En outre, et selon leur temps d'apparence en culture, plusieurs chercheurs les séparent en deux populations qui présentent des cinétiques de croissance et des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles distinctes. Ces deux populations sont appelées les EPCs précoces "early" EPCs et les EPCs tardives "late" EPCs.^{58, 69, 72} Jusqu'à maintenant, il n'est pas clair si ces deux populations représentent deux stades de différenciation entre l'hémangioblaste et la cellule endothéliale mature ou si elles dérivent de deux précurseurs différents.

Les "early" EPCs apparaissent tôt en culture, soit après trois à sept jours d'ensemencement de cellules mononucléaires.^{58, 69} Sur une surface matricielle, les "early" EPCs forment des colonies qui consistent en un noyau de cellules rondes au centre entouré de cellules ovales ou fusiformes à la périphérie (figure 1.3).^{3, 50, 59, 60, 69, 72} Les "early" EPCs sont doublement positives pour la lectine et l'Ac-LDL, expriment les marqueurs communs des cellules de la lignée leucocytaire et endothéliale,^{52, 83} ont une courte durée de vie et ne se répliquent pas ou modérément, et sont incapables de former un réseau vasculaire *in vitro* (figure 1.3).^{69, 84} Leur faible taux de croissance et de différenciation suggèrent que leurs effets thérapeutiques sont essentiellement transmis par voie paracrine.^{52, 84-87}

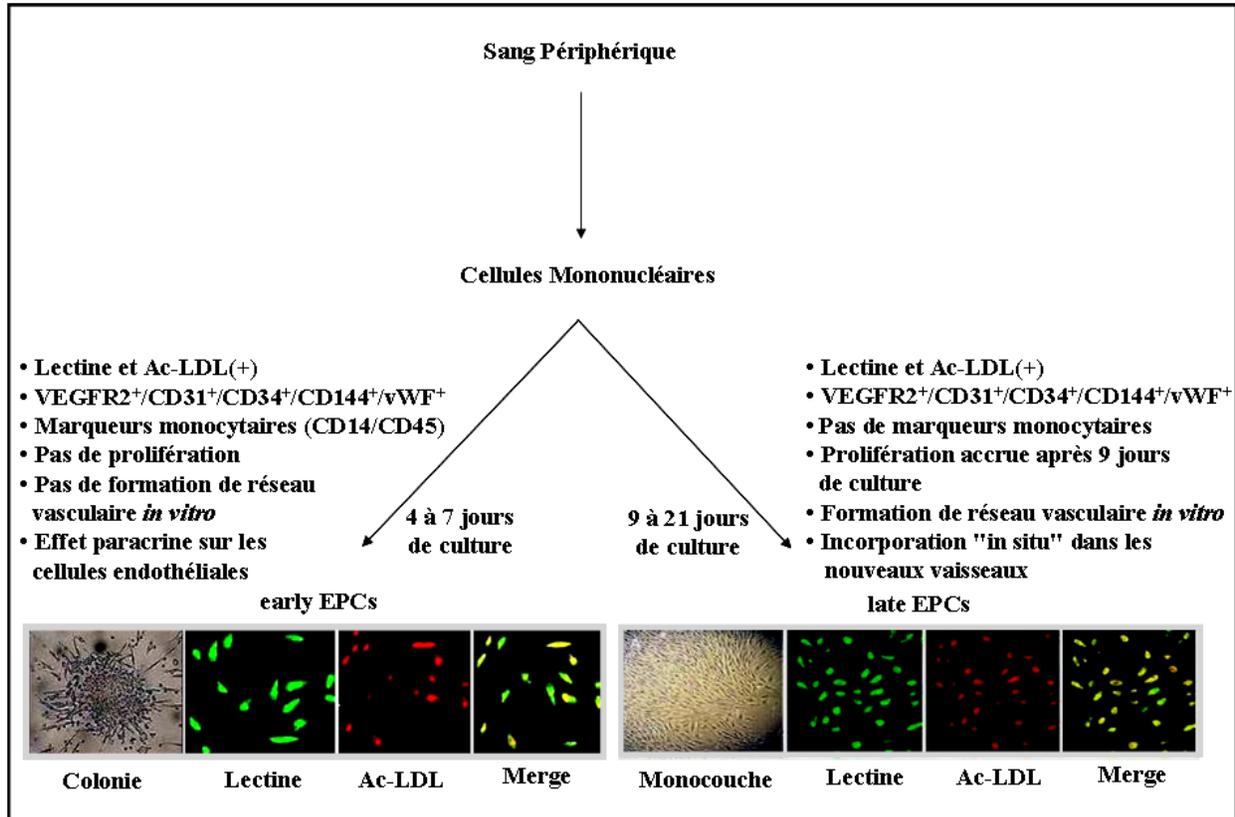


Figure 1.3 : Caractérisation phénotypique des EPCs en culture. Légende : Ac-LDL (Acétyle-LDL), early EPCs (EPCs précoces), EPCs (Cellules Endothéliales Progénitrices), late EPCs (EPCs tardives), VEGFR2 (Récepteur 2 du Facteur de Croissance Vasculaire Endothélial), vWF (Facteur vonWillebrand). Grossissement : 250X.

Les late EPCs apparaissent plus tardivement en culture (après deux à trois semaines) et se présentent sous forme d'un tapis ou d'une monocouche de cellules aplaties. Les late EPCs expriment des marqueurs similaires aux cellules endothéliales matures,⁶⁹ présentent une courbe de croissance exponentielle, forment un réseau vasculaire *in vitro* et peuvent survivre jusqu'à 12 semaines en culture après plusieurs passages.^{69, 84} À l'opposé des "early" EPCs, ces cellules secrètent une petite quantité de cytokines.⁶⁹

1.6 Méthodes de culture des EPCs dérivées du sang périphérique

À présent, il n'existe pas un protocole standard pour l'isolation et la culture des EPCs à partir des cellules mononucléaires du sang périphérique ("Peripheral Blood Mononuclear Cells", PBMCs). Le plus souvent, une suspension de cellules mononucléaires est obtenue par centrifugation différentielle sur un gradient de ficoll. Ensuite, les cellules mononucléaires sont ensemencées dans des plaques de culture en plastique (9.6 cm² de surface), pré-enduites avec la fibronectine, à une

densité de 5×10^6 à 10×10^6 cellules par puit. Après une première période d'incubation (24 à 48 heures), les cellules non-adhérentes sont aspirées et les cellules adhérentes au fond des puits sont maintenues en culture. Les colonies apparaissent normalement entre le troisième et le cinquième jour de culture.^{51, 58} Toutefois, les cellules non-adhérentes qui contiennent probablement les EPCs circulantes matures sont parfois récupérées etensemencées dans de plus petites plaques (2 cm² de surface) et des colonies d'EPCs émergent entre le cinquième et le neuvième jour de culture.^{3, 88} Bien que cette méthode soit convenablement utilisée pour les études descriptives, le faible pourcentage d'EPCs matures circulantes rend cette technique peu utilisée et la plupart des études fonctionnelles se font avec la fraction adhérente.^{47, 50, 51, 54, 58, 72, 88, 89} La figure 1.4 schématise les deux méthodes de culture des EPCs à partir des PBMCs.

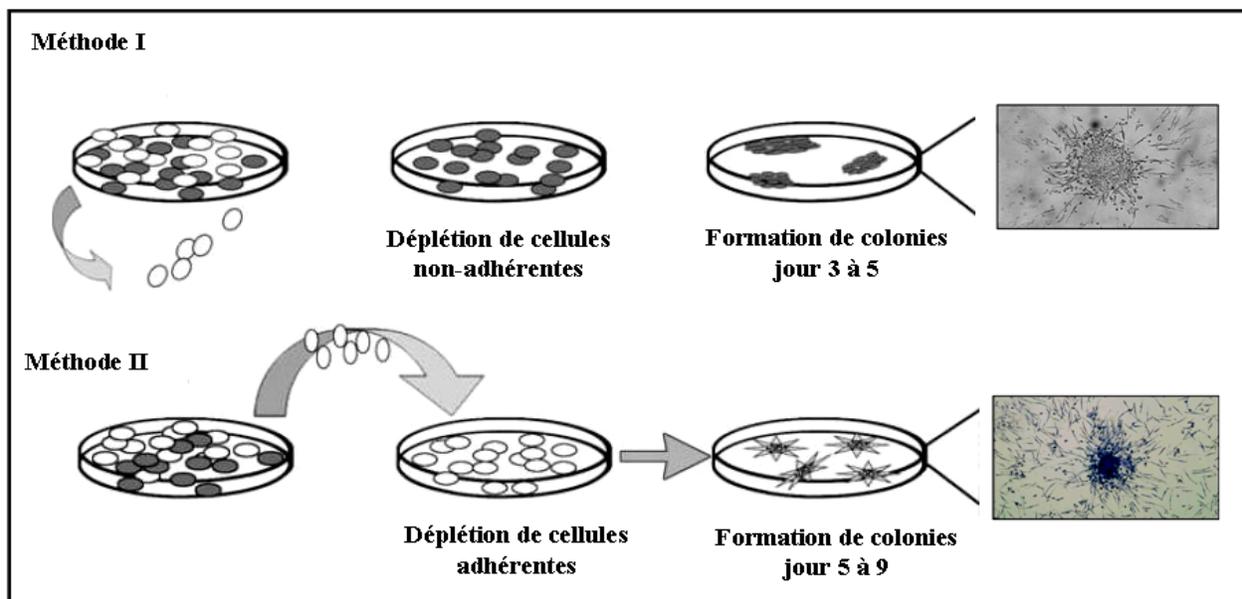


Figure 1.4 : Méthodes de culture des EPCs dérivées des cellules mononucléaires de sang humain périphérique (PBMCs). Les PBMCs sont isolées et mises en culture sur une matrice de fibronectine. Méthode I : après la première période d'incubation (48 heures), les cellules non adhérentes sont aspirées et les cellules adhérentes sont maintenues en culture. Des colonies apparaissent entre le troisième et le cinquième jour de culture. Méthode II : après la première période d'incubation, les cellules non-adhérentes sont récupérées et réensemencées, et des colonies émergent entre le cinquième et le neuvième jour de culture. Inspiré de Case J et al. Oxidative Stress Impairs Endothelial Progenitor Cell Function. Antioxydants & Redox Signaling. 2008;10 (11) :2.

En se basant sur ces critères biologiques fondamentaux, la définition générale des EPCs dérivées de la culture du sang humain périphérique peut se formuler comme suit :

- 1- Ce sont des précurseurs endothéliaux circulants dérivants de la moelle osseuse.
- 2- Elles peuvent se différencier, *in vitro*, en des cellules exhibant des caractères morphologiques et fonctionnels des cellules endothéliales.
- 3- Elles peuvent contribuer, *in vivo*, à la vasculogénèse et/ou à la réparation vasculaire.

La multiplicité des conditions de leur isolation, de leur purification et de leur culture *in vitro* et des paramètres biologiques utilisés pour définir leur potentiel thérapeutique explique la confusion actuelle, aggravée par notre méconnaissance de l'origine et de comportement définis de ces cellules *in vivo*. Mais ce foisonnement confirme la richesse de ce domaine de recherche et l'excitation qu'il suscite est grandement justifiée.

1.7 La biologie des EPCs

Pour que les EPCs puissent participer dans la vasculogénèse postnatale et la réparation endothéliale *in vivo*, elles doivent répondre aux différents stimuli et être transférées à partir de la moelle osseuse vers les tissus cibles. La mobilisation des EPCs et leur recrutement dans les tissus cibles est un sujet de recherches actif. De loin, ce processus ressemble à celui de la domiciliation ("homing") des HSCs dans la moelle osseuse, et requiert une séquence coordonnée de signalisations et d'interactions adhésives comprenant la mobilisation à partir de la moelle osseuse vers la circulation périphérique, l'adhésion et la transmigration, le chimiotactisme et l'invasion tissulaire, et finalement la différenciation en cellules endothéliales matures (figures 1.5). La compréhension des facteurs qui régulent le recrutement et la différenciation des EPCs peuvent aider à identifier de nouvelles approches thérapeutiques destinées à promouvoir ou à inhiber la vasculogénèse dépendante des EPCs.

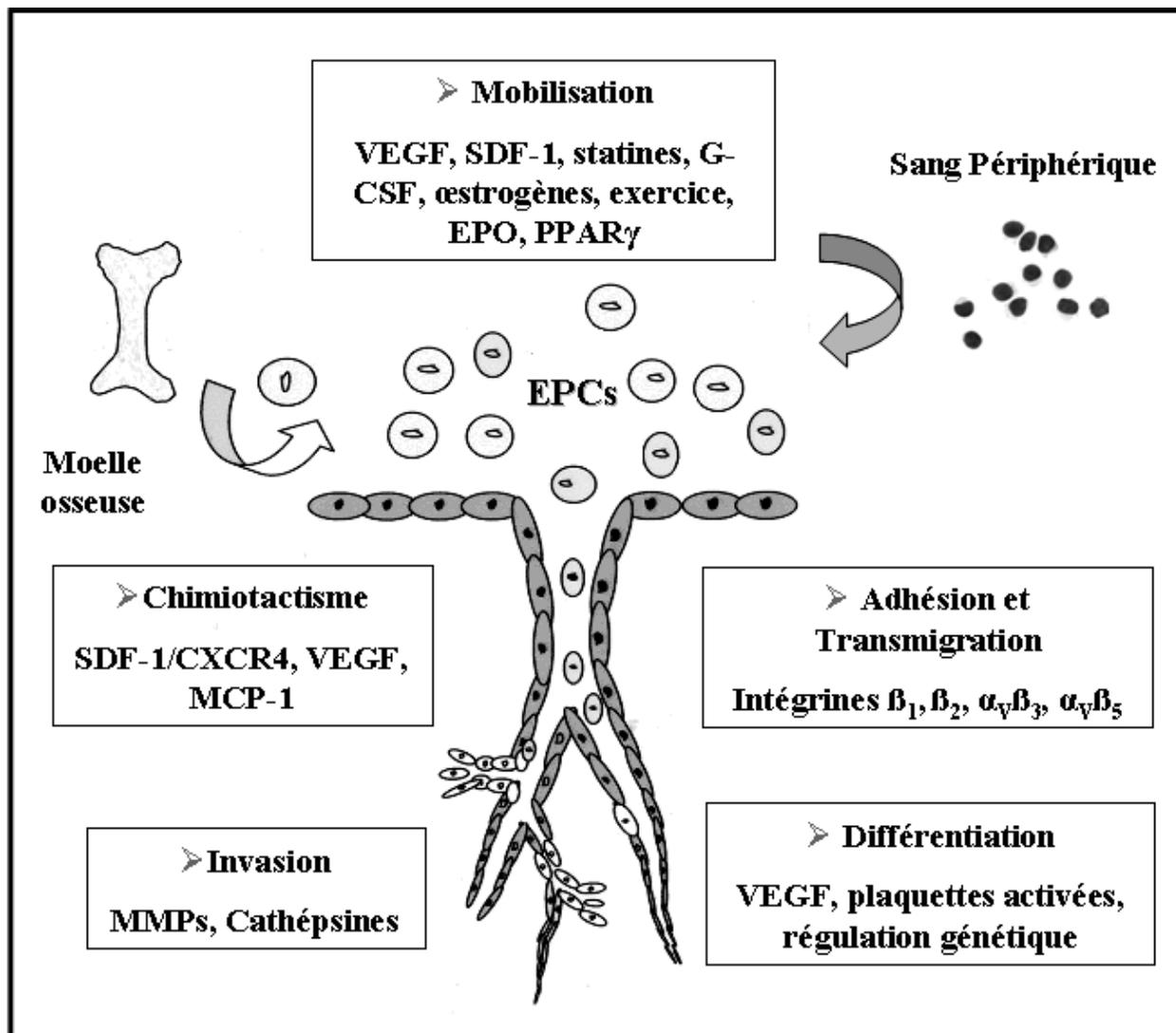


Figure 1.5 : Mécanismes de recrutement des EPCs. Le recrutement et l'incorporation des EPCs dans les tissus ischémiques ou lésés est un mécanisme complexe qui requiert une séquence coordonnée d'évènements incluant la mobilisation de la moelle osseuse vers le sang périphérique, l'adhésion et la transmigration endothéliale, le chimiotactisme et l'invasion tissulaire, et la différenciation *in situ*. Les facteurs essentiels qui régulent les différentes étapes sont indiqués. Légende : EPO (érythropoïétine), G-CSF (Facteur de Stimulation de Colonie de Granulocytes), MCP-1 (Protéine-1 Chémoattractante des Monocytes), PPAR γ (Récepteur γ au Facteur Activé de Prolifération des Peroxysomes), SDF-1 (Facteur-1 Dérivé des Cellules Stromales), VEGF (Facteur de Croissance Vasculaire Endothélial). (Adapté d'Ubrich et al. Endothelial Progenitor Cells Characterization and Role in vascular Biology. Circ Research. 2004;95:349.

1.7.1 Mobilisation de la moelle osseuse

La mobilisation des EPCs à partir de la moelle osseuse est un processus complexe, régulé par le microenvironnement local de la moelle appelé la niche hématopoïétique ou la niche stromale constituée par des fibroblastes, des ostéoblastes, des adipocytes et des cellules endothéliales qui

conditionnent le microenvironnement local de la moelle. Dans la niche stromale, les EPCs se trouvent ancrées parmi d'autres cellules souches où elles existent sous un état quiescent et sont engagées à se différencier et à se mobiliser dans la circulation en réponse à des signaux spécifiques mettant en jeu une variété de protéinases, de cytokines, de facteurs de croissance et des récepteurs membranaires.

De point de vue mécanistique, les cytokines mobilisatrices induisent la sécrétion des protéinases qui clivent les liens adhésifs entre les cellules souches et les cellules stromales, ce qui permet aux cellules souches de se dissocier de la moelle osseuse et de gagner le flot sanguin par une transmigration à travers l'endothélium sinusoidal.^{90, 91} En clinique, la cytokine utilisée pour la mobilisation des cellules CD34⁺ chez les patients est le facteur de stimulation de colonie de granulocytes (G-CSF) qui induit la sécrétion d'enzymes protéolytiques telles que l'élastase, la cathepsine G et les métalloprotéinases de la matrice (MMPs) à partir des neutrophiles. Ces protéinases clivent les liens adhésifs entre les cellules stromales et les intégrines exprimées sur les cellules souches.⁹² De plus, ces protéinases clivent la cytokine facteur-1 α dérivé de cellules stromales (SDF-1 α) qui est sécrétée par les cellules stromales et son récepteur CXCR4 sur les cellules souches et progénitrices, ce qui provoque la sortie de ces dernières de la moelle.⁹³ D'ailleurs, il a été démontré que l'activation de la métalloprotéinase 9- de la matrice (MMP-9) favorise la transformation du ligand c-Kit membranaire en ligand c-Kit soluble nommé aussi le SCF.²¹ Cette activation est suivie par le détachement de cellules progénitrices c-Kit⁺ de la niche stromale et leur transfert vers la zone vasculaire de la moelle.²¹ L'étape suivante est la maturation de l'hémangioblaste, précurseur commun de cellules vasculaires et hématopoïétiques.⁹⁴

Les facteurs qui régulent l'activation/division de l'hémangioblaste ne sont pas encore bien définis. Un facteur régulateur important semble être le VEGF, qui se lie à son récepteur le VEGFR2 et stimule l'activation subséquente de la cascade " hémangioblaste-angioblaste-early-EPC-late EPC".⁹⁵ Le VEGF peut aussi activer la MMP-9 confirmant ainsi son rôle-clé dans le processus de migration et de différenciation des EPCs.^{21, 96} En outre, l'expression d'eNOS par les cellules stromales de la moelle peut influencer la mobilisation des EPCs, comme il a été démontré chez des souris déficientes en eNOS où une altération de la mobilisation des EPCs a été associée avec une diminution de l'activité de la MMP-9.⁹⁷ Une fois mobilisées, les EPCs sont libérées de la zone vasculaire de la moelle vers la circulation. Jusqu'à présent, il n'existe pas de définitions claires du moment où une EPC circulante se transforme, *in vivo*, en une cellule endothéliale

mature et complètement différenciée. Étant donné que les cellules endothéliales matures sont CD133/CD14 négatives, une éventuelle possibilité pourrait être la perte du CD133/CD14 et une expression simultanée ou subséquente de vWF et d'autres marqueurs ou caractéristiques endothéliales.

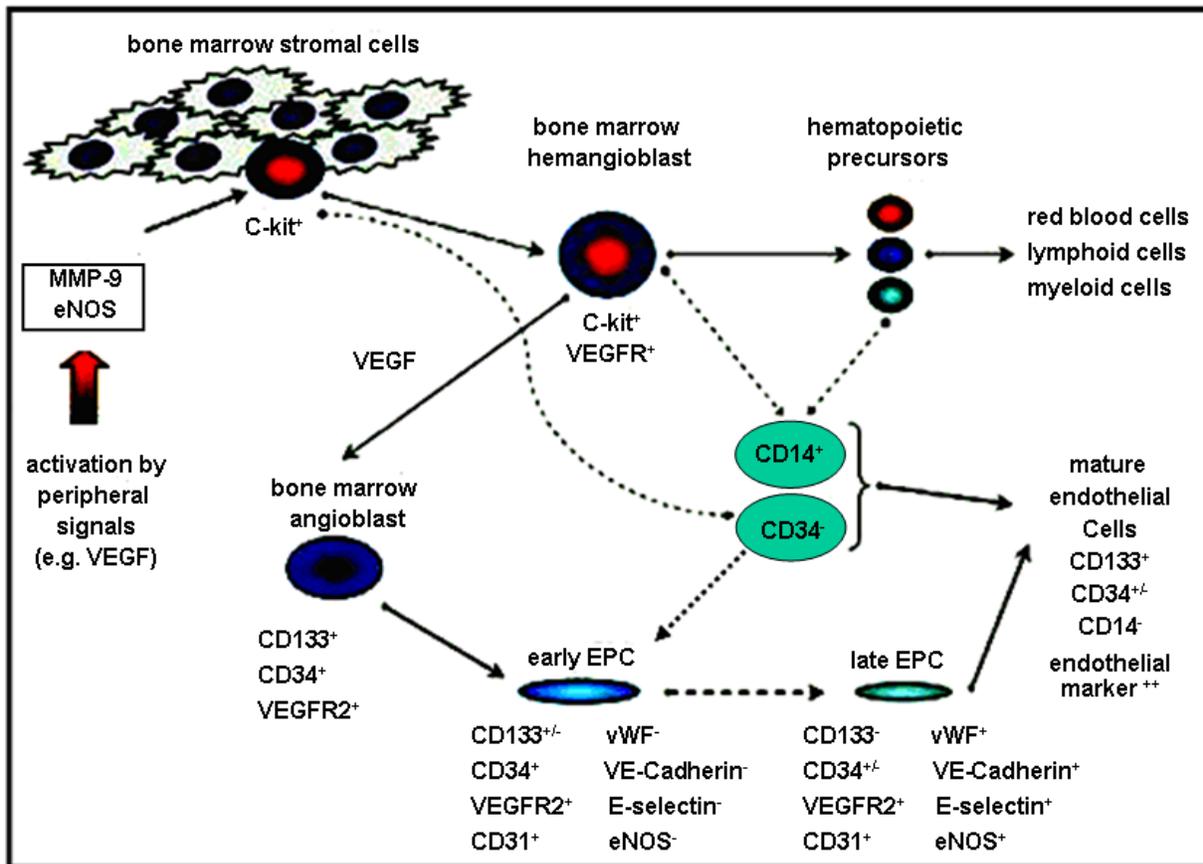


Figure 1.6 : Mobilisation, migration et différenciation des EPCs. La mobilisation des EPCs à partir de la moelle osseuse est initiée par l'activation de la MMP-9 qui provoque la transformation du ligand c-Kit membranaire en c-Kit soluble. Cette activation est suivie par le détachement des cellules progénitrices c-Kit⁺ de la niche stromale et leur transfert vers la zone vasculaire de la moelle osseuse. Un régulateur important de cette phase est le VEGF qui, en se liant à son récepteur (VEGFR2), stimule aussi l'activation de la cascade hémangioblaste - angioblaste - early EPC - late EPC. L'étape finale de ce processus est la différenciation des EPCs en cellules endothéliales matures. Des cellules d'origine myéloïde (CD14⁺/CD34⁺) peuvent également se différencier en early EPCs ou en cellules endothéliales matures. Légende : activation by peripheral signals (activation par les signaux périphériques), bone marrow angioblast (angioblaste de la moelle osseuse), bone marrow stromal cells (cellules stromales de la moelle osseuse), early EPC (EPC précoce), eNOS (Oxyde Nitrique Synthétase endothéliale), endothelial marker (marqueur endothélial), E-selectin (E-sélectine), late EPC (EPC tardive), hematopoietic precursors (précurseurs hématopoïétiques), lymphoid cells (cellules lymphoïdes), mature endothelial cells (cellules endothéliales matures), myeloid cells (cellules myéloïdes), red blood cells, (globules rouges), VEGF (Facteur de Croissance Vasculaire Endothélial), VEGFR2 (récepteur 2 du facteur de croissance vasculaire endothélial), vWF (Facteur vonWillebrand). Adapté de Hristov et al. Endothelial progenitor cells : characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. J.Cell.Mol.Med. 2004; 8:500.

1.7.2 Adhésion et transmigration endothéliale

L'étape initiale de recrutement des EPCs dans les tissus ischémiques implique l'adhésion de cellules progénitrices aux cellules endothéliales activées par les cytokines et l'ischémie et la transmigration de cellules progénitrices à travers la monocouche endothéliale.⁹⁸ Les intégrines sont des protéines membranaires impliquées dans l'adhésion d'une variété de cellules y compris les HSCs et les leucocytes aux protéines de la matrice extracellulaire et aux cellules endothéliales.⁹⁹ Les β_1 -intégrines sont exprimées par plusieurs populations cellulaires incluant les HSCs, EPCs, et les ECs,¹⁰⁰ tandis que la β_2 -intégrine est exprimée préférentiellement sur les EPCs.^{101, 102} Pendant l'adhésion des EPCs sur l'endothélium activé, les β_1 -, β_2 - intégrines exprimées à la surface des EPCs interagissent avec leurs contre-récepteurs endothéliaux comme la molécule-1 d'adhésion intercellulaire ("InterCellular Adhesion Molecule-1", ICAM-1), la molécule-1 d'adhésion de cellule vasculaire ("Vascular Cell Adhesion Molecule-1", VCAM-1), et le fibrinogène lié à la surface extracellulaire.

Alors que le blocage de la β_2 - intégrine inhibait complètement l'adhésion des EPCs sur l'endothélium et le fibrinogène, le blocage de la β_1 - intégrine n'avait pas d'effet significatif.¹⁰¹ Ces résultats démontrent que l'adhésion ferme des EPCs sur l'endothélium et le fibrinogène est principalement dépendante de la β_2 - intégrine. En accord avec la haute expression des β_2 -intégrines sur les cellules souches et progénitrices, il a été démontré que les β_2 - intégrines induisent l'adhésion et la transmigration des EPCs et favorisent le processus de néovascularisation des tissus ischémiques *in vivo*.^{101, 102} En outre, une étude récente a démontré l'implication profonde de la E-sélectine endothéliale dans l'interaction des EPCs avec l'endothélium *in vitro*, et dans un modèle d'ischémie chez la souris.¹⁰³ Cependant, cette étude n'a pas réussi à identifier le ligand potentiel de la E-sélectine sur les EPCs. Par ailleurs, il a été suggéré que l'adhésion initiale des cellules progénitrices embryonnaires durant leur incorporation dans l'angiogenèse tumorale a été médiée par la E- et P-sélectine et le Ligand-1 Glycoprotéique de la P-sélectine (PSGL-1).⁹⁸

Les contacts intercellulaires et le phénomène de transmigration peuvent être de moindre importance pour la ré-endothélialisation des artères dénudées (contrairement au recrutement des EPCs dans les tissus ischémiques). À cet égard, des études ont investigué la contribution des intégrines à la ré-endothélialisation qui est principalement médiée par l'adhésion aux protéines de la matrice extracellulaire. L'adhésion des EPCs aux vaisseaux dénudés semble être médiée par les récepteurs de la vitronectine ($\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ - intégrine). Ainsi, le blocage de la $\alpha_v\beta_3$ - et de la $\alpha_v\beta_5$ -

intégrine avec des peptides cycliques RGD inhibe la ré-endothélialisation des artères carotidiennes lésées.¹⁰⁴ Toutefois, d'autres intégrines telles que les β_1 -intégrines peuvent aussi participer à l'adhésion des cellules progénitrices aux protéines de la matrice extracellulaire durant la ré-endothélialisation des artères dénudées.¹⁰⁵ D'autre part, des études récentes ont démontré que l'interaction des EPCs avec les plaquettes activées favorise leur adhésion à la matrice sous-endothéliale et leur différenciation en cellules endothéliales matures *in vitro*¹⁰⁶⁻¹⁰⁹ et *in vivo*.^{107, 109-111} L'interaction EPC-plaquette sera envisagée en détail dans le chapitre suivant.

1.7.3 Chimiotactisme et invasion

Étant donné le faible pourcentage d'EPCs circulantes, le chimiotactisme semble être d'une importance vitale pour l'attraction des EPCs vers les tissus ischémiques et lésés. Plusieurs études ont examiné les facteurs qui influencent le recrutement des EPCs dans les sites actifs d'angiogenèse. Ces facteurs incluent les chémokines telles que le SDF-1 α ,^{109, 110, 112, 113} les plaquettes activées et la fibrine,¹⁰⁹⁻¹¹¹ et le facteur tissulaire (TF) exprimé par les ECs.¹¹¹ De plus, des niveaux élevés de VEGF ont été détectés dans les tissus ischémiques suggérant qu'il peut jouer un rôle chimio-attractant pour les EPCs.¹¹⁴⁻¹¹⁶ En fait, le VEGF peut induire la sécrétion du SDF-1 α et de son récepteur CXCR4.^{117, 118} Le SDF-1 α est un agent chimio-attracteur qui favorise le recrutement des EPCs aux sites de néovascularisation,^{119, 120} tandis que le blocage du CXCR4 abolit le recrutement des EPCs dans les organes et tissus cibles.¹¹⁹ En plus de l'induction génique induite par l'hypoxie, l'invasion des tissus ischémiques par les cellules immunocompétentes peut induire la sécrétion de plusieurs chémokines dans les tissus ischémiques, comme les interleukines (IL) ou la protéine-1 chémoattractante des monocytes (MCP-1) qui peuvent attirer les EPCs circulantes.¹⁰⁵ Bien que plusieurs études soient penchées sur les mécanismes qui régulent l'attraction des EPCs vers les tissus ischémiques et lésés, les mécanismes de l'invasion tissulaire sont encore mal connus. Toutefois, les enzymes protéolytiques comme les cathépsines ou les MMPs peuvent avoir un rôle important dans l'invasion tissulaire des EPCs.⁹⁰

1.7.4 Différenciation

La différenciation des EPCs en cellules endothéliales est une étape fondamentale pour une intégration fonctionnelle dans les vaisseaux. Cette différenciation est initiée par la migration des EPCs de la moelle osseuse vers la circulation périphérique suivie par l'adhésion et l'insertion dans

la monocouche endothéliale. Des études récentes ont mis en évidence le rôle potentiel des plaquettes activées dans la maturation des EPCs lors des lésions vasculaires. Ainsi, il a été démontré que les plaquettes adhérentes/activées induisent le recrutement et la différenciation des EPCs en cellules endothéliales matures *in vitro*^{108, 121, 122} et *in vivo*.^{111, 122} Encore une fois, il semble que le VEGF et ses récepteurs jouent un rôle crucial dans ce processus. En effet, il a été démontré que le VEGF induit la différenciation des cellules endothéliales dans des essais de culture ex-vivo utilisant une variété de populations cellulaires progénitrices (CD34⁺,³ CD133⁺,¹²³ et PBMCs^{65, 124}). La cascade génétique qui régule la différenciation des EPCs *in vivo* est peu claire. Aussi, la durée de vie des EPCs circulantes et le devenir des EPCs non-différenciées sont peu connus. Cependant, des études avec des cellules souches embryonnaires ont révélé que la régulation temporelle des gènes homéobox (Hox) peut jouer un rôle important. Les gènes homéobox encodent des facteurs de transcription qui régulent le développement morphologique, la croissance cellulaire, la différenciation et la migration des cellules durant le développement embryonnaire. Récemment, plusieurs gènes homéobox ont été isolés et identifiés dans les tissus cardiovasculaires. Il apparaît évident que certains d'entre eux peuvent avoir une fonction régulatrice dans ce système. Ainsi, un gène Hox nommé Hex (aussi appelé Prh) est requis pour la différenciation de l'hémangioblaste en progéniteurs hématopoïétiques définitifs et pour la différenciation endothéliale.¹²⁵ De plus, la kinase sérine/thréonine Pim-1 a été dernièrement découverte et considérée comme étant une réponse génétique au VEGF qui contribue à la différenciation des cellules souches embryonnaires en cellules endothéliales.¹²⁶ Une autre étude a montré que la prolifération et la différenciation des EPCs *in vitro* sont stimulées par les corps apoptotiques de cellules endothéliales matures.¹²⁷ En conséquence, le phénomène d'apoptose peut représenter une cascade signalétique importante dans la réparation de l'endothélium endommagé. Un tel modèle de communication intercellulaire induit par les corps apoptotiques peut aussi être utilisé comme nouvelle stratégie pour le traitement moléculaire.

1.8 Conditions et facteurs influençant l'activité des EPCs

De nombreux facteurs et conditions peuvent influencer la physiologie des EPCs (tableau 1.2). Les œstrogènes et l'activité physique augmentent le nombre d'EPCs circulantes. En effet, l'exercice physique augmente le nombre d'EPCs circulantes *via* un mécanisme dépendant de la production du NO et du VEGF chez la souris,¹²⁸ et chez les patients coronariens.¹²⁹ Le mécanisme par lequel les

œstrogènes favorisent la ré-endothélialisation après la lésion vasculaire peut être lié à l'effet de ces hormones sur la mobilisation des EPCs. La ré-endothélialisation après la lésion carotidienne est significativement plus prompte chez des souris ovariectomisées traitées avec du 17 β -œstradiol que chez le groupe témoin. Les animaux traités avec l'œstrogène présentent des taux élevés d'EPCs circulantes et une augmentation significative du nombre de cellules dérivées de la moelle qui participent à la réparation endothéliale aux sites de lésions vasculaires.¹³⁰

D'ailleurs, plusieurs études ont décrit l'influence d'une gamme de conditions physiopathologiques et de quelques médicaments et molécules sur le nombre d'EPCs, *in vivo*. Dans ce contexte, le nombre d'EPCs circulantes et leur activité migratoire sont diminués chez les patients présentant des facteurs de risque athérosclérotique comme le tabagisme, la prédisposition génétique, l'hypertension ou l'hyperglycémie.^{131, 132} Aussi, la capacité fonctionnelle des EPCs à produire des unités de formation de colonies ("Colony Forming Unit", CFU) est négativement corrélée au score de Framingham dans l'évaluation des risques cardiovasculaires.⁸⁸ Chez les patients souffrant du diabète mellitus du type 2, les EPCs sont caractérisées par une baisse de prolifération, un recrutement altéré et une capacité réduite de formation de tubes capillaires, *in vitro*.¹³³ De même, une dysfonction cellulaire similaire est observée chez les patients diabétiques du type I.¹³⁴ D'autre part, l'infarctus aigu du myocarde est associé avec une mobilisation et une croissance rapide du nombre d'EPCs circulantes.¹¹⁵ Aussi, le traumatisme vasculaire tel que le pontage coronarien ou une lésion de brûlure induit une mobilisation rapide mais transitoire des EPCs du type VEGFR2⁺/AC133⁺.¹³⁵ De surcroît, une étude a décrit une variation diphasique dans le nombre d'EPCs chez les patients avec une insuffisance cardiaque chronique à savoir une élévation dans les phases primaires (classe I et II) et une réduction dans les phases avancées (classe III et IV).¹³⁶ Aussi, une diminution du nombre et une réduction de l'adhésion des EPCs circulantes ont été enregistrées chez des patients avec une resténose intra-stent diffuse.¹³⁷

L'administration de certains médicaments peut influencer le nombre et l'activité migratoire des EPCs. Par exemple, le traitement avec les inhibiteurs de la 3-Hydroxy-3-Méthyle-Glutaryle-Coenzyme A réductase (les statines) augmente le nombre d'EPCs circulantes et favorise la réparation endothéliale après l'angioplastie ou l'angiogénèse.^{104, 138, 139} Ces effets salvatrices des statines sont médiés par activation de la cascade de PI3-kinase/Akt (Akt est appelée aussi Protéine Kinase B, PKB) dans les EPCs.¹²⁴ De même, le valsartan (antagoniste des récepteurs de type I de l'angiotensine II) et le ramipril (inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I)

augmentent le nombre d'EPCs circulantes en neutralisant les effets de l'angiotensine chez les patients hypertendus.^{140, 141}

Les chémokines et les cytokines qui induisent la mobilisation des leucocytes et des érythrocytes peuvent aussi influencer l'activité des EPCs. Ainsi, l'administration exogène de facteur de stimulation de colonie de granulocytes monocytes (GM-CSF) chez les animaux (lapins et souris) entraîne une augmentation du nombre d'EPCs circulantes et accélère le développement des vaisseaux de la cornée.^{57, 142} Chez l'humain, l'administration du G-CSF augmente de 5 à 10 fois le nombre des cellules CD133⁺/VEGFR2⁺ circulantes.⁴⁶ L'administration d'une forme recombinante humaine de l'érythropoïétine augmente de façon dose-dépendante le nombre d'EPCs différenciées *in vitro* et aussi le nombre d'EPCs fonctionnelles dans le sang périphérique humain.^{143, 144} Dans cette perspective, il faut bien noter le rôle central que joue la chémokine SDF-1 α dans la biologie des EPCs. En effet, le SDF-1 α induit le transfert des EPCs entre la moelle osseuse et la circulation périphérique¹¹³ et leur recrutement aux sites de néovascularisation.^{119, 120} De plus, le SDF-1 α a aussi démontré la capacité de protéger les EPCs contre l'apoptose.¹¹³ Une autre chémokine, la chémokine dérivée des kératinocytes favorise la ré-endothélialisation de la paroi vasculaire en induisant le recrutement d'EPCs.¹⁴⁵ Par contre, le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) et la protéine réactive C ("C Reactive Protein", CRP) favorisaient l'apoptose, atténuaient le fonctionnement, et diminuaient le nombre d'EPCs circulantes.^{146, 147} Le nombre d'EPCs peut aussi augmenter après l'application des facteurs de croissance comme le VEGF,^{46, 116, 148} le facteur de croissance placentaire ("Placental Growth Factor", PIGF),¹⁴⁸ l'Angiopoïétine-1 (Ang-1),¹⁴⁹ le facteur de croissance dérivé des plaquettes ("Platelet-Derived Growth factor", PDGF),¹⁵⁰ le NO⁹⁷ et le rosiglitazone (le ligand de récepteur au facteur activé de prolifération des peroxysomes : "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor", PPAR γ).^{151, 152}

Tableau 1.2 : Conditions et facteurs influençant la physiologie des EPCs

Condition ou facteur	Changements dans le nombre/fonction des EPCs ou de cellules CD34 ⁺	Références
Physiologique :		
Exercice physique	↑ EPCs	Laufs et al., <i>Circulation</i> (2004) ¹²⁸ Adams et al., <i>ATVB</i> (2004) ¹²⁹
Sexe féminin (e.g œstrogènes)	↑ Cellules CD34 ⁺ /VEGFR2 ⁺	Strehlow et al., <i>Circulation</i> (2003) ¹³⁰
Vieillesse	↓ EPCs	Hoetzer et al., <i>J. Appl.Physiol</i> (2007) ¹⁵³
Pathologique :		
Maladies des artères coronaires/facteurs de risque Tabagisme Prédisposition génétique Hypertension Hyperglycémie	↓ Nombre et migration d'EPCs ou de cellules CD34 ⁺ /VEGFR2 ⁺ ↓ EPC ou cellules CD34 ⁺ /VEGFR2 ⁺ ↓ EPCs ou cellules CD34 ⁺ /VEGFR2 ⁺ ↓ Migration d'EPCs ↓ EPCs	Vasa et al., <i>Circ Res</i> (2001) ¹³¹ Krankel et al., <i>ATVB</i> (2005) ¹³²
Autres facteurs de risque : Stress oxydatif Hyperlipidémie Inflammation	↓ Mobilisation/Fonction EPCs ↓ Prolifération/Migration EPCs ↑ EPCs, ↑ Recrutement EPCs	Yao et al., <i>Curr Pharm Biotechnol</i> (2006) ¹⁵⁴ Chen et al., <i>Clin Sci (Lond)</i> (2004) ¹⁵⁵
Cumul de facteur de risque /score de Framingham	↓ CFU EPCs	Hill et al., <i>N Engl J Med</i> (2003) ⁸⁸
Diabète mellitus du type 1 et 2	↓ Prolifération/Recrutement EPCs ↓ Formation de tubes capillaires	Loomans et al., <i>Diabetes</i> (2004) ¹³⁴ Tepper et al., <i>Circulation</i> (2002) ¹³³
Infarctus du myocarde	↑ Cellules CD34 ⁺ ↑ Cellules CD34 ⁺ /AC133 ⁺ /VEGFR2 ⁺	Shintani et al., <i>Circulation</i> (2001) ¹¹⁵
Traumatisme vasculaire	↑ Cellules CD133 ⁺ /VEGFR2 ⁺	Gill et al., <i>Circ Res</i> (2001)
Insuffisance cardiaque congestive (classe I-II)	↑ Cellules CD34 ⁺ ↑ Cellules CD34 ⁺ /CD133 ⁺ /VEGFR2 ⁺ ↑ CFU EPCs	Valgimigli et al., <i>Circulation</i> (2004) ¹³⁶
Insuffisance cardiaque congestive (classe III-IV)	↓ Cellules CD34 ⁺ ↓ Cellules CD34 ⁺ /CD133 ⁺ /VEGFR2 ⁺ ↓ CFU EPCs	Valgimigli et al., <i>Circulation</i> (2004) ¹³⁶
Resténose intra-stent	↓ CFU EPCs ↓ Adhésion EPCs	George et al., <i>ATVB</i> (2003) ¹³⁷
Médicaments, hormones et cytokines :		
Inhibiteurs de la HMG-CoA réductase (les statines)	↑ EPCs	Llevadot et al., <i>J Clin Invest</i> (2001) ¹³⁸ Dimmler et al., <i>J Clin Invest</i> (2001) ¹²⁴ Walter et al., <i>Circulation</i> (2002) ¹⁰⁴ Werener et al., <i>ATVB</i> (2002) ¹³⁹
Angiotensine II	↓ EPCs	Imanishi et al., <i>J Hypertens</i> (2005) ¹⁴¹
Valsartan (ARB) Ramipril (ACE-I)	↑ EPCs ↑ EPCs	Imanishi et al., <i>J Hypertens</i> (2005) ¹⁴¹ Min et al., <i>Cardiovasc Drug Ther</i> (2004) ¹⁴⁰
Érythropoïétine	↑ Cellules CD34 ⁺ /CD45 ⁺	Heeschen et al., <i>Blood</i> (2003) ¹⁴³ Bahlmann et al., <i>Blood</i> (2004) ¹⁴⁴
GM-CSF, G-CSF	↑ EPCs, ↑ Cellules CD133 ⁺ /VEGFR2 ⁺	Takahashi et al., <i>Nat Med</i> (1999) ⁵⁷ Peichev et al., <i>Blood</i> (2000) ⁴⁶ Cho et al., <i>Circulation</i> (2003) ¹⁴²
SDF-1 α	↑ Mobilisation EPCs ↑ Recrutement EPCs ↓ Apoptose EPCs	Kollet et al., <i>Blood</i> (2001) ¹¹⁹ Yamaguchi et al., <i>Circulation</i> (2003) ¹¹³ De Falco et al., <i>Blood</i> (2004) ¹²⁰
KC	↑ Recrutement EPCs	Liehn et al., <i>ATVB</i> (2004) ¹⁴⁵
TNF- α	↓ EPCs, ↑ Apoptose EPCs	Seeger et al., <i>Circulation</i> (2005) ¹⁴⁶
Facteurs de croissance : VEGF, PlGF Ang-1 PDGF	↑ EPCs ↑ EPCs ↑ EPCs	Li et al., <i>FASEB J</i> (2006) ¹⁴⁸ Moore et al., <i>Ann NY Acad Sci</i> (2001) ¹⁴⁹ Li et al., <i>J Clin Invest</i> (2005) ¹⁵⁰
Autres molécules :		
NO	↑ EPCs	Aicher et al., (2003) ⁹⁷
CRP	↓ EPCs, ↑ Apoptose EPCs	Verma et al., <i>Circulation</i> (2004) ¹⁴⁷
Agonistes de PPAR γ (rosiglitazone)	↑ EPCs, ↑ Cellules CD34 ⁺ /CD133 ⁺ ↑ Migration EPCs	Pistrosch et al., <i>Atherosclerosis</i> (2005) ¹⁵¹ Han et al.(2008) ¹⁵²

Inspiré de : Hristov et al. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J.Cell.Mol.Med.* 2004;8 :502. Légende : ACE-I (Inhibiteur de l'Enzyme de Conversion de l'angiotensine-I), Ang-1 (Angiopoïétine-1), ARB (Antagoniste des Récepteurs de type I de l'Angiotensine II), CRP (Protéine C Réactive), G-CSF (Facteur de Stimulation de Colonie de Granulocytes), GM-CSF (Facteur de Stimulation de Colonie de Granulocytes Monocytes), HMG-CoA réductase (réductase du 3-Hydroxy-3-Méthyle-Glutaryle-Coenzyme A), KC (Chémokine dérivée des Kératinocytes), NO (Oxyde Nitrique), PDGF (Facteur de Croissance Dérivé des Plaquettes), PIGF (Facteur de Croissance Placentaire), PPAR γ (Récepteur γ au Facteur Activé de Prolifération des Peroxysomes), SDF-1 α (Facteur 1 α -Dérivé des Cellules Stromales), TNF- α (Facteur α - de Nécrose Tumorale), VEGF (Facteur de Croissance Vasculaire Endothélial).

1.9 Les EPCs et les facteurs de risque cardiovasculaire

Le nombre et/ou l'activité fonctionnelle des EPCs circulantes ont été associés avec les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires et sont modulés par différentes pathologies.^{75, 88, 156} La diminution du nombre et/ou de la fonctionnalité des EPCs peuvent contribuer à un cercle vicieux qui mène à la dysfonction endothéliale (figure 1.7). La présence des facteurs de risque cardiovasculaire affecte le nombre et la fonctionnalité des EPCs et prédisposent au développement de la dysfonction endothéliale et des maladies cardiovasculaires. En effet, les facteurs de risque sont connus pour altérer de façon systématique la fonction de cellules endothéliales, ce qui laisse supposer qu'elles peuvent également avoir le même effet sur les EPCs.

Des petits essais cliniques ont démontré que le nombre de cellules CD34⁺/VEGFR2⁺ circulantes est réduit de 50 % avec une altération fonctionnelle chez les patients souffrant des maladies des artères coronariennes.^{88, 131} La réduction du nombre d'EPCs circulantes par les facteurs de risque peut avoir différentes causes, comme l'épuisement du contingent des cellules progénitrices dans la moelle osseuse, la réduction de mobilisation, de survie ou de différenciation. L'interférence de facteurs de risque avec la protection vasculaire médiée par les EPCs peuvent avoir des effets délétères sur le processus de régénération initiant le développement de lésions athérosclérotiques.

1.9.1 L'hypertension

La pression sanguine systolique corrèle négativement avec le nombre de cellules CD133⁺ et CD34⁺/VEGFR2⁺.¹³¹ L'Angiotensine II accélère l'initiation de la sénescence d'EPCs par une augmentation du stress oxydatif conduisant à une diminution de la capacité proliférative des EPCs.¹⁴¹ Le traitement avec le valsartan (antagoniste des récepteurs de type I de l'angiotensine II) ou le ramipril (inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'Angiotensine I) peut neutraliser ces effets négatifs et augmenter les niveaux d'EPCs.^{140, 141}

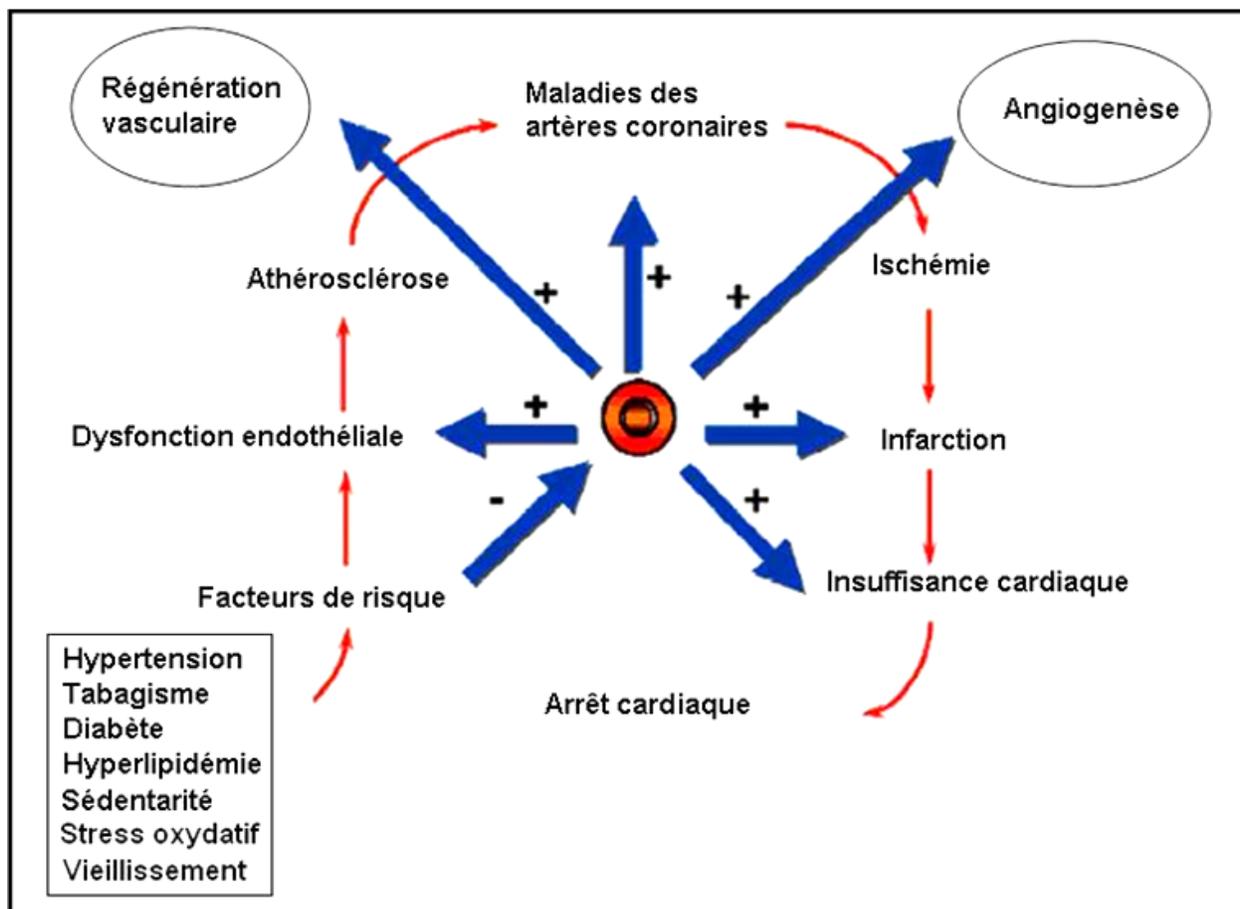


Figure 1.7 : Implication des EPCs dans les maladies cardiovasculaires. La progression des maladies des artères coronaires peut conduire à l'ischémie et/ou à l'infarctus du myocarde après la rupture de la plaque. Dans la majorité des cas, une dilatation ventriculaire et une insuffisance cardiaque congestive s'en suivent, ce qui pourra conduire à un arrêt total du cœur. Les cellules endothéliales progénitrices contribuent à la régénération vasculaire dans la dysfonction endothéliale, et sont utilisées dans l'angiogenèse thérapeutique après l'insuffisance cardiaque et l'infarctus du myocarde. Le nombre et la fonctionnalité des EPCs sont affectés par les facteurs de risques cardiovasculaires qui sont des agents initiateurs des lésions athérosclérotiques. Adapté de Werner et al. J. Cell. Mol. Med. 2006;10(2):321.

1.9.2 Le diabète

Des études cliniques et expérimentales ont décrit les effets délétères du diabète sur le nombre et la fonction des EPCs ^{133, 134} Dans le diabète du type II, la prolifération des EPCs est réduite, l'adhésion est altérée, et la capacité des EPCs à former des tubes *in vitro* est abolie. L'hyperglycémie est supposé réduire la fonction des EPCs en affectant la production du NO et l'activité de la MMP-9 ce qui explique la corrélation négative entre les niveaux de cellules progénitrices et le taux de glycémie.¹³² Cependant, le PIGF est capable d'augmenter la différenciation des EPCs à partir de la moelle osseuse tandis que les glitazones sont capables

d'influencer positivement la biologie des EPCs chez les diabétiques.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹ De plus, l'administration d'olmesartan 40 mg (antagoniste des récepteurs du type I de l'angiotensine II) exerce un effet positif sur le compte d'EPCs circulantes dans le diabète du type II.¹⁶⁰

1.9.3 L'hyperlipidémie

Plusieurs études ont investigué l'influence des lipoprotéines de faible densité-C (LDL-C) sur le nombre et la fonction des EPCs.^{155, 161-163} L'hypercholestérolémie est associée avec une réduction des taux des EPCs, une diminution de la capacité proliférative, de l'activité migratoire et de la vasculogénèse *in vitro*.¹⁵⁵ Ces effets délétères peuvent être atténués par l'administration des statines qui restaurent le nombre et la fonction des EPCs *via* une cascade dépendante de la PI3-Kinase/Akt.¹²⁴ (Akt est aussi connu sous le nom de Protéine Kinase B).

1.9.4 Le tabagisme

Le tabagisme, un facteur de risque important pour l'athérosclérose, a été associé avec une diminution dans le nombre des EPCs.¹³¹ Les fumeurs chroniques ont un niveau d'EPCs réduit qui peut être restauré dans les quatre semaines après le sevrage.¹⁶⁴ Cependant, la nicotine peut jouer un double rôle : un niveau bas de nicotine augmente les niveaux d'EPCs alors que des grandes concentrations ($> 10^6$ mol/L) de nicotine ont été associées avec des niveaux bas d'EPCs.¹⁶⁵

1.9.5 La sédentarité

L'activité physique régulière est considérée comme un facteur de prévention de la morbidité et de la mortalité cardiovasculaire. De plus, la sédentarité a été associée avec un risque accru d'incidents cardiovasculaires, y compris les maladies des artères coronariennes, la dysfonction endothéliale, et l'athérosclérose.¹⁶⁶ Des souris faisant de l'activité physique régulièrement (roue mobile) ont un nombre d'EPCs circulantes significativement plus grand que celles soumises à un mode de vie sédentaire. Cette augmentation du nombre d'EPCs a été associée avec une ré-endothélialisation accrue de la paroi vasculaire endommagée et une diminution de la prolifération intimale.¹²⁸ Chez l'humain, un accroissement du nombre d'EPCs a été observé chez des patients qui pratiquaient une activité physique déterminée au cours d'un programme de réhabilitation,¹²⁸ chez des patients coronariens¹⁶⁷ et chez des individus sains qui s'entraînaient pendant une période ≥ 30 minutes.¹⁶⁸

1.9.6 Le stress oxydatif

Le rôle du stress oxydatif dans les maladies cardiovasculaires est bien connu.^{154, 169} Le stress oxydatif est défini comme étant une situation caractérisée par une production excessive de radicaux libres ou espèces réactives oxygénées ("Reactive Oxygen Species", ROS) entraînant un endommagement oxydatif accru des structures biologiques et une prédisposition à l'athérogenèse. En plus d'induire un endommagement cellulaire, les ROS peuvent servir comme des messagers intracellulaires en affectant le statut rédox global de la cellule.¹⁷⁰⁻¹⁷² L'environnement rédox intracellulaire joue un rôle critique dans la prolifération, l'auto-renouvellement, la sénescence et le control de l'apoptose.¹⁷³⁻¹⁷⁵ Ainsi, les EPCs sont exposées aux effets néfastes du stress oxydatif au cours de la lésion vasculaire en tant que cellules résidentes de l'endothélium ou comme cellules circulantes dans le sang. De plus, de nombreuses études ont révélé que le stress oxydatif joue un rôle crucial dans la mobilisation et le fonctionnement des EPCs tant dans de modèles expérimentaux animaux^{176, 177} qu'au niveau clinique.^{141, 178-181}

1.9.7 Le vieillissement

Le vieillissement semble affecter l'activité et le fonctionnement des EPCs.¹⁸²⁻¹⁸⁴ Une étude clinique a rapporté que des jeunes patients ayant subi un pontage coronarien et qui sont dans un état relativement stable possèdent un taux d'EPCs circulantes plus élevé que chez des patients âgés.¹⁸³ La déficience dans le nombre d'EPCs dépendante du vieillissement n'est pas reliée directement au cumul de facteurs de risque cardiovasculaire ou à une défaillance des fonctions cardiaques, mais elle peut être causée, du moins en partie, par des niveaux réduits de cytokines mobilisatrices et angiogéniques. Cette déficience, communément observée chez les sujets âgés, peut être à la base d'une néovascularisation inadéquate de tissus ischémiques et d'une ré-endothélialisation atténuée de tissus lésés.^{185, 186} Les preuves de cette hypothèse ont été fournies par l'étude d'Eldberg et coll. qui a démontré que la néovascularisation des allogreffes cardiaques chez des souris âgées a lieu exclusivement suite à une transplantation d'EPCs dérivées de jeunes animaux.¹⁸⁴ De surcroît, l'existence des maladies cardiovasculaires amplifie les effets du vieillissement sur le nombre et la fonction des EPCs.

La présence de facteurs de risque cardiovasculaire augmente la vitesse de la sénescence des EPCs même en absence d'une pathologie définie.⁸⁸ Le traitement chronique des souris déficientes en apolipoprotéine E (ApoE^{-/-}) avec des cellules progénitrices dérivées de la moelle osseuse et

provenant de jeunes souris non-athérosclérotiques atténuait la progression de l'athérosclérose chez les animaux hypercholestérolémiques.¹⁸² Ceci confirme la théorie que la déplétion progressive des EPCs avec l'âge participe au développement de l'athérosclérose surtout en présence de facteurs de risque tels que l'hypercholestérolémie.

La diminution de la mobilisation des cellules progénitrices avec l'âge peut être causée par une déficience de cellules stromales de la niche et dans la production de chémokines et de cytokines angiogéniques. En effet, la production du VEGF et du NO diminue avec le vieillissement^{97, 183, 187-190} et il est bien connu que ces deux facteurs exercent des actions synergiques dans la mobilisation, la migration, la prolifération et la survie de cellules endothéliales.^{97, 189}

1.9.8 Autres facteurs de risque

D'autres facteurs de risque cardiovasculaire telles que l'homocystéine,¹⁹¹ et la CRP^{147, 192} ont été associés avec une diminution de nombre et une altération fonctionnelle d'EPCs. La CRP est un marqueur important de l'inflammation et est associée avec la dysfonction endothéliale et l'athérosclérose. Lorsque les EPCs sont incubées avec la CRP en culture, leur nombre est significativement réduit et les marqueurs de surface endothéliaux (lectine, VE-Cadhérine) disparaissaient.¹⁴⁷ L'angiogenèse est significativement abolie en présence du CRP, *in vitro*, et restaurée par un traitement avec le rosiglitazone, ligand du PPAR γ . Par ailleurs, l'absence des agents vasculo-protecteurs peut avoir un impact négatif sur les niveaux d'EPCs. Par exemple, une déficience en œstrogène après l'ovariectomie est associée avec une baisse de niveaux d'EPCs et une altération du processus de réparation endothéliale.¹³⁰

L'altération du nombre et des propriétés des EPCs observés dans le vieillissement et les maladies cardiovasculaires peut être causée par une combinaison de facteurs. L'exposition chronique à des facteurs de risque et la présence concomitante de maladies cardiovasculaires aggravent la dysfonction endothéliale, ce qui requiert un remplacement continu de cellules endothéliales endommagées. Ceci peut mener à un épuisement du stock de cellules progénitrices disponibles dans la moelle osseuse qui est exacerbé par une sénescence et une apoptose accélérées de cellules restantes.^{88 97, 193} En outre, une diminution de la biodisponibilité de signaux de mobilisation, de recrutement et de différenciation/survie peut réduire la capacité des EPCs à réparer les tissus lésés. Paradoxalement, l'altération fonctionnelle des EPCs par les maladies

cardiovasculaires et le vieillissement peuvent restreindre leur potentiel thérapeutique chez les patients qui en ont principalement besoin.

1.10 Implication des EPCs dans l'homéostasie vasculaire

Les cellules endothéliales font partie intégrale de la paroi vasculaire intacte en constituant une interface entre le sang et les tissus abritant les vaisseaux. De plus, ces cellules sont intimement impliquées dans le processus de l'angiogenèse, de l'inflammation et de la thrombose.¹⁹⁴ En l'occurrence, il est bien évident qu'une dysfonction ou un endommagement endothélial soit à l'origine des maladies cardiovasculaires majeures.¹⁹⁵ Dans les conditions physiologiques, l'endothélium vasculaire sécrète des substances qui modulent le tonus vasculaire et protègent la paroi vasculaire contre l'infiltration des cellules inflammatoires, la formation du thrombus et la prolifération de cellules musculaires lisses.^{196, 197} Dans les conditions pathologiques, la capacité de l'endothélium à sécréter les substances vasodilatatrices et anti-thrombotiques est affaiblie tandis que la production des entités vasoconstrictrices, pro-inflammatoires et pro-thrombotiques est accrue. Ceci entraîne une altération du microenvironnement de la paroi endothéliale et la dirige vers un état thrombo-inflammatoire. Antérieurement, on pensait que l'endothélium vasculaire était une simple barrière statique mais un consensus actuel considère que l'endothélium est un organe dynamique où l'équilibre entre l'endommagement/l'apoptose et la régénération endothéliale détermine le degré d'avancement des lésions athérosclérotiques (figure 1.8).⁷⁵ Bien que les cellules endothéliales matures possèdent la capacité de se répliquer rapidement *in vitro* (jusqu'à 50 passages), on ne connaît pas beaucoup sur leur capacité de répllication *in vivo*. Alors qu'un petit pourcentage de cellules apoptotiques ou endommagées peut être remplacé par les cellules endothéliales résidentes de la paroi vasculaire et étant donné que les cellules endothéliales matures sont des cellules différenciées terminales, leur capacité de régénération endothéliale demeure cependant limitée.¹⁹⁸ Pour cela, le remplacement des cellules mortes dans les régions de grand "turn-over" nécessite la participation et le support de cellules progénitrices qui constituent un réservoir de cellules souches comme c'est le cas dans d'autres tissus. Plusieurs chercheurs ont suggéré que les EPCs circulantes issues de la moelle osseuse peuvent jouer un rôle essentiel dans la ré-endothélialisation des vaisseaux lésés, en stimulant l'angiogenèse par une sécrétion paracrine et/ou en constituant une source de cellules souches endothéliales qui circulent à travers les vaisseaux sanguins et remplacent les cellules endommagées ou apoptotiques.^{3, 52, 69, 86, 87, 135, 199-201}

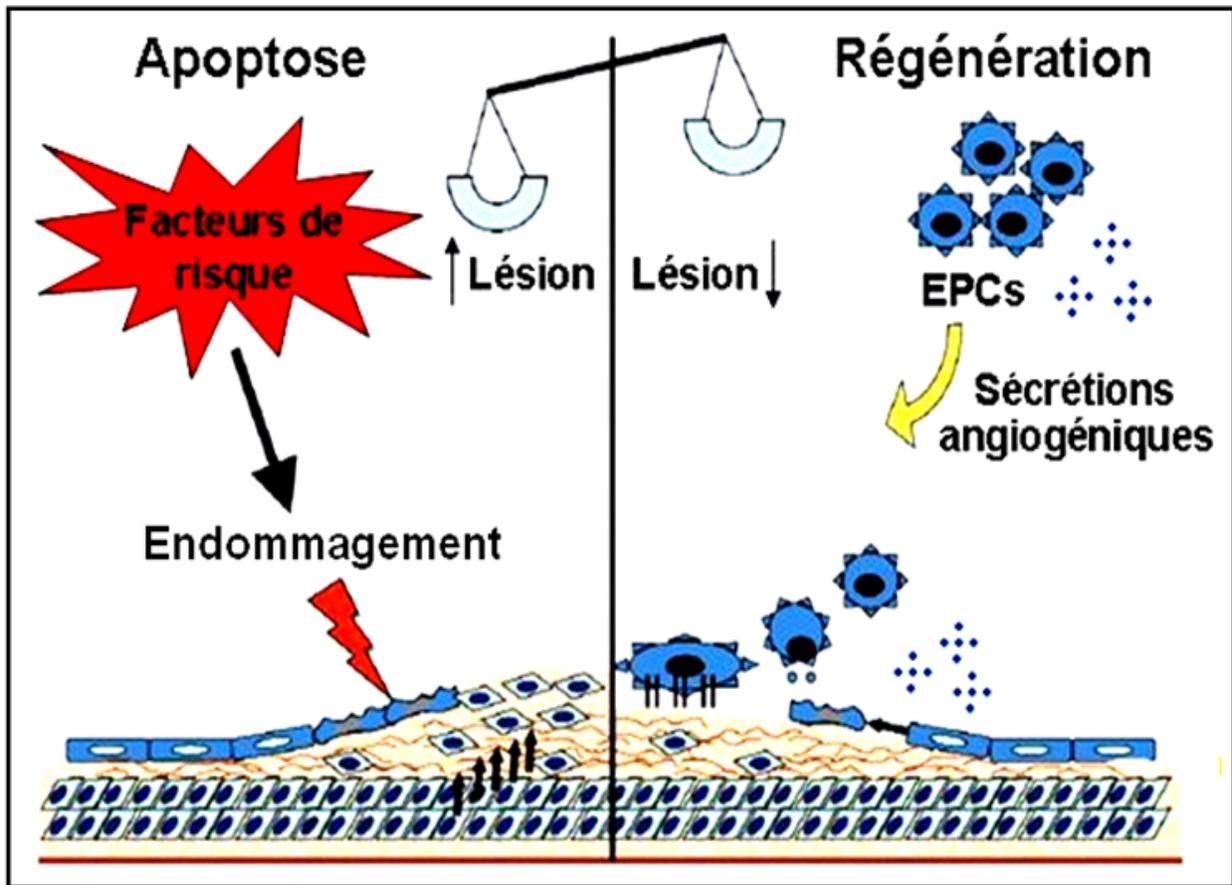


Figure 1.8 : L'apoptose et la régénération de l'endothélium. Les cellules endothéliales apoptotiques ou endommagées sont régénérées par division et migration latérale de cellules endothéliales adjacentes et par les cellules endothéliales progénitrices circulantes. Sous conditions normales, l'intégrité de l'endothélium est maintenue grâce à un équilibre dynamique entre l'apoptose et la réparation endothéliale. Cependant, le système se déséquilibre rapidement si un déséquilibre se produit en faveur de l'apoptose, initiant la formation de lésions athérosclérotiques. Adapté de Werner et al. *J. Cell. Mol. Med.* 2006;10(2):328.

La transplantation d'EPCs favorise la formation de nouveaux vaisseaux dans l'ischémie du myocarde et des membres postérieurs^{65, 66, 202} et accélère la ré-endothélialisation des vaisseaux endommagés et des prothèses vasculaires dans de nombreux modèles animaux et chez l'humain,^{73, 203} démontrant leur potentiel thérapeutique dans la réparation des tissus ischémiques et de l'endothélium endommagé. De plus, il a été démontré que les EPCs participent à l'effet bénéfique des statines^{104, 204} et des ostéogènes¹³⁰ dans les maladies cardiovasculaires. En outre, les EPCs ont été utilisées dans les manipulations génétiques comme vecteur de transport et de livraison de gènes thérapeutiques.^{203, 205, 206} En plus de leur rôle physiologique dans l'homéostasie vasculaire, de études récentes ont rapporté que les EPCs favorisent la croissance tumorale et les métastases en induisant la formation de nouveaux vaisseaux.²⁰⁷⁻²¹⁰ Cependant, il n'est pas assez clair si les EPCs

sont indispensables pour ce processus et si la contribution de la vasculogénèse (induite par les EPCs circulantes) prévaut sur l'angiogénèse "*in situ*" (induite par division d'ECs existantes).

1.10.1 Les EPCs dans la réparation endothéliale

Les EPCs jouent un rôle émergeant dans la réparation endothéliale des vaisseaux lésés. Dans des modèles animaux variés, la transplantation de cellules progénitrices dérivées de la moelle osseuse peut restituer la fonction des organes et favoriser la réparation vasculaire et la régénération tissulaire. Ainsi, la transplantation de moelle osseuse de souris de type sauvage chez des souris ApoE^{-/-} réduit la formation de lésions athérosclérotiques.¹⁸² Un greffon vasculaire en Dacron implanté chez le chien a été rapidement revêtu par des cellules CD34⁺ dérivées des HSCs.⁴⁵ Chez l'humain, la surface des dispositifs d'assistance ventriculaire a été peuplée par des HSCs du phénotype CD133⁺/VEGFR2⁺.⁴⁶ De plus, Walters et coll. ont démontré que les EPCs circulantes peuvent migrer et s'incorporer dans les parties endommagées de l'artère après l'angioplastie.¹⁰⁴ Les expériences de transplantation de moelle osseuse ont révélé que les cellules dérivées de la moelle osseuse peuvent contribuer à la ré-endothélialisation des greffons et des artères dénudées.^{73, 104}

D'autres évidences sur la contribution des EPCs dans la régénération endothéliale chez l'humain ont été fournies par des modèles de simulation assistés par ordinateur. Dans ces modèles, le maintien de l'intégrité de la monocouche endothéliale par division des ECs adjacentes et le remplacement des ECs apoptotiques par recrutement des EPCs ont été simulés.²¹¹ Dans les conditions physiologiques, l'intégrité de la paroi endothéliale peut être maintenue par une réplication des cellules adjacentes. Cependant, dans des conditions de stress oxydatif dû au vieillissement, l'endommagement de l'endothélium a été prévenu par un recrutement des EPCs. Un taux de recrutement de 5 % par année était suffisant pour retarder de manière significative l'altération de l'intégrité endothéliale. En somme avec les données expérimentales, ces simulations par ordinateur ont attribué aux EPCs un rôle capital dans l'hémostase de la paroi vasculaire.

Par ailleurs, des EPCs dérivées de la rate possèdent aussi la capacité de régénérer l'endothélium endommagé. Ainsi, l'infusion intraveineuse de cellules mononucléaires dérivées de la rate entraîne une vasodilatation dépendante de l'endothélium chez des souris athérosclérotiques, indiquant que les EPCs dérivées de la rate peuvent jouer un rôle dans la réparation de la lésion vasculaire.²¹² Aussi, les EPCs obtenues à partir des homogénats de la rate favorisent la ré-endothélialisation et réduisent la formation de la néointima après l'induction d'un endommagement

endothélial dans un modèle de lésion carotidienne chez la souris.²¹³ D'autre part, les EPCs peuvent corriger la dysfonction endothéliale en soutenant l'apoptose cellulaire induite par les facteurs de risque dans les coronaropathies.²¹⁴

L'hypothèse que les EPCs puissent contribuer à la régénération de l'endothélium vasculaire a été confirmée par d'autres types d'expériences. Une étude réalisée par Gunsilius et coll. portant sur six patients atteints de leucémie myéloïde chronique et ayant subi une greffe médullaire a montré la présence de cellules du phénotype HLA du donneur dans l'endothélium vasculaire du receveur.²¹⁵ Lin et coll. ont isolé des cellules endothéliales circulantes à partir de patients ayant subi une transplantation médullaire d'un sujet de sexe différent.⁴⁷ Ces cellules provenaient du donneur et exprimaient un phénotype endothélial (vWF, intégrine α_v , VE-Cad, internalisation de l'Ac-LDL). Par ailleurs, leurs résultats ont démontré qu'en culture, les cellules endothéliales en croissance rapide provenaient de cellules issues de la moelle osseuse, et représentaient vraisemblablement des angioblastes circulants chez l'adulte, à l'instar des angioblastes présents lors du développement embryonnaire. D'autres travaux ont montré aussi que la transplantation d'EPCs pouvait contribuer à la néoangiogenèse qui résulte en une augmentation du flux sanguin dans des modèles d'ischémie aiguë chez le rongeur : Kalka et coll. ont montré une augmentation du flux artériel par doppler dans la patte ischémique de souris chez lesquelles des EPCs issues de la culture de cellules mononucléaires ont été injectées.⁶⁵ Cependant, la transplantation de cellules souches progénitrices se heurte, au moins en théorie, à plusieurs limites : 1) le faible nombre d'EPCs présentes dans le sang, 2) la modeste incorporation de cellules souches dans les sites de néoangiogenèse (environ 10 % des cellules endothéliales vasculaires), 3) la possibilité d'incorporation de cellules souches dans d'autres sites que ceux de la néoangiogenèse, 4) la question de la pérennité de l'effet et de la sécurité du procédé. Les progrès proviendront donc de l'amélioration des techniques d'isolement et de purification en grandes quantités des cellules progénitrices des cellules endothéliales afin d'obtenir des populations aussi pures et aussi riches que possible.

De façon générale, ces études impliquent qu'en dépit de la polémique qui entoure la transplantation d'EPCs, cette réserve de précurseurs endothéliaux joue un rôle certain dans le mécanisme de réparation endogène pour préserver l'intégrité de la monocouche endothéliale en remplaçant les parties dénudées de l'artère.

1.10.2 Les EPCs dans la néovascularisation

L'accroissement du processus de néovascularisation est un outil thérapeutique pour la survie des tissus ischémiques.²¹⁶ Le rôle des EPCs dans la néovascularisation endogène des tissus ischémiques est bien connu. En effet, les tissus ischémiques sécrètent des chémokines comme le VEGF et le SDF-1 α qui induisent la mobilisation des EPCs de la moelle osseuse et favorisent leur recrutement dans les territoires ischémiques où elles peuvent participer au processus de néovascularisation.^{65, 66, 113, 120, 199, 202, 217, 218} D'autre part, l'infusion d'une variété distincte de cellules isolées de la moelle osseuse ou par culture ex-vivo a démontré la capacité d'augmenter la densité capillaire et la néovascularisation dans l'ischémie de membres postérieures et du myocarde.^{65, 68, 202, 219-225} De même, l'infusion directe de cellules mononucléaires isolées de la moelle osseuse a donné des résultats similaires. Dans des modèles animaux d'ischémie de membres postérieurs, l'injection intramusculaire de cellules mononucléaires isolées de la moelle osseuse augmente la néovascularisation, la circulation dans les membres, la tolérance à l'exercice, et l'artériogénèse.^{226, 227} Il faut noter que la culture des cellules mononucléaires dans des conditions d'hypoxie avait de meilleurs effets que celles cultivées en conditions normales, suggérant que ces cellules sont particulièrement répondantes à l'ischémie.²²⁶ Au niveau cardiaque, la transplantation des cellules de la moelle osseuse favorise l'angiogénèse et la reperfusion myocardique dans un modèle d'ischémie du myocarde chez le rat et le porc.^{200, 228-230} En clinique, l'autogreffe locale de cellules mononucléaires de la moelle osseuse dans les membres ischémiques accroissait l'index du pouls pédieux/brachial ("Ankle-Brachial Index") et atténuait la douleur au repos.²²⁰ De plus, la transplantation d'EPCs cultivées ex-vivo améliore de façon significative la réserve coronaire et la fonction du ventricule gauche chez les patients avec un infarctus aigu du myocarde.²³¹

Le potentiel angiogénique des EPCs a été aussi investigué dans un modèle animal de tumeur angiogénique. L'inhibition de la réponse au VEGF par les EPCs et les HSCs entrave l'angiogénèse et la croissance de tumeurs chez la souris.²³² En contraste, la mobilisation des EPCs par administration de G-CSF favorise l'angiogénèse tumorale.²³³ Chez l'humain, plusieurs études ont démontré la contribution des EPCs à l'angiogénèse tumorale^{234, 235} et à la rétinopathie diabétique.²³⁶

L'utilisation de différents modèles et la variation dans le nombre et dans les espèces ont restreint les méthodes de comparaison de l'efficacité de différentes populations cellulaires utilisées. Cependant, le potentiel thérapeutique semble être similaire quand des cellules progénitrices

humaines et murines isolées sont utilisées.^{49, 57, 65, 68, 113, 123, 202, 219, 232, 237, 238} Ainsi, les "early" EPCs et les late EPCs ont démontré une capacité de vasculogénèse comparable *in vivo*.^{69, 239} Ces résultats suggèrent que la propriété fonctionnelle de ces cellules à promouvoir la néovascularisation est plutôt indépendante de la lignée endothéliale progénitrice utilisée. Toutefois, les fractions fraîchement isolées de cellules CD34⁻ dérivées de la moelle osseuse ou des PBMCs ont démontré une capacité d'incorporation et une activité fonctionnelle réduites.^{49, 66} Aussi, la néovascularisation n'a pas été améliorée en présence de différents types de cellules endothéliales matures^{65, 66, 69} suggérant l'existence de mécanismes d'induction, d'activation et de différenciation préalables qui rendent les EPCs aptes à exercer leur activité fonctionnelle.

La capacité fonctionnelle des EPCs à augmenter le flot sanguin n'est pas exclusivement confinée au phénotype monocytique. La transplantation des EPCs cultivées *in vitro* à partir d'une population de cellules mononucléaires CD14⁺ ou CD14⁻ augmentent la néovascularisation au même niveau tandis que le même nombre de cellules mononucléaires fraîchement isolées et non cultivées ne possèdent aucun effet remarquable.⁶⁸ Ces résultats indiquent clairement que la culture de cellules mononucléaires CD14⁺ ou CD14⁻ est une étape indispensable pour l'expression de leurs propriétés angiogéniques.

1.10.3 Les EPCs dans l'athérosclérose

La dysfonction endothéliale est la manifestation primaire de la lésion athérosclérotique et est caractérisée par une réduction de la biodisponibilité du NO et, au niveau cellulaire, par une perte progressive des cellules endothéliales.²⁴⁰ La transfusion systémique des EPCs dans un cas d'hypercholestérolémie chez des souris transgéniques ApoE^{-/-} améliore significativement la fonction endothéliale.⁷⁵ Dans une publication-clé, Rauscher et coll. ont démontré que la transfusion systémique des cellules souches et progénitrices dérivées de jeunes souris ApoE^{-/-} non-athérosclérotiques prévient la progression de la lésion chez les souris récipiendaires ApoE^{-/-} malgré la persistance de l'hypercholestérolémie.¹⁸² Par contre, le traitement avec des cellules souches de la moelle osseuse prélevées chez des souris âgées ApoE^{-/-} athérosclérotiques ne prévient pas la progression de la lésion. Apparemment, le potentiel de réparation cellulaire endothéliale dépend de l'âge des cellules souches, ce qui souligne encore une fois, l'importance de l'influence des facteurs de risque cardiovasculaire sur la fonction de la moelle osseuse et la production des EPCs.¹⁸² En clinique, la première évidence qui a démontré que les EPCs exerçaient un effet vasculo-protecteur

chez les patients athérosclérotiques provenait d'une étude réalisée en 2005 par le groupe de Werner.²⁴¹ Dans cette étude, le nombre des EPCs CD34⁺/VEGFR2⁺ a été mesuré chez 519 patients coronariens et a été corrélé à la mortalité cardiovasculaire, au premier accident cardiovasculaire (infarctus du myocarde, hospitalisation, revascularisation et arrêt cardiovasculaire) et à la mortalité non spécifique dans une période de 12 mois. Les auteurs de cette étude ont conclu que la survie sans accident cardiovasculaire majeur augmente graduellement avec le nombre d'EPCs. Les mêmes résultats ont été reproduits avec les EPCs CD133⁺. Ces découvertes ont qualifié les EPCs comme étant un biomarqueur indépendant de la mort associée aux pathologies cardiovasculaires athérosclérotiques, du premier accident cardiovasculaire, de la revascularisation, et de l'hospitalisation.

1.10.4 Les EPCs dans la resténose

L'angioplastie coronarienne ou l'angioplastie par ballonnet est une intervention chirurgicale largement pratiquée en revascularisation pour le traitement des artères coronaires obstruées par la formation d'une plaque athéromateuse, d'un spasme ou d'un thrombus. Malgré que l'angioplastie soit rendue un outil thérapeutique de choix dans l'intervention cardiovasculaire, la resténose (de nouvelles obstructions) demeure une limite importante à la pratique de cette technique. La resténose est la conséquence directe du traumatisme artériel provoqué par l'angioplastie et se définit comme étant une perte d'au moins 50% du gain obtenu par l'angioplastie.²⁴²

L'angioplastie est souvent accompagnée par l'implantation d'un tuteur métallique ("stent") pour prévenir la rétraction élastique suite à la dilatation de l'artère. L'implantation du stent traumatise la paroi endothéliale et engendre une lésion vasculaire qui pourra s'étendre jusqu'à 90% de la surface dilatée. Cette lésion va provoquer une série d'interactions cellulaires adhésives et de réponses thrombo-inflammatoires qui induisent la prolifération de cellules musculaires lisses et l'épaississement subséquent de l'intima ou l'hyperplasie intinale.^{243, 244} Un processus de ré-endothélialisation rapide et adéquate s'avère donc essentiel pour faciliter la cicatrisation de la paroi vasculaire et prévenir le risque de thrombose et de resténose après le placement du stent. Ceci va restaurer la sécrétion du NO, de la prostacycline et des facteurs vaso-relaxants par l'endothélium et entraver la prolifération des cellules musculaires lisses.²⁴⁵

Comme il a été abordé dans les sections précédentes, la capacité de l'endothélium à se réparer dépend de la migration et la prolifération de cellules endothéliales matures avoisinant la

lésion et aussi, de la mobilisation et le recrutement des EPCs dans la région vasculaire endommagée, celles-ci prenant ensuite la forme de cellules endothéliales. Des études ont démontré que la resténose et la resténose intra-stent après l'angioplastie sont inhérentes à une insuffisance ou à une dérégulation fonctionnelle du contingent d'EPCs circulantes chez la souris²⁴⁶ et chez l'humain.^{137, 247-249} En effet, une incorporation accrue d'EPCs dérivées des PBMCs a été associée avec une ré-endothélialisation accélérée et une réduction de la resténose chez le rat,^{203, 213} et la souris.²¹³ La prévention de la resténose par les EPCs semble être favorisée par la sécrétion de médiateurs antiprolifératifs comme le NO. En fait, Kong et coll. ont démontré que la transplantation d'EPCs surexprimant eNOS favorisait la ré-endothélialisation et inhibait l'hyperplasie intimale chez le lapin.²⁰⁵ En conséquence, l'augmentation de la biodisponibilité du NO a renforcé les propriétés vasculo-protectrices de l'endothélium et a inhibé l'hyperplasie néointimale.²⁰⁵

Des études ont été faites pour identifier les facteurs susceptibles d'augmenter la mobilisation et le recrutement des EPCs vers la région endommagée, et l'inhibition de l'hyperplasie néointimale : statines,¹⁰⁴ exercice,¹²⁸ œstrogènes¹³⁰ et cytokines mobilisatrices.²⁴⁶ D'autres études ont examiné l'intérêt de stents imbibés de cellules endothéliales ou d'EPCs. L'approche actuelle la plus courante est d'enrober les stents d'anticorps anti-CD34 pour attirer les EPCs circulantes qui peuvent ensuite se différencier en cellules endothéliales. Dans cette perspective, Shirota et coll. ont rapporté que les EPCs étaient capables d'ensemencer efficacement et de former une monocouche cellulaire sur la surface de stents métalliques ou microporeux (enrobés avec du polyuréthane). Ces cellules ont été capables de migrer vers la surface de stents implantés dans un modèle expérimental de média vasculaire, proliférer et endothélialiser les surfaces lumineuses des tissus hybrides formés par les stents et la surface artérielle.⁷⁸ De plus, dans un modèle d'angioplastie chez le porc, Blindt et coll. ont confirmé la capacité des stents capteurs d'EPCs à inhiber l'hyperplasie néointimale.²⁵⁰

Le registre du «Healthy Endothelial Accelerated Lining Inhibits Neointimal Growth-First In Man» (HEALING-FIM) était la première étude clinique qui a démontré la salubrité et la faisabilité des stents enrobés d'EPCs dans le traitement de la maladie des artères coronaires.²⁵¹ Quelques années plus tard, d'autres études cliniques sont venues démontrer la salubrité et l'efficacité de l'utilisation de stents capteurs d'EPCs (stents enrobés d'anticorps monoclonaux murins anti-CD34 humains) dans la prévention de la thrombose aiguë et tardive du stent.^{76, 77}

En somme, ces études suggèrent que les stents enrobés d'EPCs ou capteurs d'EPCs peuvent constituer un nouvel outil thérapeutique pour la ré-endothélialisation de la paroi vasculaire

athérosclérotique. Ceci va résulter en une inhibition de la thrombose et de resténose intra-stent et en une reconstitution de l'architecture normale du tissu.

1.10.5 Les EPCs dans la thrombose

La rupture des plaques athéromateuses conduit à un afflux de sang dans l'intima et le cœur lipidique des plaques. Il s'ensuit une série d'événements incluant l'agrégation plaquettaire et la formation locale d'un thrombus qui peut entraver ou même bloquer le torrent circulatoire dans les artères aboutissant au syndromes coronarien aigu et/ou à l'infarctus du myocarde.²⁵² L'adhésion plaquettaire aux sites de lésion vasculaire représente la première étape dans l'athérothrombose.²⁵³ Immédiatement après l'endommagement artériel, les plaquettes circulantes roulent et adhèrent aux composantes de la matrice sous-endothéliale par l'intermédiaire de leurs récepteurs adhésifs. Cette étape est suivie par l'activation des plaquettes et le recrutement d'autres plaquettes en circulation, initiant la formation d'un agrégat plaquettaire ou thrombus au site focal de la lésion. La thrombose dans une artère coronaire implique des interactions complexes entre la matrice sous-endothéliale, l'endothélium, les plaquettes, les leucocytes, et certaines protéines plasmatiques telles que le vWF et le fibrinogène.²⁵⁴

Le rôle des EPCs dans la préservation de l'intégrité vasculaire et dans la réparation de l'endothélium endommagé est incontestable. En effet, il est bien établi que les EPCs favorisent la revascularisation des tissus ischémiques et lésés et préviennent le rejet, la thrombose et la resténose des prothèses vasculaires.^{73, 74, 78, 137, 251, 255} De plus, des études cliniques récentes ont clairement démontré que l'utilisation de stents capteurs d'EPCs limitait l'initiation de la cascade d'événements aboutissant à la thrombose aiguë, chronique ou tardive de stents implantés dans la paroi artérielle.^{76, 77} En particulier, dans un modèle de thrombose des veines profondes chez le rat, la transplantation d'EPCs semble altérer le microenvironnement de la lésion ce qui se traduit par une recanalisation et un remodelage du thrombus.²⁵⁶ Cependant, la faible proportion d'EPCs incorporées dans les capillaires après l'ischémie ne reflète pas la portée de l'effet thérapeutique observé après la thérapie cellulaire.^{65, 68, 113} Pour cela, l'efficacité de la ré-endothélialisation induite par les EPCs ne serait pas exclusivement due à l'incorporation des EPCs dans les vaisseaux néoformés mais de façon plus large à la sécrétion paracrine de substances et de médiateurs vaso-actifs. Néanmoins, un rapprochement étroit ou un bref contact cellulaire peut être requis pour que l'effet des EPCs soit pleinement réalisé. En effet, des résultats de notre laboratoire²⁵⁷ et des données provenant d'autres

laboratoires ont proposé que les EPCs sont en mesure de sécréter une panoplie de facteurs pro-angiogéniques et thrombo-résistants dans le microenvironnement immédiat de la lésion tel que VEGF, IGF-I, HGF, SDF-1 α , GM-CSF, IL-8, PGI₂ et NO.^{52, 86, 87, 109, 110, 122, 201 69, 74, 78, 257} La sécrétion de la PGI₂ et du NO au niveau du foyer de la lésion peut favoriser la néoangiogenèse, inhiber l'agrégation plaquettaire locale et limiter la thrombogénèse.^{74, 257-259}

Ainsi, les stratégies visant à inhiber ou à limiter la thrombogénicité de la surface endommagée est un élément indispensable pour une endothélialisation prompte et efficace des vaisseaux. Pour arriver à cette fin, plusieurs approches devront être employées pour prévenir l'adhésion et l'activation indésirables des plaquettes, limitant la propagation de l'agrégation plaquettaire et la formation du thrombus.

1.11 Limites et perspectives

Malgré les résultats encourageants qui entourent le potentiel thérapeutique des EPCs, plusieurs contraintes s'opposent à leur application clinique. Des stratégies doivent être élaborées pour accroître le nombre d'EPCs permettant l'obtention d'un nombre adéquat de cellules pour les applications thérapeutiques. Il est important d'élargir notre connaissance sur la biologie des EPCs, la nature des signaux mobilisateurs, migratoires et de recrutement et les mécanismes de différenciation et d'incorporation dans les tissus cibles. De même, des stratégies pour augmenter la rétention et la survie de cellules transplantées méritent d'être développées. Le moment d'administration des cellules, les conditions cliniques appropriées, le nombre cellulaire optimal et surtout la sécurité de transplantation cellulaire sont des éléments qui doivent être bien définis. De plus, il y a un besoin urgent d'uniformiser les protocoles d'isolation, de culture, et d'applications thérapeutiques. Finalement, l'ingénierie génétique des EPCs peut fournir une stratégie importante pour augmenter leur biodisponibilité (mobilisation, greffe, fonctionnement, survie) permettant ainsi leur utilisation comme outil thérapeutique important dans le traitement des maladies cardiovasculaires.

Chapitre 2

Les Plaquettes

2.1 Origine et structure des plaquettes

Les plaquettes ou thrombocytes sont des éléments figurés du sang dépourvus de noyau en suspension dans le plasma. À cause de leur petite taille ($3 \times 0.5 \mu\text{m}$), les plaquettes occupent moins de 0,3% du volume sanguin et ont été pour longtemps décrites comme des portions cytoplasmiques ou des fragments cellulaires.²⁶⁰ Les plaquettes doivent leur découverte en 1882 au chercheur italien Giulio Bizzozero qui, non seulement les a identifiées physiquement mais aussi leur a attribué un rôle dans l'hémostase et la thrombose.²⁶⁰ Depuis ce temps, la perception des plaquettes a considérablement évolué, si bien qu'à l'heure actuelle elles attirent l'attention des chercheurs dans maintes disciplines de recherche : hématologie, oncologie, immunologie, cardiologie, angiogenèse, la recherche en biomatériaux et même en psychologie.

Les plaquettes jouent un rôle essentiel dans l'hémostase vasculaire en limitant les saignements à la suite d'une rupture des vaisseaux sanguins ou d'une lésion de leur endothélium. En adhérant à l'endroit endommagé, les plaquettes forment une sorte de «colle cellulaire» qui contribue à colmater la brèche. Cependant, lorsque les plaquettes échappent aux mécanismes de régulation, la réaction plaquettaire devient démesurée et il y a un risque accru d'engendrer une oblitération partielle ou totale (thrombose) dans les vaisseaux sanguins ou les cavités cardiaques.

Originaires de la moelle osseuse, les plaquettes dérivent de la défragmentation cytoplasmique de cellules extraordinairement grosses (mesurant jusqu'à $60 \mu\text{m}$) : les mégacaryocytes, elles-mêmes dérivées des cellules souches multipotentes. Suite à leur passage dans la circulation sanguine, les plaquettes acquièrent une forme discoïdale et comptent entre 250×10^3 et $400 \times 10^3/\text{mm}^3$ chez une personne saine. Dans les conditions physiologiques, les plaquettes peuvent survivre entre cinq et neuf jours en circulation avant d'être éliminées par les macrophages au niveau du foie et de la rate. Un nombre d'entre elles est éliminé par le système réticulo-endothélial indépendamment de leur âge tandis qu'une faible proportion des plaquettes circulantes est continuellement impliquée dans le maintien de l'hémostase vasculaire.

De point de vue anatomo-fonctionnel, les plaquettes peuvent se diviser en trois compartiments essentiels soit les membranes, le cytosquelette et les granules de sécrétion. Le glycocalyx correspond au feutrage protéique et glucidique de la membrane plasmique qui tapisse l'extérieur de la cellule, participe activement aux interactions cellulaires, aux mécanismes d'activation plaquettaire et possède des propriétés antigéniques.²⁶⁰ La membrane plasmique des plaquettes est lisse, ne présentant que quelques invaginations formant un système de conduits

membranaires internes fortement anastomosés, appelé système caniculaire ouvert. Ce système caniculaire permet l'entrée des molécules circulantes dans le milieu environnant et la fusion et la sécrétion de granules plaquettaires qui viennent déverser leur contenu au cours de l'activation plaquettaire. De fait, il constitue un lieu d'échanges actifs entre les plaquettes et le milieu extérieur.

La plus importante structure intracellulaire des plaquettes est le cytosquelette car il permet d'ancrer différentes glycoprotéines membranaires et est le siège d'une multitude de réactions biochimiques impliquées dans les diverses voies de signalisation plaquettaire.²⁶¹ La forme discoïdale des plaquettes est maintenue grâce au cytosquelette plaquettaire. Au cours de l'activation plaquettaire, les plaquettes changent de forme ce qui nécessite la réorganisation du cytosquelette riche en actine et se traduit par l'acquisition d'une forme sphérique. Par la suite, des extensions membranaires (lamellopodes, filopodes) sont projetées vers la périphérie dans le but de permettre l'étalement des plaquettes lorsqu'elles adhèrent à une surface thrombogénique.

Dépourvues de noyaux, les plaquettes possèdent dans leur cytosol un nombre important de granules d'entreposage renfermant un grand nombre de molécules et de substances effectrices comme des facteurs de croissance, des protéines coagulantes, des molécules d'adhésion, des activateurs cellulaires, des cytokines, des intégrines, des molécules inflammatoires, des facteurs angiogéniques, etc (tableau 2.1, page 43). Ces granules intracellulaires sont au nombre de trois : les granules α , les granules denses et les lysosomes. La sécrétion de ces granules lors de l'activation plaquettaire contribue aux diverses interactions entre les plaquettes ou entre les plaquettes et d'autres cellules.

Que ce soit au repos ou suite à leur activation, les plaquettes interagissent avec leur environnement grâce à différentes molécules d'adhésion. Ces protéines adhésives et leurs récepteurs sont responsables de différentes fonctions physiologiques et pathologiques des plaquettes. De l'adhésion à la matrice sous-endothéliale, en passant par l'agrégation plaquettaire et les réactions thrombotiques et inflammatoires, les protéines de surface influencent et dictent les interactions adhésives et cellulaires des plaquettes ; elles sont au cœur de la fonction physiopathologique des plaquettes.²⁶⁰⁻²⁶⁵

Tableau 2.1 : Constituants essentiels des granules plaquettaires

Granules α	Granules denses	Lysosomes
P-sélectine	GPIb	CD107a (LAMP-1)
GPIb-IX-V	GPIIb/IIIa	CD107b (LAMP-2)
GPIIb/IIIa	P-sélectine	CD63 (LAMP-3)
GPIV	CD107a (LAMP-1)	Carboxypeptidase
PECAM-1	CD107b (LAMP-2)	Phosphatase acide
Stomatine	CD63 (LAMP-3)	Cathepsin D et E
PDGF, VEGF, EGF	Sérotonine, Histamine	Métalloprotéinases ?
Facteur V, Facteur VIII	ATP, ADP, GTP, GDP	
Fibronectine, PF4	Calcium, Magnésium	
Vitronectine, vWF		
Thrombospondine		
Fibrinogène		
Immunoglobulines (IgG, IgA, IgM)		

Légende : ATP (Adénosine TriPhosphate), ADP (Adénosine DiPhosphate), EGF (Facteur de Croissance Épidermique), GTP (Guanosine TriPhosphate), GDP (Guanosine Diphosphate), IgG (Immunoglobuline G), IgA (Immunoglobuline A), IgM (Immunoglobuline M), LAMP (Protéine Membranaire Associée aux Lysosomes), PDGF (Facteur de Croissance Dérivé des Plaquettes), PECAM-1 (Molécule-1 d'Adhésion Cellulaire des Plaquettes et l'Endothélium), PF4 (Facteur Plaquettaire-4), VEGF (Facteur de Croissance Vasculaire Endothélial), vWF (Facteur von Willebrand).

2.2 Molécules d'adhésion plaquettaire

Plusieurs molécules d'adhésion existent à la surface des plaquettes et sont regroupées en plusieurs catégories : protéines à quatre domaines transmembranaires, lectines, immunoglobulines, protéines apparentées au TNF et à son récepteur, protéines riches en leucine, sialomucines, éphrines, intégrines (composées de deux sous-unités, α et β) et sélectines. Toutes ces molécules ont une fonction particulière, mais certaines revêtent un rôle plus important. Notamment, la GPIa/IIa ($\alpha_2\beta_1$ ou CD49b/CD29), la GPIV (CD36) et la GPVI reconnaissent le collagène de la matrice sous-endothéliale et participent à l'adhésion des plaquettes au collagène ainsi qu'à l'activation des plaquettes par ce dernier. La GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$ ou CD41/CD61) est l'intégrine la plus abondante

dans la membrane des plaquettes et elle permet aux plaquettes d'agréger entre elles en liant le fibrinogène et participe de manière plus ou moins importante à la liaison des plaquettes aux leucocytes. La GPIb α (CD42b α) lie le vWF associé au collagène dans la matrice sous-endothéliale et est indispensable à l'adhésion des plaquettes lorsque le débit sanguin est élevé en plus de participer à l'activation plaquettaire à la thrombine. Finalement, la P-sélectine (CD62P) qui reconnaît le PSGL-1 (CD162) à la surface des leucocytes, participe activement au recrutement des leucocytes et des plaquettes au site de lésion et est le mode de liaison de prédilection entre les plaquettes et les leucocytes menant à la formation d'hétéroagrégats.

La GPIa/IIa

La GPIa/IIa ou $\alpha_2\beta_1$ est une protéine hétérodimérique de la famille des β_1 -intégrines. Elle est composée de deux sous-unités protéiques ($\alpha_2\beta_1$). Il a été démontré que la sous-unité α_2 pourrait lier le collagène.²⁶⁶ La GPIa/IIa est le principal récepteur plaquettaire à la plupart des types de collagène sous conditions statique et de flot.^{267, 268} Cependant, plusieurs autres protéines membranaires des plaquettes sont aussi impliquées dans l'adhésion des plaquettes au collagène sous conditions statiques ou de flot.^{268, 269} Notons enfin que la GPIa/IIa participe activement dans la formation de thrombus artériel à l'interface sang-vaisseau sous condition de flot suite à un endommagement artériel.²⁷⁰

La GPVI

La GPVI appartient à la famille des immunoglobulines et est considérée, avec la GPIa/IIa, comme un des récepteurs majeurs du collagène à la surface des plaquettes. La structure de GPVI consiste en deux boucles d'immunoglobulines C2 qui contiennent le domaine de liaison au collagène. Bien que plusieurs études ont indiqué que la GPVI est bien un récepteur du collagène, il a été suggéré que cette propriété est assurée *via* l'activation de la GPIa/IIa et de ce fait, la GPVI est principalement une protéine signalétique.^{269, 271}

La GPIV

La GPIV est un nom général pour une protéine qui a été aussi nommée CD36 ou GPIIb dans les plaquettes. Il existe une controverse en ce qui concerne la fonction de cette molécule dans les plaquettes bien que quelques études l'ont classée parmi les récepteurs du collagène.²⁷²⁻²⁷⁴

Le GPIb/IX/V

Le complexe plaquettaire GPIb/IX/V représente la quatrième famille de molécules d'adhésion plaquettaire en importance, soit les glycoprotéines riches en leucine. Ce complexe protéique consiste en quatre types de sous-unités transmembranaires : GPIb α (CD42b), GPIb β (CD42c), GPIX (CD42a) et GPV (CD42d). Ces différentes chaînes polypeptidiques sont exprimées dans la membrane plasmique dans un rapport moléculaire 2 : 2 : 2 : 1, respectivement. Chacune de ces unités possède une à neuf séquence(s) extracellulaire(s) riche(s) en leucine, une région transmembranaire et une courte queue cytoplasmique. Environ 25 000 copies du GPIb α , GPIb β et GPIX sont exprimées à la surface des plaquettes humaines non stimulées^{275, 276} avec approximativement la moitié de copies de la GPV.²⁷⁷

Sous conditions de flot où les forces de cisaillement sont faibles, l'interaction entre le GPIa/IIa et le collagène est suffisante pour établir l'adhésion des plaquettes. Mais, quand les forces de cisaillements sont élevées, l'adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliale est sous la dépendance de la liaison du complexe GPIb/IX/V au vWF lié aux protéines de la matrice sous-endothéliale.²⁷⁸ Le vWF est composé de plusieurs sous-unités et circule dans le sang sous une forme non reconnue par les plaquettes.²⁷⁹ Suite à une lésion endothéliale qui expose les constituants de la matrice, le vWF se lie rapidement au collagène pour interagir ensuite avec le complexe GPIb/IX/V. Cette interaction entre le vWF et le GPIb/IX/V permet aux plaquettes de s'activer pour adhérer fermement à la matrice sous-endothéliale (ce mécanisme est décrit en détail au page 62). Le complexe GPIb/IX/V exerce, entre autres, plusieurs fonctions physiologiques au niveau des plaquettes, car 1) il peut déclencher des voies de signalisation menant à l'activation plaquettaire (par activation de la GPIIb/IIIa); 2) il peut lier la thrombine et participer à l'activation plaquettaire par ce puissant agoniste; 3) il entraîne plusieurs changements morphologiques au niveau des plaquettes (réarrangement du cytosquelette, étalement, sécrétion et agrégation). De plus, le complexe GPIb/IX/V peut aussi interagir avec une β_2 -intégrine des leucocytes, soit le CD11b/CD18 (MAC-1) et favoriser le recrutement des leucocytes au sein du thrombus et aux sites de lésions vasculaires.²⁸⁰

La GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$)

L'agrégation plaquettaire est une composante principale du thrombus et du caillot sanguin et résulte d'une série coordonnée d'interactions cellulaires adhésives. Les plaquettes circulantes peuvent adhérer aux matrices sous-endothéliales exposées aux sites de lésion vasculaire, suivi par l'adhésion

plaquettaire stable à l'endothélium et le recrutement d'autres plaquettes conduisant à la formation d'un agrégat plaquettaire. Cette capacité des plaquettes d'agréger est dépendante d'une glycoprotéine de surface exprimée de manière constitutive par les plaquettes : la GPIIb/IIIa ou l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$.²⁸¹

La GPIIb/IIIa est un complexe hétérodimérique composé de deux chaînes polypeptidiques α_{IIb} (GPIIb) reliées par un pont disulfure et d'une simple chaîne polypeptidique : l'intégrine β_3 (GPIIIa). La sous-unité α_{IIb} comprend dans son domaine extracellulaire quatre sites de liaison pour des cations divalents qui témoignent de sa dépendance calcique (figure 2.1). Cette glycoprotéine est la plus abondante molécule d'adhésion à la surface des plaquettes avec environ 80 000 exemplaires, ce qui représente 1 à 3% de la teneur totale en protéines des plaquettes.²⁸²⁻²⁸⁴ La GPIIb/IIIa est un membre de la famille des intégrines reconnues pour leurs propriétés adhésives et signalétiques.²⁶¹ Cette intégrine peut lier plusieurs molécules adhésives incluant le fibrinogène, le vWF, la fibronectine et la vitronectine. De plus, elle peut aussi lier la prothrombine et la molécule d'adhésion cellulaire neuronale L1 qui peut faire un lien fonctionnel entre les plaquettes et le système de coagulation ou les cellules endothéliales.^{285, 286} Dans les plaquettes au repos, l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est en état de basse affinité ce qui permet aux plaquettes de circuler librement dans le sang qui contient les ligands solubles de la GPIIb/IIIa. La capacité de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ à lier ses ligands solubles augmente rapidement suite à l'exposition des plaquettes aux agonistes solubles ou aux protéines de la matrice endothéliale. Ces substances stimulatrices engagent des récepteurs spécifiques des membranes plaquettaires et induisent la génération de seconds messagers à l'intérieur des plaquettes qui impliquent des changements au niveau des séquences cytoplasmiques des deux sous-unités de la GPIIb/IIIa qui s'associent entre elles et avec d'autres protéines cytoplasmiques.²⁸⁷ Ces changements se traduisent par une série de signalisations intracellulaires qui sont rapidement transmises aux domaines extracellulaires de la GPIIb/IIIa, augmentant son affinité et son avidité pour les ligands adhésifs et la permutant d'un état inactif vers un état actif. Ce mode de régulation de l'activité des intégrines est nommé signalisation "intérieur-extérieur" ("inside-out signaling"), et semble être une propriété commune à toutes les intégrines.^{288, 289} La liaison du ligand à la portion extracellulaire de la GPIIb/IIIa provoque un regroupement des intégrines et des changements conformationnels dans leurs domaines cytoplasmiques, déclenchant des signaux vers l'intérieur de la cellule, un processus appelé signalisation "extérieur-intérieur" ("outside-in signaling").^{290, 291} La combinaison de regroupement et de changements conformationnels des

intégrines est requise pour que la signalisation de l'extérieur vers l'intérieur soit complètement réalisée. Vraisemblablement, les modifications des queues des intégrines par la liaison du ligand et le regroupement des intégrines induisent l'interaction de la queue avec des protéines intracellulaires, donnant naissance à des cascades signalétiques. Ces cascades influencent l'organisation du cytosquelette et modulent les fonctions adhésives et agrégantes des plaquettes.^{292, 293}

En somme, le phénomène de signalisation bidirectionnelle est au centre de l'activité fonctionnelle de la GPIIb/IIIa et des plaquettes en favorisant un nombre d'activités cellulaires responsables de la réponse plaquettaire aux différents stimuli, comme l'agrégation, la sécrétion granulaire et l'activité procoagulante.²⁹⁴

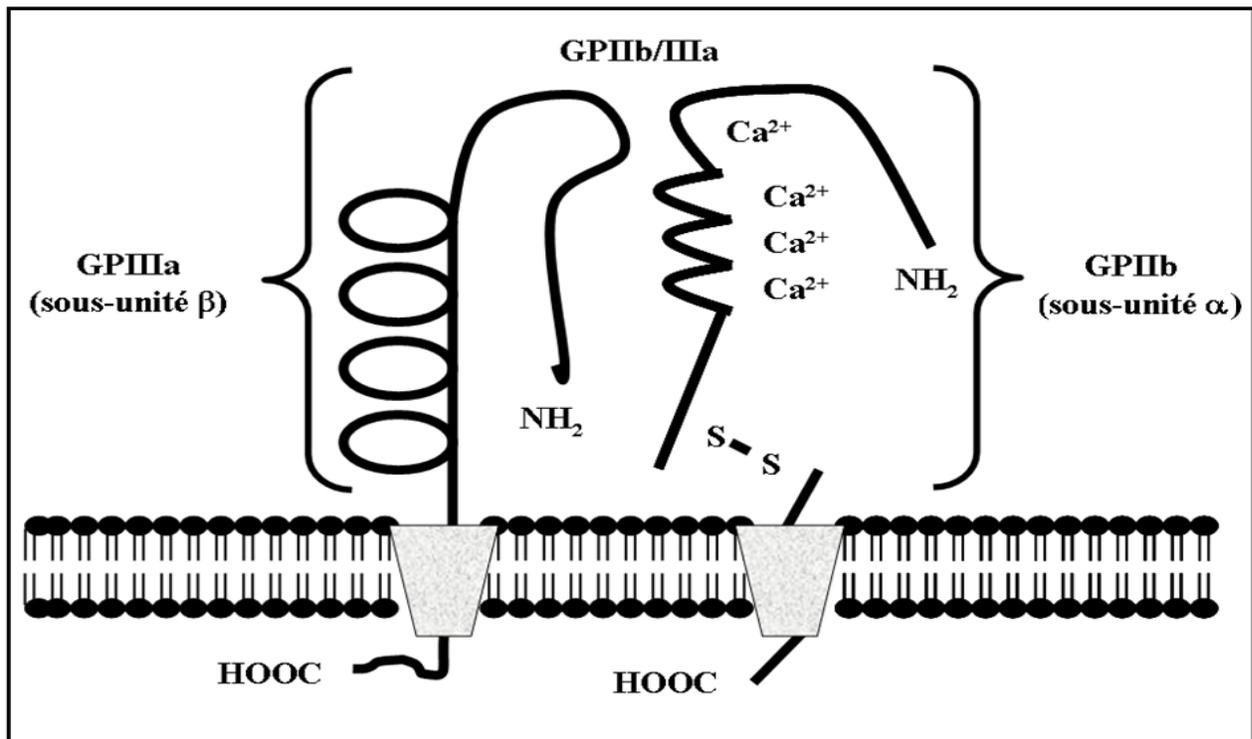


Figure 2.1 : Représentation schématique de la structure de la GPIIb/IIIa.

La P-sélectine

Les sélectines sont des molécules d'adhésion transmembranaires que l'on retrouve chez les leucocytes, les cellules endothéliales et les plaquettes activées.²⁹⁵ La famille des sélectines comprend trois membres : 1) la L-sélectine (CD62L), constitutivement exprimée à la surface des leucocytes, 2) la E-sélectine (CD62E), se retrouvant à la surface des cellules endothéliales activées par un mécanisme de synthèse *de novo*, et 3) la P-sélectine (CD62P) que l'on retrouve dans les granules α ²⁹⁶ et denses^{297, 298} des plaquettes et dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales.²⁹⁶ Les sélectines possèdent une analogie structurale : un domaine lectine sous dépendance calcique en N-terminal suivi d'un domaine ressemblant au facteur de croissance épidermique ("Epidermal Growth Factor", EGF), un nombre variable de deux à neuf répétitions de régions consensus, séquences retrouvées aussi dans les protéines régulatrices du complément. Chacune des sélectines est insérée dans la membrane par son domaine hydrophobe transmembranaire et comprend une courte queue cytoplasmique²⁹⁹ (figure 2.2).

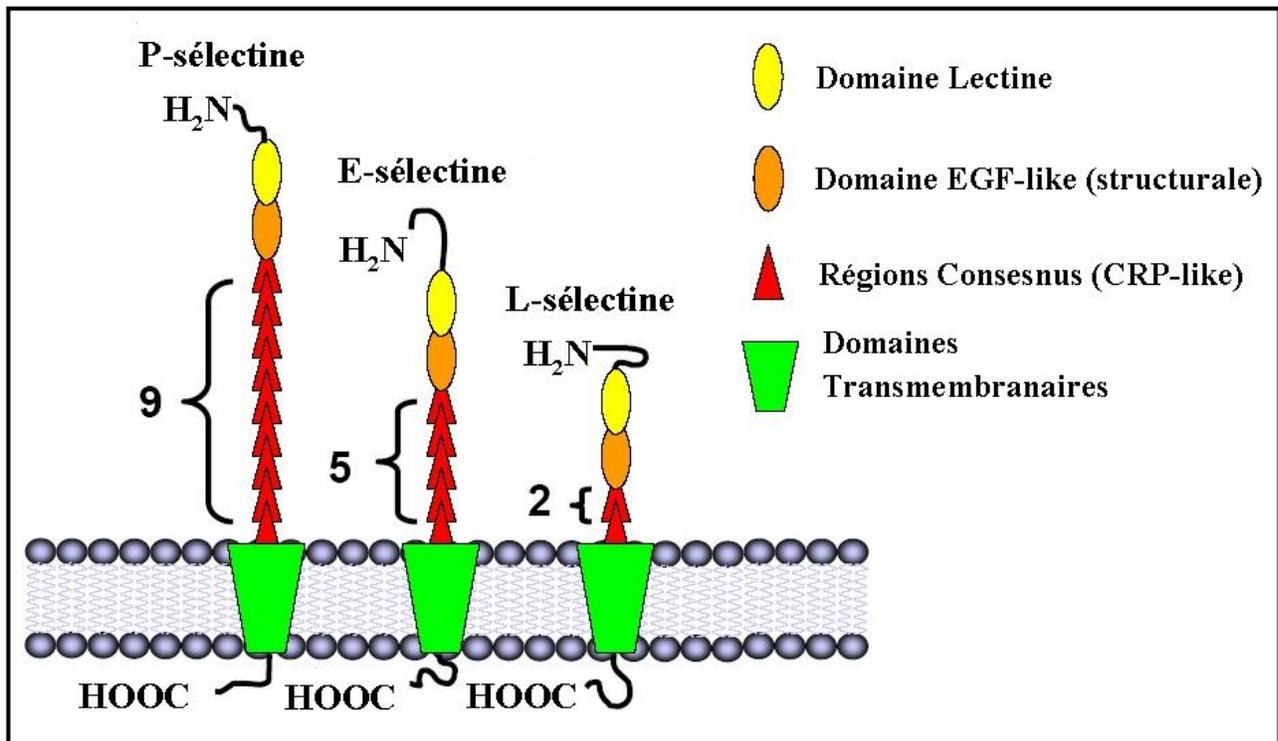


Figure 2.2 : Représentation schématique de la structure des sélectines. Légende : EGF-like (ressemblant au facteur de croissance épidermique), CRP-like (ressemblant aux protéines régulatrices du complément).

Contrairement aux deux autres sélectines, la P-sélectine est synthétisée et confinée dans les granules α des plaquettes et dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales. Suite à l'activation cellulaire, les membranes des granules α et de corps de Weibel-Palade sont rapidement fusionnées à la surface cellulaire, et la P-sélectine est redistribuée vers la membrane plasmique des plaquettes et des cellules endothéliales.^{264, 300-304} Cependant, l'expression de la P-sélectine à la surface cellulaire est de courte durée. Connaissant une distribution maximale de 10 minutes suivant la stimulation cellulaire, la concentration membranaire en P-sélectine décline de façon drastique en moins de 30 minutes, suggérant ainsi que cette molécule est rapidement mobilisée et sert d'intermédiaire aux phénomènes d'interactions plaquettaires et endothéliales avec les différentes cellules sanguines, principalement les leucocytes et les EPCs.^{305, 306} Les ligands de la P-sélectine les mieux caractérisés sont les tétrasaccharides simples (e.g sialyl-Lewis X) et certaines glycoprotéines de la famille des sialomucines (e.g PSGL-1).³⁰⁶ Bien caractérisé, le PSGL-1 est d'ailleurs le seul ligand de haute affinité connu de la P-sélectine^{307, 308} et se retrouve exprimée de manière constitutive par toutes les cellules de la lignée myéloïde.^{307, 309, 310} Cependant, d'autres protéines candidates pour la liaison avec la P-sélectine ont été suggérées.³¹¹

Au-delà de ses caractéristiques protéiques et de son cheminement cellulaire, la P-sélectine semble être au centre de la fonction plaquettaire. De par son interaction avec le PSGL-1, la P-sélectine exerce des fonctions essentielles dans l'hémostase vasculaire, influence la réaction thrombo-inflammatoire et la cascade de coagulation et participe à la réparation vasculaire en interagissant avec les EPCs au niveau des lésions vasculaires.

2.3 Rôle physiopathologique des plaquettes

La fonction principale des plaquettes est le maintien de l'intégrité des vaisseaux sanguins en empêchant toute fuite vasculaire à travers les parois lésées ou endommagées. Les glycoprotéines à la surface des plaquettes activées ou non dictent la réponse cellulaire envers le traumatisme et en présence de divers stimuli. Il s'en suit l'activation des plaquettes qui peuvent ensuite adhérer, sécréter et agréger.³¹²

Les principales molécules d'adhésion permettant aux plaquettes d'accomplir leurs fonctions sont : 1) la GPIIb/IIIa et GPVI récepteurs du collagène, 2) le complexe GPIb/IX/V, principal récepteur pour le vWF, 3) la GPIIb/IIIa qui reconnaît le fibrinogène lorsqu'elle est activée et, 4) la P-sélectine, qui, lorsque redistribuée suite à l'activation permet aux plaquettes d'interagir avec

différents types cellulaires.^{106, 109, 278, 313, 314} L'élucidation et la compréhension des mécanismes régissant les fonctions plaquettaires ont mené au développement de meilleurs traitements thérapeutiques dans la prévention des désordres thrombotiques.³¹⁵

2.3.1 Adhésion des plaquettes à l'endothélium

L'adhésion des plaquettes à l'endothélium est la première étape dans l'hémostase et la thrombogénèse. Les plaquettes jouent un rôle critique dans ce processus en étant la première ligne de défense du corps quand les vaisseaux sanguins sont endommagés. Dans les conditions physiologiques, les plaquettes circulent dans le sang dans un état inactivé et n'adhèrent pas à l'endothélium intact. Cette propriété de thrombo-résistance est liée à la nature de l'endothélium et à sa capacité de sécréter différentes substances inhibitrices de l'activité plaquettaire comme le NO, le facteur relaxant dérivé de l'endothélium ("Endothelium-Derived Relaxing Factor", EDRF), la PGI₂ et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium ("Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor", EDHF).³¹⁶

Les plaquettes possèdent la capacité de rouler sur l'endothélium activé. Ce processus est, en partie, dépendant du complexe GPIb/IX/V. Au niveau des artérioles, le mécanisme permettant aux plaquettes de rouler sur l'endothélium repose sur l'expression de la P-sélectine par les cellules endothéliales³¹⁷ et un ligand pour la P-sélectine endothéliale, encore mal identifié, à la surface des plaquettes. Cependant, la protéine la plus appropriée à remplir cette fonction est le complexe GPIb/IX/V.^{311, 318, 319} D'autre part, une étude effectuée sous conditions statiques révèle que les plaquettes activées peuvent adhérer à l'endothélium par l'intermédiaire de la GPIIb/IIIa.³²⁰

2.3.2 Adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliale

Quelques secondes après la lésion d'un vaisseau sanguin, les parois se contractent (spasme vasculaire) et les plaquettes circulantes interagissent avec les composants exposés de la matrice endothéliale ou les cellules avoisinant la lésion par l'intermédiaire de protéines adhésives. Du point de vue mécanistique, l'adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliale peut être divisée en trois étapes (figure 2.3) : la première étape consiste en la liaison des molécules de vWF libres en circulation au collagène présent à la surface sous-endothéliale. La seconde étape se distingue par l'interaction des plaquettes en circulation, *via* leur GPIb/IX/V avec les molécules de vWF immobilisées. Malgré la grande rapidité de cette interaction, la liaison entre la GPIb/IX/V et le vWF

demeure de faible affinité de sorte que les plaquettes conservent toujours une certaine mobilité sur la surface riche en collagène. Toutefois, les plaquettes démontrent une vitesse grandement réduite. La troisième et dernière étape de l'adhésion débute lors de ralentissement des plaquettes ce qui favorise la liaison entre le collagène matriciel et les molécules d'adhésion GPIa/IIa, GPIV et GPVI. Cet attachement provoque d'ailleurs l'activation des intégrines GPIa/IIa. Ceci leur confère une affinité accrue envers le collagène de la matrice. Dès lors, une quantité supplémentaire de GPIa/IIa s'associe aux fibres de collagène. Le tout occasionnant une immobilisation complète des plaquettes sur la surface vasculaire endommagée.^{267, 321, 322} Une fois les interactions d'initiation engagées, la GPIIb/IIIa acquiert sa conformation active, renforce l'adhésion plaquettaire à la matrice et recrute aussi d'autres plaquettes.³¹⁶ Aussitôt que les plaquettes adhèrent fermement à la surface endommagée, elles changent rapidement de forme et s'étalent sur la lésion en émettant des extensions membranaires (filopodes). Ce changement conformationnel et les filopodes formés facilitent l'arrivée et le recrutement d'autres plaquettes qui s'accumulent aux sites de lésion et forment un agrégat ou thrombus. En plus, des leucocytes seront aussi incorporés entre les plaquettes; initiant et propageant la réaction inflammatoire (voir la section 2.4 sur l'agrégation plaquettaire). Ce processus est modulé par les glycoprotéines plaquettaires, par la nature de la surface exposée, par les facteurs hémodynamiques locaux et par une variété de facteurs vasoactifs.³²³ La figure 2.3 schématise les étapes de l'adhésion plaquettaire à la matrice sous-endothéliale.

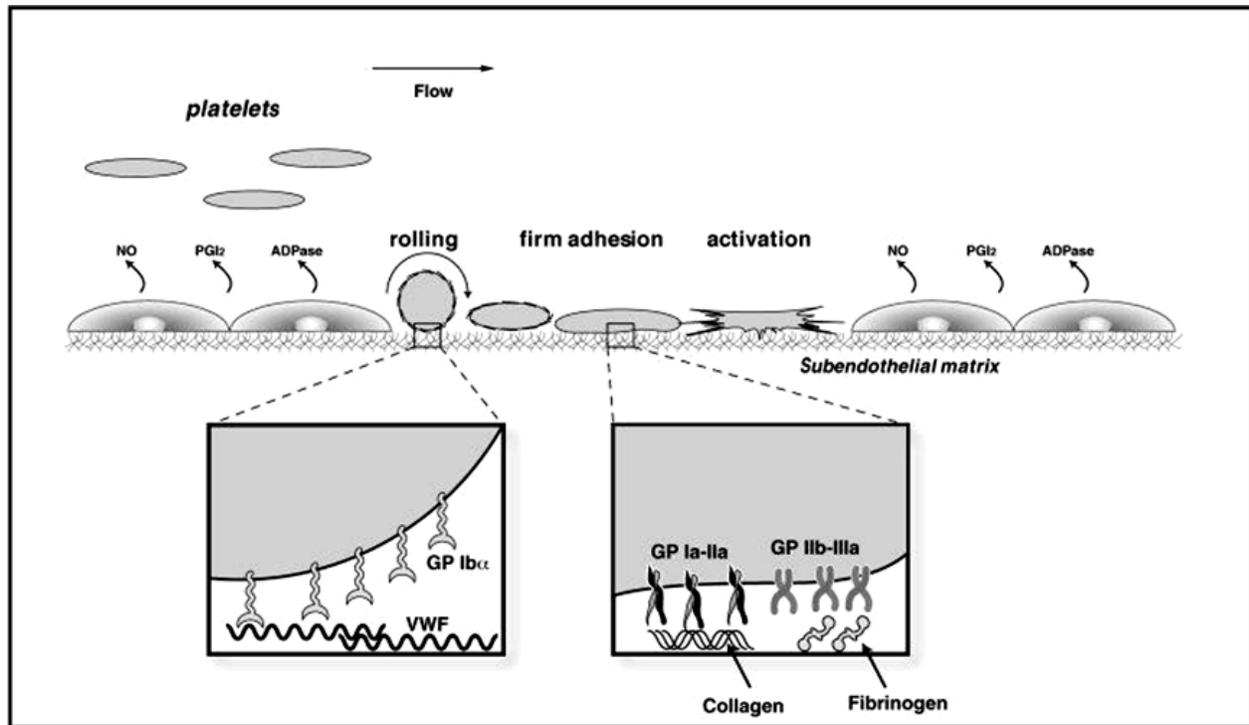


Figure 2.3 : Représentation schématique de l'adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliale. Dans les conditions physiologiques normales, l'endothélium sécrète des substances qui refoulent les plaquettes circulantes et empêchent leur adhésion. Suite à un endommagement artériel, les plaquettes vont rouler sur la matrice sous-endothéliale par l'entremise des sous-unités de la GPIb avec les molécules de vWF immobilisées tout en conservant une certaine mobilité. L'étape finale de ce processus consiste en la liaison de la GPIb/IIa et la GPIIb/IIIa plaquettaires aux fibres de collagène et de fibrinogène de la matrice entraînant une immobilisation complète des plaquettes. Tiré de: Conde Ian D. et al. Arterial Thrombosis for the Interventional Cardiologist: From Adhesion Molecules and Coagulation factors to Clinical Therapeutics. Catheterization and Cardiovascular Interventions.2003; 60:237. Légende: ADPase (Adénosine DiPhosphatase), Collagen (Collagène), Fibrinogen (Fibrinogène), firm adhesion (adhésion ferme), Flow (Flux), NO (monoxyde d'azote), PGI₂ (prostacycline), Platelets (Plaquettes), Rolling (Roulement), Subendothelial matrix (Matrice Sous-endothéliale).

2.3.3 Activation plaquettaire

L'adhésion des plaquettes sur la matrice sous-endothéliale engendre l'enclenchement d'une seconde réponse cellulaire menant à l'activation cellulaire, phénomène perçu par microscopie électronique sous forme d'un étalement ou d'un étirement plaquettaire.^{324, 325} Avant d'être sollicitées pour exercer leurs fonctions hémostatiques, les plaquettes circulent dans le sang sous forme discoïdale. Au cours de leur activation, elles acquièrent une forme plus globulaire et forment des filopodes (figure 2.4). Ces changements structuraux mettent à grande contribution le cytosquelette plaquettaire riche en actine.

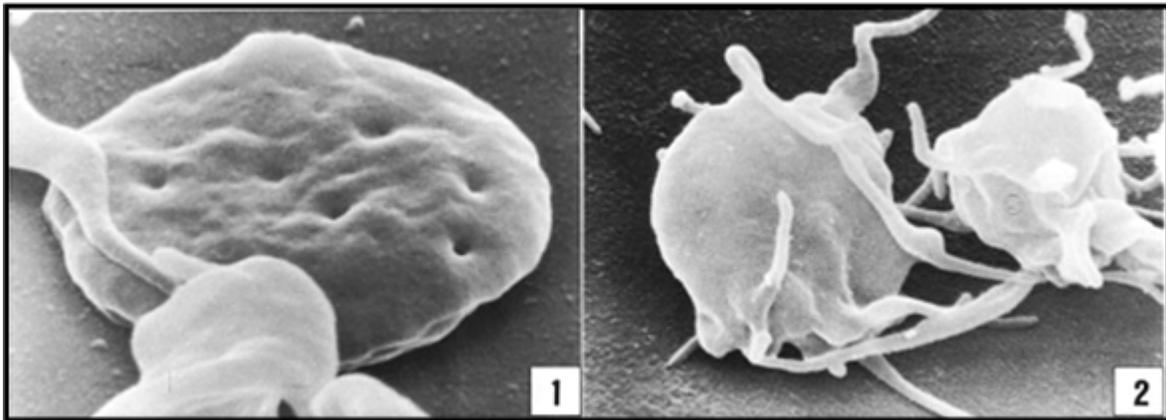


Figure 2.4 : Images par microscopie électronique à balayage d'une plaquette au repos (1) et activée (2). Tiré de: P. Zilla, R. Fasol, A. Hammerle, S. Yildiz, M. Kadletz, Günther Laufer, Gregor Wollenek, R. Seitelberger, M. Deutsch, Scanning electron microscopy of circulating platelets reveals new aspects of platelet alteration during cardiopulmonary bypass operations, *Tex. Heart Inst. J.*, 1987, 14;13–21.

Que ce soit par une altération au niveau des forces de cisaillement, par un endommagement/dysfonction endothélial ou par la présence d'agonistes, l'activation plaquettaire déclenche la triade de réponses suivantes : changement de forme, sécrétion et agrégation.³¹⁶ Ces différentes conséquences de l'activation plaquettaire dépendent d'une série de signaux intracellulaires qui interprètent les stimuli extracellulaires détectés par une panoplie de récepteurs membranaires.^{287, 326} L'intégration des différents signaux perçus par les récepteurs membranaires se traduit par la génération de seconds messagers. L'une des voies générales consiste en une hydrolyse enzymatique des phospholipides membranaires par la phospholipase C (PLC) en inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et en diacylglycérol (DAG) (figure 2.5). À l'opposé, l'activation plaquettaire peut être entravée par d'autres voies de signalisation comme celles issues de l'élévation de la concentration intracellulaire en adénosine monophosphate cyclique (AMPc) ou en guanosine monophosphate cyclique (GMPc) par l'action de l'adénylate cyclase et de la guanylate cyclase, respectivement.^{263, 280} Ces deux voies métaboliques (inhibitrices ou activatrices) dépendent de l'activation des récepteurs membranaires généralement couplés à des protéines G effectrices.³²⁷ Les seconds messagers formés par des réactions intracellulaires poursuivent le cheminement menant à l'activation complète des plaquettes. L'IP₃, issu de l'action de la PLC sur les phospholipides membranaires, entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca²⁺, ce qui a pour effet d'activer des enzymes à dépendance calcique. Le DAG favorise l'activation de la Protéine Kinase C (PKC), l'AMPc celle de la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) et le GMPc

celle de la protéine kinase dépendante du GMPc (PKG). De plus, les plaquettes peuvent synthétiser des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique (AA) suite à l'action de la phospholipase A₂ sur les phospholipides membranaires. L'AA est transformé en prostaglandines endoperoxydes (PGG₂ et PH₂) sous l'action de la cyclooxygénase. Les prostaglandines sont transformées en thromboxane A₂ (TXA₂) sous l'action de la thromboxane synthétase. La TXA₂ est un puissant vasoconstricteur et stimulateur des plaquettes ; il inhibe l'activité de l'adénylate cyclase ce qui entraîne une chute du taux d'AMPc plaquettaire, l'augmentation du calcium et par conséquent l'activation plaquettaire.³²⁸

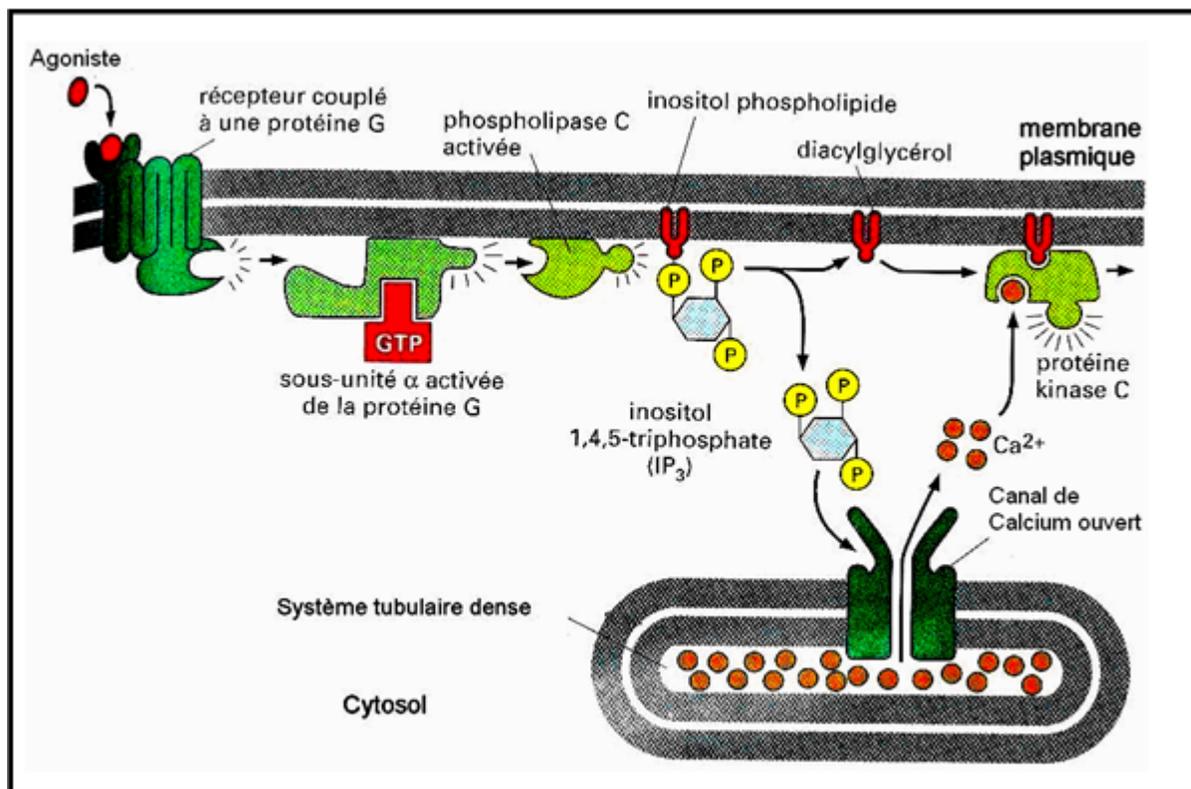


Figure 2.5 : Les voies de signalisation activées par la phospholipase C. Deux molécules messagères intracellulaires sont produites quand un inositol phospholipide est hydrolysé par la phospholipase C activée. L'inositol 1, 4,5 triphosphate (IP₃) diffuse dans le cytosol, et il libère le calcium (Ca²⁺) du réticulum endoplasmique en se liant à des canaux Ca²⁺ de la membrane du réticulum endoplasmique, et en les ouvrant. L'important gradient électrochimique de Ca²⁺ force celui-ci à affluer dans le cytosol. Le diacylglycérol reste dans la membrane plasmique et, ensemble avec le Ca²⁺, stimule l'activation de la protéine kinase C, enzyme à la face cytosolique de la membrane plasmique recrutée dans le cytosol. Adapté d'Alberts, Bray, Johnson et al. L'essentiel de la biologie cellulaire. Médecine-Sciences Flammarion. Paris; 1999 : 500-501.

2.3.4 Sécrétion plaquettaire

Les plaquettes sont des cellules sécrétrices spécialisées qui déversent le contenu de leurs granules cytoplasmiques suite à l'activation cellulaire. Différents types de granules se retrouvent dans les plaquettes : 1) les granules α sont les plus volumineux et les plus nombreux (environ 80 granules α /plaquette); elles contiennent des facteurs de croissance, des molécules d'adhésion et des protéines de coagulation, 2) les granules denses qui sont dix fois moins nombreuses et contiennent des molécules solubles et des cations divalents impliqués dans la potentialisation de l'activation des plaquettes et de leurs propriétés procoagulantes et 3) les lysosomes dans lesquels se trouvent des enzymes permettant la dégradation de différentes protéines.^{329, 330}

La sécrétion des différentes substances contenues dans les granules plaquettaires joue un rôle clé dans l'hémostase normal ainsi que dans des processus pathologiques tel que l'occlusion vasculaire thrombotique, l'athérosclérose et le remodelage vasculaire. Ces substances sont synthétisées dans les mégacaryocytes ou dans d'autres cellules et empaquetées dans les granules par des processus de transport vésiculaire. La sécrétion plaquettaire ou l'exocytose est médiée par une machinerie moléculaire homologue à celle utilisée par les cellules sécrétrices hautement spécialisées comme les neurones mais chez les plaquettes cette machinerie moléculaire semble être couplée uniquement à l'activation cellulaire par des séquences de signalisation intracellulaire. Le tableau 2.1 résume les constituants essentiels des différentes granules plaquettaires.

Les plaquettes peuvent être activées par des agents physiologiques comme la thrombine, l'adénosine diphosphate (ADP), le collagène, la TXA_2 , l'épinéphrine et le facteur d'activation plaquettaire (PAF). Ces agents interagissent avec des récepteurs membranaires spécifiques couplés à une protéine G ou par d'autres mécanismes pour induire des cascades de signalisation intracellulaire.^{331, 332} Bien que plusieurs agonistes soient capables d'induire la sécrétion des granules α et des granules denses, la sécrétion des lysosomes nécessitent des agonistes forts comme la thrombine. Quand les cellules sont activées, l' IP_3 et le DAG sont générés ce qui provoque un relargage des ions Ca^{2+} du système tubulaire dense et la concentration intracellulaire en calcium augmente de ~ 100 nM jusqu'à $2\text{-}5$ μM .³³³⁻³³⁵

Les plaquettes contiennent plusieurs isoformes de la PKC (α , β_I , β_{II} , δ , ζ , η , θ) qui peuvent être activés par le DAG et/ou le Ca^{2+} . Une fois activées, les PKC peuvent ensuite phosphoryler un ensemble de protéines intracellulaires impliquées dans le transport et la sécrétion des granules plaquettaires.³³⁶⁻³³⁹ La translocation de la P-sélectine serait sous la dépendance de différents

isoformes de la protéine kinase C (PKC α , ϵ , η et ζ) et d'un phosphoinositide (P_i(4,5)P₂), mais ne nécessite pas l'activité de la Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et ne serait pas dépendante de la capacité des filaments d'actine à se polymériser.³⁴⁰⁻³⁴⁵ Au contraire, le cytosquelette plaquettaire semble exercer une certaine contrainte au niveau de la fusion des granules.³⁴⁶ Les mécanismes plaquettaires menant à la sécrétion des granules et par le fait même à la translocation de la P-sélectine sont complexes et encore incompris. Une multitude de protéines doivent interagir entre elles et ce de façon concertée et contrôlée par plusieurs enzymes et seconds messagers. L'étude plus approfondie des voies impliquées dans le processus de sécrétion permettra certes de mieux comprendre la biologie cellulaire des plaquettes.

2.4 Agrégation plaquettaire, thrombose et coagulation

L'agrégation plaquettaire est une réaction physiologique très complexe qui permet aux plaquettes de s'agglutiner et d'interagir biochimiquement afin de résister aux forces de cisaillement et de maintenir l'hémostase vasculaire par la formation d'un agrégat plaquettaire ou thrombus aux sites de lésion vasculaire. La thrombose artérielle est la complication majeure qui peut se développer dans les syndromes coronariens aigus qui englobent, entre autres, l'angine instable et l'infarctus du myocarde et dont la composante essentielle est l'agrégation plaquettaire. Il est important de noter que la composition d'un thrombus sur une surface artérielle diffère de celle sur une surface veineuse. En effet, le thrombus retrouvé sur une surface artérielle est composé de plaquettes et de petites quantités de leucocytes (thrombus blanc) tandis que celui retrouvé sur une surface veineuse comprend des érythrocytes et de petites quantités de plaquettes (thrombus rouge).³⁴⁷ L'adhésion des plaquettes sur une surface artérielle thrombogénique induit une signalisation et une activation des plaquettes. Ensuite, la réponse hémostatique s'engagera dans une nouvelle direction, à savoir l'amplification de la réponse par le recrutement d'autres plaquettes pouvant s'associer à celles de la monocouche, déclenchant ainsi l'agrégation plaquettaire. L'exocytose du contenu granulaire des plaquettes ayant adhérees à la matrice joue un rôle clé à ce niveau en favorisant la sécrétion de divers agonistes tel que l'ADP, la sérotonine, la TXA₂ et le Ca²⁺ qui potentialisent la réponse plaquettaire.

Le point tournant de l'agrégation plaquettaire est le changement conformationnel de la GPIIb/IIIa induit par l'activation cellulaire, la rendant ainsi apte à lier le fibrinogène soluble. De plus, l'enclenchement du processus de coagulation, que ce soit par la voie intrinsèque ou

extrinsèque, engendre la conversion de la prothrombine en thrombine, enzyme reconnue comme étant l'un des agonistes les plus puissants quant au recrutement et à l'agrégation plaquettaire.³⁴⁸ Le fibrinogène lié par une GPIIb/IIIa à la surface d'une plaquette activée sera aussi lié par une autre GPIIb/IIIa sur une autre plaquette activée, formant ainsi un pont de fibrinogène entre deux plaquettes. Ce lien formé entre deux plaquettes par l'intermédiaire du fibrinogène et de la GPIIb/IIIa constitue l'étape finale de l'agrégation plaquettaire régie par des mécanismes intracellulaires dépendants de l'agoniste utilisé.^{287, 349}

2.4.1 Mécanismes moléculaires de l'agrégation plaquettaire

Comme il a été décrit précédemment, les voies intracellulaires aboutissant à l'activation de la GPIIb/IIIa et à sa capacité d'interagir avec le fibrinogène et le vWF solubles²⁶³ sont qualifiées de signalisation "inside-out". Cette signalisation semble impliquer des changements au niveau des séquences cytoplasmiques des deux sous-unités de la GPIIb/IIIa. En réponse à la thrombine, des récepteurs couplés aux protéines G sont stimulés et permettent l'activation de la PKC qui influence l'affinité de sites de liaisons extracellulaires en phosphorylant certains résidus sérines et thréonines dans la sous-unité β .³⁵⁰ Les queues cytoplasmiques des deux sous-unités s'associent entre elles et aussi avec d'autres protéines dont la présence influence grandement le maintien de l'état d'activation de la GPIIb/IIIa. Faisant suite à la signalisation "inside-out", la GPIIb/IIIa, une fois active et en liant le fibrinogène, transmet une signalisation "outside-in". Ces signaux induits par la GPIIb/IIIa jouent un rôle important dans la sécrétion, l'activité procoagulante, la réorganisation du cytosquelette, la rétraction des caillots de fibrine et dans le processus d'agrégation irréversible.³⁴⁸

Un domaine de grand intérêt est le développement d'antagonistes de la GPIIb/IIIa à des fins thérapeutiques et anti-thrombotiques.³²⁸ Au nombre de substances/médicaments développés, nous retrouvons un anticorps monoclonal murin bloquant la liaison du fibrinogène à la GPIIb/IIIa (Abciximab), des peptides se basant sur la séquence RGDS comme l'Eptifibatide (Integrilin) et le tirofiban (Aggrastat) qui sont reconnus par la GPIIb/IIIa dans la séquence de son ligand.

Des études ont souligné l'importance de la P-sélectine dans le processus de l'agrégation plaquettaire. En effet, ces études ont démontré que la P-sélectine permet d'augmenter la stabilité des agrégats plaquettaires et par le fait même mener à des agrégats plaquettaires plus importants sous conditions de flot.^{351, 352} Cette participation de la P-sélectine sous-entend la présence d'un ligand pour cette dernière à la surface des plaquettes, ligand qui pourrait être le complexe GPIb-IX-

V³¹¹ ou encore le PSGL-1.³¹⁹ Par ailleurs, la découverte des microparticules dérivées des plaquettes apportera un nouveau contributeur dans le phénomène de l'agrégation plaquettaire.³⁵³⁻³⁵⁶ Ces microparticules, ne mesurant guère plus de 0,1µm de diamètre, sont des fragments de membranes des plaquettes qui contiennent les récepteurs adhésifs GPIIb/IIIa, GPIb/IX/V et P-sélectine. La production locale de microparticules par les plaquettes lors de l'agrégation peut renforcer la stabilité du thrombus formé.

2.4.2 Interaction plaquette-leucocyte

Alors qu'une monocouche de plaquettes activées recouvre la matrice sous-endothéliale au site de la lésion vasculaire, les leucocytes circulants vont interagir avec cette nouvelle surface formée³⁵⁷ (figure 2.6). Suite à leur activation, les plaquettes mobilisent leurs granules cytoplasmiques contenant la P-sélectine qu'elles exposent à leur surface membranaire. Les leucocytes roulent sur la monocouche des plaquettes adhérentes. Ce roulement est facilité par la liaison de la P-sélectine plaquettaire avec son contre-récepteur exprimé de façon constitutive à la surface des leucocytes : le PSGL-1.^{299, 358} Toutefois, en plus de simplement médier l'interaction entre les leucocytes et les plaquettes activées, la diade formée par la P-sélectine et le PSGL-1 est impliquée dans la propagation de la réaction inflammatoire. La signalisation induite par la ligation du PSGL-1 induit la synthèse et la sécrétion d'un nombre important de médiateurs inflammatoires regroupant des cytokines,^{359, 360} des chémokines,³⁶¹ et d'anions superoxydes.³⁶² Notons aussi que la liaison entre la P-sélectine et le PSGL-1 peut induire l'expression du TF.^{363, 364}

Après le roulement, les leucocytes ralentissent et adhèrent fermement à la surface des plaquettes par différents mécanismes. Le premier mécanisme proposé est la formation de ponts de fibrinogène entre l'intégrine MAC-1 (CD11b/CD18), exprimée de façon prédominante sur les monocytes et les neutrophiles, et la GPIIb/IIIa sur la surface des plaquettes. Le second mécanisme par lequel les leucocytes peuvent s'immobiliser sur la monocouche des plaquettes est celui de l'interaction entre le MAC-1 et la GPIb/IX/V.³⁵⁷ Suite à l'adhésion ferme, les leucocytes transmigrent à travers la monocouche plaquettaire vers les tissus avoisinant le vaisseau et coordonnent la réponse hémostatique et inflammatoire.³⁵⁸

Les interactions entre les plaquettes et les leucocytes sont au centre de plusieurs maladies cardiovasculaires comme l'infarctus du myocarde, l'athérosclérose, la resténose ainsi que le diabète. Cette interaction cellulaire influence l'activité biochimique des plaquettes et des leucocytes

et, en créant un espace privilégié entre les cellules, favorise les échanges métaboliques, augmente la réponse plaquettaire lors de l'agrégation³⁶⁵ et initie et propage la réaction thrombo-inflammatoire.^{366, 367}

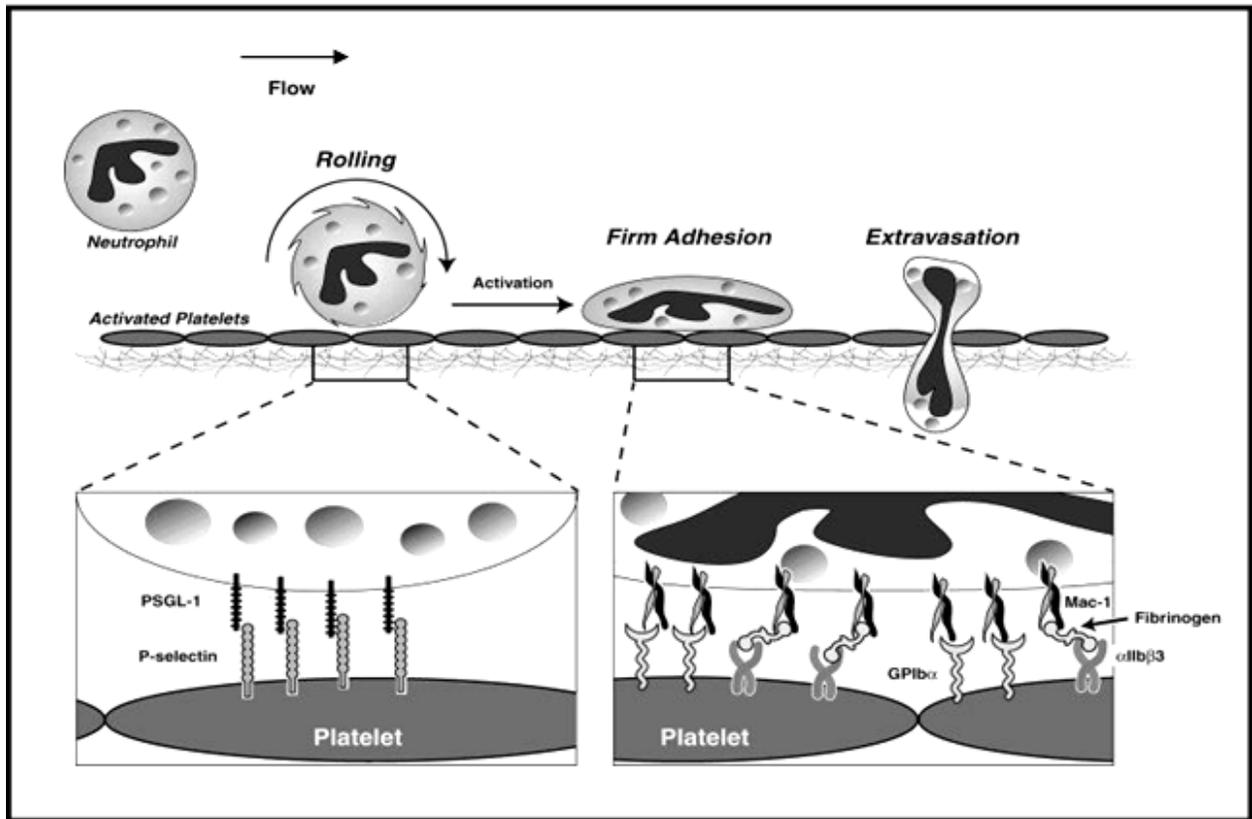


Figure 2.6 : Représentation schématique de l'interaction des leucocytes avec les plaquettes activées au site de la lésion vasculaire. Les leucocytes roulent sur la monocouche des plaquettes adhérentes *via* une interaction entre le PSGL-1 et la P-sélectine plaquettaire puis adhèrent fermement sur la monocouche plaquettaire par une interaction mettant en jeu l'intégrine MAC-1 et la GPIIb/IIIa et/ou le GPIb/IX/V plaquettaires. Cette étape est suivie par une transmigration à travers la monocouche plaquettaire vers les tissus avoisinants. Tiré de: Conde Ian D. et al. Arterial Thrombosis for the Interventional Cardiologist: From Adhesion Molecules and Coagulation factors to Clinical Therapeutics. Catheterization and Cardiovascular Interventions.2003 60:238. Légende: Activated Platelets (Plaquettes Activées), Fibrinogen (Fibrinogène), Firm Adhesion (Adhésion Ferme), Flow (Flux), Neutrophil (Neutrophile), Platelet (Plaquette), P-selectin (P-sélectine), PSGL-1(Ligand-1 Glycoprotéique de la P-Sélectine), Rolling (Roulement).

2.4.3 La cascade de coagulation

La coagulation sanguine est un processus complexe qui aboutit à la formation de caillots sanguins. C'est une partie importante de l'hémostase où la paroi endommagée d'un vaisseau sanguin est couverte d'un caillot de fibrine pour arrêter l'hémorragie. La coagulation comporte une cascade de réactions enzymatiques impliquant les facteurs de la coagulation dont plusieurs sont des protéases

comportant une sérine au niveau du site actif et soumises à des activations et à des inhibitions. L'étape finale est la transformation du fibrinogène soluble en filaments insolubles de fibrine qui renforcent le thrombus plaquettaire local et encerclent dans leurs mailles les cellules circulantes.

La fibrine est une protéine fibreuse présente dans le plasma sous une forme inactive, le fibrinogène, et sa transformation en fibrine est l'œuvre d'une enzyme la thrombine, qui dérive elle-même de la prothrombine. La prothrombine, le précurseur inactif de la thrombine, est une globuline fabriquée dans le foie sous l'action de la vitamine K. Elle est libérée dans le sang et s'y trouve normalement. On distingue deux voies susceptibles de libérer rapidement de petites quantités de la thrombine, accélérant ainsi le processus de coagulation : la voie intrinsèque (ou la voie d'activation par contact) et la voie extrinsèque. Cependant, ces deux voies sont interdépendantes et la description qui suit n'expose que quelques étapes de la cascade de coagulation.

La voie intrinsèque consiste en une cascade de réactions impliquant plusieurs facteurs de coagulation. Au moment où se produit la lésion vasculaire, le facteur Hageman (XII) inactif est activé, probablement par le contact entre le sang et le collagène des parois. Le facteur XII actif va activer le facteur XI et la série de réactions est ensuite déclenchée. À l'autre bout de la chaîne des réactions, en présence des phospholipides plaquettaires et le calcium, le facteur X activé catalyse la transformation de la prothrombine en thrombine.

Dans la voie extrinsèque, la cascade de coagulation est initiée par l'association entre le TF et le facteur VII activé (FVIIa). Le TF est une protéine membranaire présente sur la surface d'une variété de cellules extravasculaires qui normalement ne sont pas en contact avec le flot sanguin, comme les cellules musculaires lisses et les macrophages tissulaires. Par ailleurs, le TF peut être exprimé par certaines populations leucocytaires, principalement les monocytes activés^{361, 368} et les cellules endothéliales activées.^{368, 369} Un autre mécanisme par lequel le TF peut être incorporé dans le thrombus en développement repose sur les microparticules chargées du TF. Ces microparticules circulent dans le sang et expriment sur leurs surfaces le TF et plusieurs molécules d'adhésion présentes sur les monocytes et les neutrophiles, telles que le PSGL-1 et le MAC-I.^{370, 371} Dans ce modèle, les microparticules adhèrent sur les plaquettes activées *via* une interaction P-sélectine/PSGL-1, amenant le TF à proximité des autres facteurs de coagulation présents sur la surface des plaquettes activées.^{372, 373} Le complexe TF-FVIIa assure la conversion du Facteur X (FX) inactif en FX actif. De plus d'activer le FX, le complexe TF-FVIIa établit un lien fondamental entre la voie extrinsèque et la voie intrinsèque en activant le Facteur IX (FIX), composant important

de la voie intrinsèque.³⁷⁴ En aval de la cascade, les deux voies se fusionnent au niveau de la conversion de la prothrombine en thrombine. Les quantités de thrombine générées au début des phases initiales de la coagulation sont relativement petites et n'influencent probablement pas beaucoup la conversion du fibrinogène en fibrine. Or, ces quantités sont suffisantes pour activer les plaquettes présentes et les autres facteurs de coagulations (V, VIII et XI), amplifiant la génération de thrombine et propageant la réaction thrombotique.^{375, 376}

2.4.4 Propagation de la réaction thrombotique

En fonction de l'amplitude du stimulus procoagulant et de l'activité du TF, des quantités suffisantes des facteurs IXa, Xa, et de thrombine peuvent être générées pour que la coagulation se poursuive. La propagation de la réponse thrombotique se déroule une fois que la réaction est transférée à partir de la surface des cellules porteuses du TF vers la surface des plaquettes.³⁷⁷ Par conséquent, des quantités massives de thrombine sont générées à la surface des plaquettes, induisant une nouvelle vague d'activation des plaquettes qui à leur tour, vont relarguer des quantités supplémentaires de thrombine et de facteurs de coagulation contenus dans leurs granules de sécrétion. De surplús, la thrombine va amplifier sa propre synthèse en activant les facteurs de coagulation FVIII et FV.³⁷⁸

La génération de thrombine représente l'étape culminante de l'entière cascade de coagulation et peut être considérée comme la molécule centrale dans la réaction thrombotique. En plus de son rôle dans l'activation des plaquettes et de multiples enzymes et facteurs impliqués dans sa propre génération, un des rôles les plus importants de la thrombine est de cliver le fibrinogène soluble en fibrine insoluble. De plus, la thrombine transforme le Facteur XIII inactif en Facteur XIII actif qui lie ensemble les mèches de fibrine et confère au caillot une stabilité structurelle et une résistance fibrinolytique. La thrombine s'engage aussi dans plusieurs autres fonctions, comme la vasoconstriction, l'activation de l'endothélium, la prolifération des fibroblastes et d'autres cellules, et induit le chimiotactisme des monocytes. D'autre part, la thrombine peut jouer un rôle anticoagulant en se liant à une protéine de cellules endothéliales soit la thrombomoduline, activant ainsi la voie anticoagulante de la protéine C.³⁷⁸

2.4.5 La fin de la formation du thrombus

Plusieurs mécanismes interviennent dans le système de coagulation pour mettre fin à la génération perpétuelle de thrombine. Alors que ces mécanismes ne modifient pas de façon directe ou n'altèrent

pas l'incorporation des plaquettes ou des leucocytes dans le thrombus, ils agissent en altérant la machinerie qui stimule la génération de thrombine, affectant indirectement le recrutement des plaquettes dans le thrombus. Ces mécanismes régulateurs dépendent de l'action des substances plasmatiques anticoagulantes ou modulatrices de la cascade de coagulation. De tels substances incluent l'anti-thrombine ("Anti-Thrombin", AT),³⁷⁸ le cofacteur II de l'héparine ("Heparin Cofactor II"),³⁷⁹ l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire ("Tissue Factor Pathway Inhibitor", TFPI)³⁸⁰ et la protéine C activée ("Activated Protein C", APC).³⁸¹ Toutes ces substances sont des facteurs inhibiteurs d'une ou de plusieurs sérines protéinases du système de coagulation à l'exception de la TFPI qui est un inhibiteur spécifique de la tenase extrinsèque (enzyme modulatrice de la voie extrinsèque). D'autre part, l'augmentation de la masse de fibrine déposée pendant la croissance du caillot constitue une barrière mécanique qui s'oppose à l'incorporation des plaquettes et des leucocytes circulants dans le thrombus. De plus, l'endothélium intact adjacent à la lésion, exprime de façon permanente plusieurs facteurs inhibiteurs des plaquettes tels que la PGI₂, le NO et l'ADPase qui limitent la propagation du thrombus aux sites de la lésion vasculaire.

La fin de la formation du thrombus est régulée par un mécanisme multifactoriel incluant les facteurs anti-thrombotiques sécrétées par l'endothélium, les anticoagulants plasmatiques et, vraisemblablement, par la nature et la structure du thrombus lui-même.

Chapitre 3

Interaction EPC – Plaquelette

3.1 Implication des plaquettes dans la biologie des EPCs

En plus de leur implication profonde dans les processus de l'hémostase et de la thrombogénèse, les plaquettes jouent un rôle éminent dans la biologie des EPCs. En fait, les plaquettes fournissent le signal critique qui assure la migration et le recrutement des EPCs dans les tissus ischémiques et lésés.^{109-111, 122} Plus spécifiquement, les interactions des EPCs avec les plaquettes accroissent leurs propriétés fonctionnelles et induisent leur recrutement et leur différenciation en cellules endothéliales matures aux sites de lésions vasculaires.^{106, 109-111, 122}

L'importance de l'interaction des EPC-plaquette a été décrite depuis longtemps. En 1995, Dercksen et son équipe ont indiqué que les plaquettes pouvaient interagir avec les cellules CD34⁺ issues de la moelle osseuse et du sang humain et que cette interaction ait lieu principalement *via* la P-sélectine plaquettaire et le PSGL-1 des cellules CD34⁺.³⁸² Quelques années plus tard, Frenette et coll. ont suggéré que les souris déficientes en E- et P-sélectine démontraient une hématopoïèse altérée et que ces deux sélectines étaient essentielles pour la domiciliation des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse.^{383, 384} Une autre étude réalisée par Greenberg et coll. a démontré que les cellules hématopoïétiques et progénitrices pouvaient rouler sur les L-, E- et P-sélectine indiquant la présence des récepteurs pour les sélectines sur la surface de ces cellules. D'ailleurs, les auteurs ont conclu que ce roulement était plus efficace quand les cellules étaient moins différenciées.³⁸⁵ Par après, une étude a prouvé que les HSCs humaines et murines peuvent se lier aux plaquettes tout en exprimant sur leurs surfaces des microparticules dérivant des plaquettes.³⁸⁶ Ces microparticules augmentaient l'adhésion des HSCs humaines à l'endothélium et favorisaient, de façon significative, le greffement des HSCs murines après leur transplantation dans des souris irradiées. De plus, les auteurs ont aussi démontré que les EPCs dérivées du sang périphérique liaient les plaquettes activées et exprimaient sur leurs surfaces des récepteurs pour les plaquettes, soient le PSGL-1 et le MAC-I. Dans une étude récente utilisant des EPCs embryonnaires de souris, Langer et coll. ont démontré que les plaquettes stimulaient le chimiotactisme et la migration des EPCs et étaient capables de lier ces dernières en statique et sous conditions de flot.¹⁰⁸ De plus, le roulement des EPCs sur une monocouche de plaquettes immobilisées sous conditions de flot était complètement inhibé en présence des anticorps bloquants monoclonaux dirigés contre la P-sélectine plaquettaire et le PSGL-1 des EPCs, mais non pas contre la β_1 -intégrine VLA-4. Cependant, l'adhésion ferme des EPCs murines sur des plaquettes humaines immobilisées dans des conditions de flot était complètement inhibée en utilisant des anticorps

monoclonaux dirigés contre la P-sélectine, le PSGL-1 et la β_1 -intégrine VLA-4. En outre, l'incubation des EPCs avec les plaquettes induisait leur différenciation en cellules endothéliales matures.¹⁰⁸ Des résultats similaires ont été obtenus par une étude *in vitro*, réalisée par Lev et coll. sous des conditions statiques et de flots dynamiques.¹⁰⁶ Les auteurs ont noté que les EPCs isolées à partir du sang humain périphérique formaient des agrégats hétérotypiques avec les plaquettes non-activées et que ces agrégats étaient amplifiés quand les plaquettes sont activées par le collagène, l'ADP, ou le peptide activant les récepteurs de la thrombine ("Thrombin Receptor-Activating Peptide", TRAP). L'interaction EPC-plaquette a été inhibée par l'utilisation des anticorps monoclonaux bloquants dirigés contre la P-sélectine et le PSGL-1, mais non pas en utilisant des anticorps anti-GPIIb/IIIa ou anti-GPIb/IX/V. Par ailleurs, quand les EPCs étaient perfusées sur une surface de plaquettes activées, elles adhéraient rapidement ou elles roulaient pour une courte distance avant d'adhérer. De plus, les plaquettes favorisaient la formation des colonies d'EPCs adhérentes en culture.¹⁰⁶

3.2 Rôle de l'interaction EPC - plaquette dans la réparation vasculaire

Les études récentes se sont concentrées sur le rôle des plaquettes dans le recrutement, l'accumulation et la différenciation des EPCs aux sites de lésions vasculaires. Dans un modèle de lésion vasculaire *ex-vivo*, de Boer et coll. ont démontré que l'agrégat plaquettaire facilite le roulement et l'adhésion des cellules CD34⁺ sur le thrombus formé *via* l'interaction P-sélectine/PSGL-1 et que la fibrine et les plaquettes activées coopèrent pour guider les cellules souches aux sites de lésions vasculaires et favorisent leur différenciation en un phénotype endothélial.¹¹¹ L'élucidation des mécanismes cellulaires et moléculaires régissant l'interaction EPC-plaquette a été apportée par des études récentes effectuées *in vitro* et *in vivo* qui ont démontré que les plaquettes fournissent le signal nécessaire pour recruter les EPCs aux sites de lésions vasculaires. Ce signal met en jeu un système complexe qui implique la P-sélectine et la GPIIb/IIIa sur les plaquettes, le PSGL-1 et le récepteur CXCR4 sur les EPCs, et le SDF-1 α sécrété par les plaquettes activées et les cellules musculaires lisses.^{109, 387, 388} Ces éléments fonctionnent de façon concertée pour promouvoir le recrutement et l'accumulation des cellules progénitrices aux sites de rupture endothéliale.

De point de vue mécanistique, l'adhésion des EPCs aux structures de la matrice sous-endothéliale est initiée par l'interaction des plaquettes avec les composantes de la paroi des

vaisseaux ou les cellules de la monocouche avoisinant la lésion par l'intermédiaire de leurs protéines adhésives. L'adhésion primaire des plaquettes facilite l'arrivée et le recrutement d'autres plaquettes qui s'accumulent aux sites de la lésion et initient la formation d'un thrombus primaire au site focal de la lésion. De même, les plaquettes adhérentes vont recruter les EPCs circulantes et les leucocytes qui seront incorporés entre les plaquettes; soutenant et propageant la réponse plaquettaire. Par souci de simplification et puisque l'interaction leucocyte-plaquette a été envisagée en détail dans le chapitre précédent, je me limiterai dans ce paragraphe à la description de l'interaction EPC-plaquette aux sites de lésion vasculaire.

Dans un premier temps, les EPCs circulantes roulent et s'arrêtent sur le mince film de plaquettes adhérentes sur la matrice sous-endothéliale. Ce roulement des EPCs sur les plaquettes est similaire au roulement des leucocytes sur les plaquettes adhérentes sur la matrice sous-endothéliale, mettant en jeu la P-sélectine plaquettaire et le PSGL-1 des EPCs. Après le roulement, les EPCs ralentissent et adhèrent fermement à la surface des plaquettes par un mécanisme dépendant des intégrines. Or, ce processus est beaucoup plus complexe pour être décrit d'une telle simple façon. En effet, ce processus est conditionné et contrôlé d'une part par l'interaction des EPCs avec les plaquettes et les cellules endothéliales, et d'autre part par le microenvironnement chimiotactique et activateur sécrété par les cellules sanguines, les cellules vasculaires et les cellules musculaires lisses. L'étape finale de ce processus est la différenciation des EPCs liées en un phénotype endothélial mature. Ceci aura l'avantage d'accélérer le processus de réparation vasculaire et de limiter la formation d'un thrombus occlusif. La figure 3.1 schématise les principales étapes résumant le recrutement des EPCs au site de la lésion vasculaire.

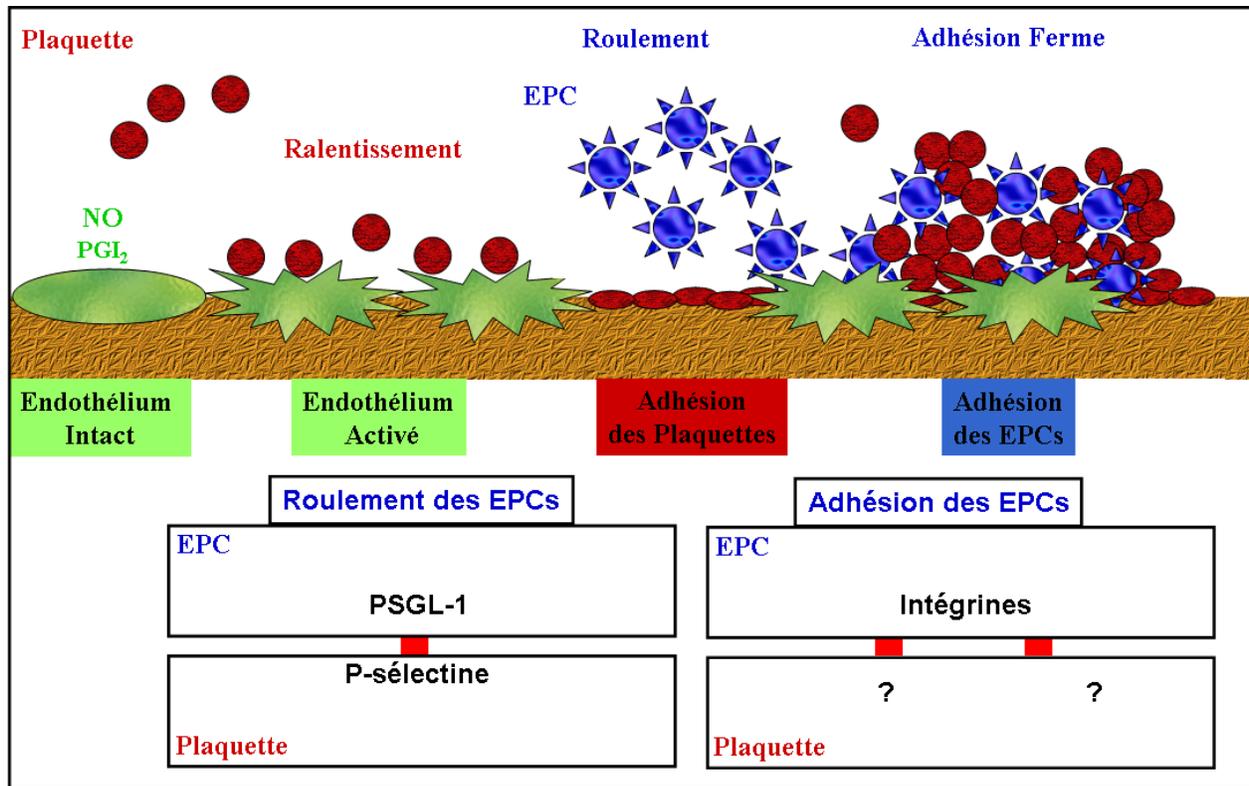


Figure 3.1 : Rôle des plaquettes dans le recrutement des EPCs au site de la lésion vasculaire. Suite à l'endommagement endothélial, les plaquettes ralentissent sur l'endothélium activé et adhèrent aux structures de la matrice sous-endothéliale. Les EPCs circulantes roulent sur la monocouche des plaquettes activées *via* la liaison de la P-sélectine plaquettaire avec le PSGL-1 des EPCs. Le roulement des EPCs est suivie par l'immobilisation complète et l'adhésion ferme médiées par les intégrines sur la surface des EPCs et des récepteurs, encore indéterminés sur la surface des plaquettes. L'étape finale de ce processus est la différenciation des EPCs liées en un phénotype endothélial mature.

3.3 Mécanismes de recrutement des EPCs dans la paroi vasculaire

L'expression de la P-sélectine à la surface des plaquettes est impliquée dans l'accumulation des leucocytes matures, incluant les monocytes, les neutrophiles et les lymphocytes.^{389, 390} De même, la P-sélectine plaquettaire joue un rôle central dans le recrutement des EPCs aux sites de lésions vasculaires. Le blocage ou la délétion de la P-sélectine ou de son ligand de haute affinité, le PSGL-1, atténue significativement l'accumulation des EPCs à la surface des plaquettes adhérentes ou agrégées *in vitro*^{106, 108} et *in vivo*.¹⁰⁹ Aussi, l'accumulation des EPCs au niveau de la lésion vasculaire a été significativement réduite chez des souris déficientes en P-sélectine.¹⁰⁹

Bien que la P-sélectine soit responsable du ralentissement et du roulement des EPCs sur la monocouche plaquettaire, l'adhésion ferme subséquente des EPCs est régulée par les chémokines. En particulier, la chémokine SDF-1 α , qui joue un rôle critique dans la mobilisation et le

recrutement des EPCs à partir de la moelle osseuse,⁹¹ est requise pour l'adhésion ferme des EPCs sous conditions de flot *in vitro*.³⁹¹ Récemment, le SDF-1 α a été impliqué dans plusieurs processus physiopathologiques tel que l'hématopoïèse, l'angiogenèse, la réparation vasculaire, l'athérosclérose, la métastase, le remodelage vasculaire et l'hyperplasie intinale en induisant le recrutement des EPCs dans la paroi vasculaire.^{110, 392, 393} Dans le passé, les cellules musculaires lisses ont été considérées comme la source majeure de SDF-1 α sécrété dans les lésions athérosclérotiques³⁹⁴ et après la lésion vasculaire.^{393, 395} Aujourd'hui, d'autres sources importantes de SDF-1 α sécrété aux sites de lésions vasculaires ont été identifiées. À côté des cellules musculaires lisses, les plaquettes et leurs précurseurs, les mégacaryocytes sécrètent abondamment du SDF-1 α . Quand les plaquettes sont activées, elles sécrètent le SDF-1 α emmagasiné dans leurs granules internes qui stimule la migration d'EPCs *in vitro*.¹⁰⁹ Ainsi, en plus de SDF-1 α exprimé par les cellules musculaires lisses, le recrutement des plaquettes durant la thrombose artérielle est associé avec une augmentation considérable et rapide de la concentration du SDF-1 α présent dans le microenvironnement des sites de lésions vasculaires.¹⁰⁹

Le SDF-1 α largué par les plaquettes et les cellules musculaires lisses semble agir d'une manière séquentielle³⁹³ (figure 3.2). En effet, dans les 30 minutes après la lésion vasculaire, le thrombus plaquettaire représente la source majeure du SDF-1 α aux sites de lésions vasculaires, tandis que quatre heures après la lésion vasculaire, les cellules musculaires lisses entrent en action et participent à la sécrétion du SDF-1 α .^{109, 393} L'inhibition de SDF-1 α atténue de façon significative l'adhésion des EPCs au thrombus en croissance dans une période de 5 à 30 minutes après la lésion.¹⁰⁹ Alors, il s'avère parfaitement logique de présumer qu'initialement, les plaquettes constituent la source de courte durée de SDF-1 α qui dirige les EPCs aux sites d'endommagement vasculaire. Par contre, les cellules musculaires lisses semblent être la source de longue durée du SDF-1 α qui s'établit dans les jours et les semaines qui suivent la lésion vasculaire pour assurer le déroulement du processus de remodelage et de la réparation vasculaire.^{392, 393}

De plus de son rôle dans la formation du thrombus artériel, l'agrégation plaquettaire dépendante de l'intégrine GPIIb/IIIa joue un rôle fondamental dans le recrutement des EPCs aux sites de lésions vasculaires. La GPIIb/IIIa peut favoriser l'adhésion des EPCs au thrombus néoformé en établissant un lien direct entre les plaquettes et les EPCs par la formation d'un pont adhésif qui ressemble à celui qui s'établit dans l'interaction entre les plaquettes activées et les cellules endothéliales.³²⁰ En outre, l'agrégation plaquettaire dépendante de la GPIIb/IIIa peut

participer de façon indirecte dans le processus d'interaction EPC-plaquette en formant une maille dans laquelle les EPCs seront piégées. Par ailleurs, l'engagement de la GPIIb/IIIa durant l'agrégation plaquettaire peut stimuler le largage du SDF-1 α par les plaquettes.²⁵⁹ Ainsi, les différentes voies dépendantes de la GPIIb/IIIa semblent agir de façon séquentielle pour promouvoir le recrutement des EPCs aux sites de lésion vasculaires.

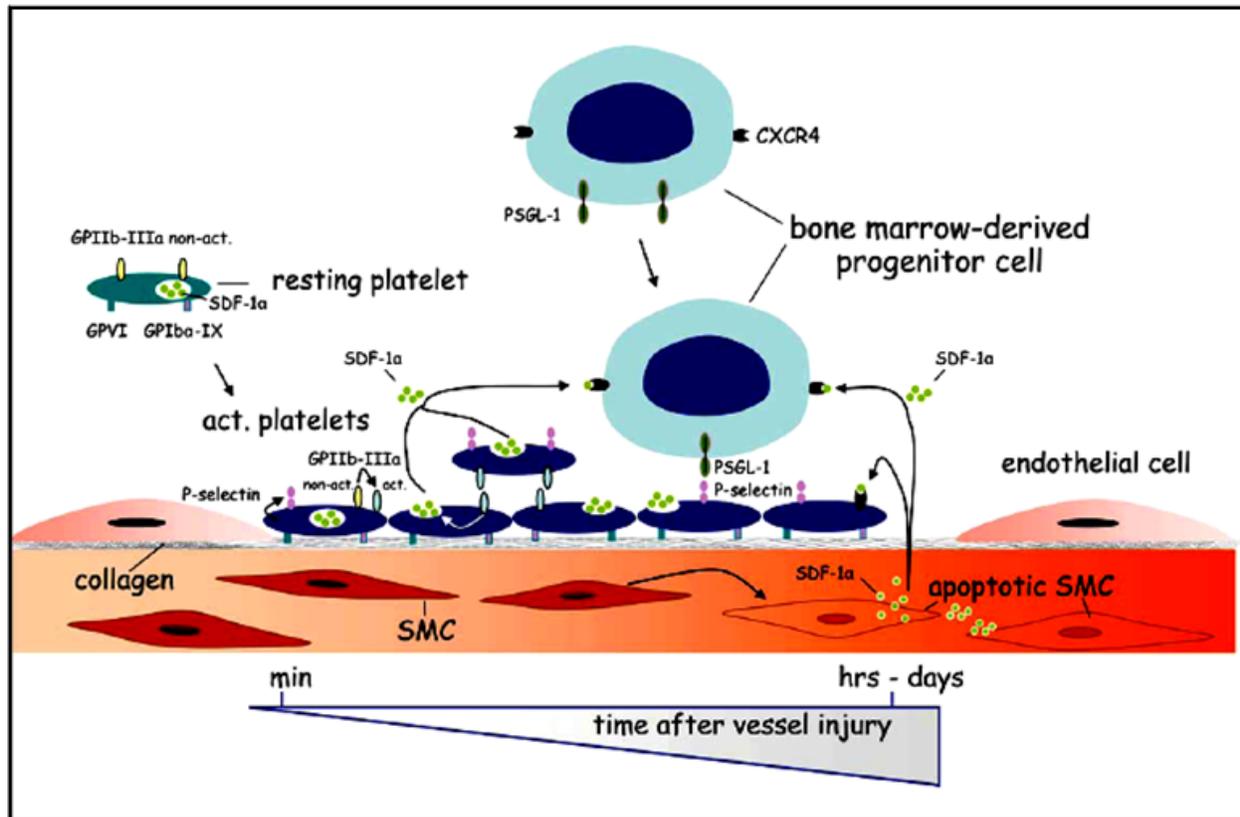


Figure 3.2 : Mécanismes d'interaction des EPCs avec les plaquettes au site de la lésion vasculaire. Quelques minutes après la lésion vasculaire, une monocouche de plaquettes adhérentes est formée sur la matrice sous-endothéliale par un processus impliquant la GPVI et le GPIb α . Les plaquettes adhérentes s'activent, expriment la P-sélectine, et sécrètent le SDF-1 α après l'engagement de l'intégrine GPIIb/IIIa, initiant le recrutement des EPCs. Dans les heures et les jours qui suivent la lésion vasculaire, les cellules musculaires lisses prennent la relève et deviennent la source principale du SDF-1 α . Ainsi, le SDF-1 α sécrété en premier temps par les plaquettes et ensuite par les cellules musculaires lisses agit de façon concertée pour induire le recrutement des EPCs aux sites d'endommagement artériel. Tiré de Massberg et al. Platelets secrete stromal cell-derived factor 1 α and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi *in vivo*. JEM; 203:1229. Légende: act. (activée), act. platelets (plaquettes activées), apoptotic SMC (Cellules Musculaires Lisses apoptotiques), bone marrow-derived progenitor cells (cellules progénitrices dérivées de la moelle osseuse), collagen (collagène), endothelial cells (cellules endothéliales), GPIIb-IIIa non-act (GPIIb-IIIa non-activée), hrs-days (heures-jours), min. (minutes), non-act. (non-activé), SDF-1 α (Facteur 1- α Dérivé de Cellules Stromales), SMC (Cellule Musculaire Lisse), resting platelets (plaquettes au repos), time after vessel injury (temps après la lésion de vaisseau), P-selectin (P-sélectine), PSGL-1 (Ligand-1 Glycoprotéique de la P-sélectine).

En somme, les plaquettes sont profondément impliquées dans la biologie et le fonctionnement des EPCs. L'interaction EPC–plaquette, médiée essentiellement par l'interaction P-sélectine/PSGL-1, représente un mécanisme central dans le recrutement et la différenciation des EPCs au niveau des sites de lésions vasculaires et accorde aux plaquettes un rôle certain dans le phénomène de l'endothélisation et la régénération tissulaire.

3.4 Mise en perspective

Dans les conditions normales, les EPCs circulent dans le flot sanguin dans un mode de "surveillance" et établissent des contacts brefs et transitoires avec l'endothélium vasculaire. Le besoin d'un renouvellement ou d'une réparation tissulaire est communiqué aux EPCs circulantes par les plaquettes adhérentes/agrégées. En effet, les plaquettes adhérentes constituent une sorte d'échafaudage pour le roulement primaire et l'adhésion ferme des EPCs sur une surface thrombogène sous flot dynamique, *in vitro*, ou sur le thrombus en formation, *in vivo*. Le recrutement des EPCs dépendant des plaquettes est essentiel pour la réparation vasculaire, la cicatrisation locale et la régénération tissulaire aux sites de lésions vasculaires. Toutefois, ce processus de réparation vasculaire devrait être prompt et efficace pour contrecarrer les effets indésirables émanant de la formation du thrombus plaquettaire après la lésion vasculaire. Ainsi, la mise en place d'un système de contrôle de la fonction plaquettaire et subséquentement de l'étendue de la thrombogénèse par les EPCs mêmes, s'avère de très grande importance lors de la réparation vasculaire.

Hypothèse et objectifs

Les EPCs sont des précurseurs endothéliaux qui jouent un rôle important dans la réparation endothéliale et la vascularisation post-natale. Les EPCs ont été localisées dans le cordon ombilical, dans la moelle osseuse, dans le sang périphérique et dans certains tissus régénératoires. Les PBMCs regroupent plusieurs populations de cellules qui possèdent la capacité de se différencier, *in vitro*, en EPCs. En particulier, les cellules CD14⁺/CD34⁻ qui représentent la fraction la plus commune et la plus abondante des cellules mononucléaires, constituent une source possible de précurseurs endothéliaux.

En plus de leur rôle capital dans la formation du thrombus, il a été démontré que les plaquettes jouent un rôle important dans la biologie des EPCs. En effet, les plaquettes induisent le chimiotactisme, le recrutement et la différenciation des EPCs aux sites de lésions vasculaires et peuvent influencer leur fonctionnement pendant la réparation endothéliale. Par ailleurs, un grand nombre de travaux a été consacré à l'étude des effets des plaquettes sur la fonction des EPCs mais jusqu'à présent, aucune étude ne s'est intéressée à l'effet des EPCs sur la fonction plaquettaire. Ceci pourra avoir des conséquences majeures sur le déroulement de la réaction thrombotique lors de la lésion vasculaire.

Hypothèse : Étant donné que les plaquettes influencent les fonctions des EPCs, nous avons donc posé l'hypothèse suivante, soit que réciproquement, les EPCs influencent la fonction plaquettaire.

Objectifs : Les objectifs spécifiques de ce projet étaient de :

- 1- Différencier et caractériser des EPCs à partir des PBMCs
- 2- Étudier l'interaction des EPCs avec les plaquettes et le rôle de la P-sélectine
- 3- Examiner l'effet des EPCs sur l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettaire
- 4- Définir le rôle des EPCs dans la thrombogénèse
- 5- Élucider le mécanisme d'action des EPCs sur la fonction plaquettaire et la formation du thrombus.

Résultats attendus : Ce projet a été conçu sous les prémisses que :

- 1- Les EPCs peuvent être générées à partir des cellules mononucléaires du sang humain périphérique
- 2- Les EPCs peuvent lier les plaquettes et influencer leurs fonctions
- 3- Les EPCs peuvent interférer avec la formation du thrombus aux sites de lésions vasculaires, *in vivo*.

Chapitre 4

Contribution Scientifique

Mise en contexte pour le premier article :

Les cellules endothéliales progénitrices lient et inhibent la fonction plaquettaire et la formation du thrombus

Les interactions des EPCs avec les plaquettes sanguines constituent une partie des réactions qui lient l'hémostase à la réparation vasculaire. L'agrégation plaquettaire est une des réponses primaires à la rupture de l'endothélium et constitue une étape primordiale pour l'incorporation des EPCs au niveau du site de la lésion. Cependant, lorsque la réaction plaquettaire devient démesurée, un thrombus occlusif peut s'installer dans la lumière des artères ou des veines et engendrer une oblitération partielle ou totale du vaisseau.

Des études ayant rapporté que le potentiel thérapeutique des EPCs est médié essentiellement par une sécrétion paracrine de substances pro-angiogéniques et vaso-actives dans le microenvironnement immédiat de la lésion. En particulier, on note une sécrétion importante de facteurs thrombo-résistants et vaso-relaxants. Cette sécrétion peut inhiber l'agrégation plaquettaire locale, limiter la thrombogenèse, et accélérer le processus de réparation endothéliale. Dans ce contexte, des études cliniques ont clairement démontré que l'utilisation de stents capteurs d'EPCs limitait l'initiation de la cascade d'événements aboutissant à la thrombose aiguë, chronique ou tardive de stents implantés dans la paroi artérielle. De plus, dans un modèle de thrombose des veines profondes chez le rat, la transplantation d'EPCs semble altérer le microenvironnement de la lésion ce qui se traduit par une recanalisation et un remodelage du thrombus. Cependant, l'action des EPCs sur la fonction plaquettaire et la formation du thrombus n'est pas encore bien élucidée. Ainsi, cette étude a été conçue sous les prémisses que les EPCs sont capables d'influencer la fonction des plaquettes *in vitro* et d'interférer avec la formation du thrombus *in vivo*.

Contribution des auteurs

Haissam Abou-Saleh : Planification et exécution de la majorité des expériences, rédaction et correction de l'article.

Daniel Yacoub et Jean-Francois Théorêt : Exécution de certaines expériences, et correction de l'article.

Marc-Antoine Gillis : Exécution du modèle de thrombose chez la souris.

Paul-Eduard Neagoe et Martin G Sirois : Dosage de la PGI₂ et correction de l'article.

Benoît Labarthe et Pierre Théroux : Participation aux expériences de perfusion du sang et correction de l'article.

Maryam Tabrizian et Eric Thorin : Planification de certaines expériences et correction de l'article.

Yahye Merhi : Planification des expériences, rédaction et correction de l'article et direction générale.

Endothelial Progenitor Cells Bind and Inhibit Platelet Function and Thrombus Formation

Haissam Abou-Saleh, MSc; Daniel Yacoub, MSc; Jean-François Théorêt, PhD; Marc-Antoine Gillis, MSc; Paul-Eduard Neagoe, MSc; Benoit Labarthe, PhD; Pierre Thérroux, MD; Martin G. Sirois, PhD; Maryam Tabrizian, PhD; Eric Thorin, PhD; Yahye Merhi, PhD

Short title: Endothelial progenitor cells and platelet function

Subject Codes: [92] Platelets,

[178] Aggregation

[172] Arterial thrombosis

[95] Endothelium/vascular type/nitric oxide

Word count: 5935

Status of the manuscript: submitted to the Journal of Thrombosis and Haemostasis

From the Research Center, Montreal Heart Institute and Université de Montréal, Faculty of Medicine (H.A.-S., D.Y., J.-F.T., M.-A.G., P.-E. N., B.L., P.T., M.G.S., E.T., Y.M.), and McGill University, Center for Biorecognition and Biosensors (M.T.), Montreal, Quebec, Canada.

Correspondence to Yahye Merhi, PhD, Laboratory of Thrombosis and Hemostasis, Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger, Montreal, Quebec, Canada, H1T 1C8; Tel: +514 376-3330 ext. 3035, Fax: +514 376-1355; e-mail: yahye.merhi@icm-mhi.org.

Abstract

Background– Interactions of endothelial progenitor cells (EPCs) with vascular and blood cells contribute to vascular homeostasis. Although platelets promote the homing of EPCs to sites of vascular injury and their differentiation into endothelial cells, the functional consequences of such interactions on platelets remain unknown. Herein, we addressed the interactions between EPCs and platelets, and their impact on platelet function and thrombus formation.

Methods and Results– Cultured on fibronectin in conditioned media, human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) differentiated, within 10 days of culture, into EPCs, which were positive for Ulex-lectin and Ac-LDL, and expressed progenitor markers (CD34, VEGFR2, vWF, and VE-Cadherin). These EPCs inhibited platelet CD62P translocation, GPIIb/IIIa activation, aggregation, and adhesion to collagen, mainly via prostacyclin (PGI₂) secretion. Indeed, this was associated with up-regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide (NO) synthase. However, the effects on platelets were reversed by COX, but not by NO, inhibition. Although EPCs bound platelets via CD62P, their predominant effects occurred via a paracrine secretion, implying PGI₂. Moreover, in a ferric chloride (FeCl₃)-induced murine arterial thrombosis model, injection of EPCs led to their incorporation into sites of injury, and impaired thrombus formation, leading to an incomplete occlusion with 50% residual flow.

Conclusions– PBMC-derived EPCs bind platelets via CD62P and inhibit platelet activation, aggregation and adhesion to collagen, and thrombus formation, predominantly via up-regulation of COX-2 and secretion of PGI₂. These findings add new insights into the biology of EPCs and define their potential roles in regulating platelet function and thrombosis.

Key Words: endothelial progenitor cells ■ platelets ■ thrombosis ■ prostaglandins ■ nitric oxide

Introduction

Endothelial progenitor cells (EPCs) are believed to contribute to vascular biology and hemostasis. Although EPCs have been localized in cord blood, bone marrow, and peripheral blood as well as in some regenerative tissues, controversy regarding their isolation, identification and functionality still exists. Indeed, the term "EPC" has been employed to describe different populations of multipotent cells that have the capability to differentiate, depending on the environmental cues, into mature endothelial cells (ECs). These cells are extremely rare in peripheral blood, but their number can be markedly increased after treatment with mobilizing cytokines or vascular trauma.^{1, 2} Nevertheless, cells with progenitor and endothelial phenotype have been generated *in vitro* from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)³⁻¹¹ and have shown potential therapeutic applications in vascular tissue engineering and cell-based therapy.^{6, 12-15} The population of circulating PBMCs that have the ability to differentiate into EPCs is very diverse among which CD34⁺/CD14⁺ cells represent the most abundant and common fraction.^{9, 16-19} The use of *ex vivo*-expanded EPCs in animal and clinical studies have shown beneficial effects in re-endothelialization and neovascularisation,^{3, 6, 7, 12, 20} as well as in the prevention of hybrid graft thrombosis and rejection^{12, 13, 21} and late stent thrombosis.^{15, 22} Yet, the mechanisms that regulate mobilization, migration, and differentiation of EPCs and their homing to sites of vascular injury are complex and involve several mediators and receptors, such as P-Selectin-Glycoprotein-Ligand-1 (PSGL-1), α_4 integrin, CXC chemokine receptor-2 and -4, and β_1 - and β_2 -integrins.²³⁻²⁶ Furthermore, it has been shown that the interaction of platelets with EPCs influences their chemotaxis, adhesion, activation and differentiation into mature ECs during vascular repair.^{23, 27-30}

Platelet activation and adhesion to damaged blood vessels represent the first step in atherothrombosis.³¹ At the sites of vascular injury, platelets roll and interact with various components of the subendothelial matrix *via* a number of adhesive receptors expressed on the platelet surface. This, in turn, induces signaling that leads to platelet aggregation through GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin) activation and binding to fibrinogen.³² Platelet activation is accompanied by the translocation of P-selectin (CD62P), which contributes to the recruitment of other blood leukocytes.³³ In this regard, CD62P has also been involved in the interaction of platelets with EPCs.^{23, 27, 28}

Although platelets promote the homing of EPCs at the sites of vascular injury and favor their differentiation into ECs, the functional consequences of such interactions on platelets remain unknown. In fact, EPCs secrete many vasoactive and angiogenic factors that may modulate vascular thrombosis and hemostasis. Accordingly, we hypothesized that they might influence platelet function. We therefore designed the present study to determine the impact and the mechanisms of action of EPCs on platelet function *in vitro* and *in vivo*. We found first that human PBMC-derived EPCs bound platelets via CD62P and second that PBMC-derived EPCs inhibited platelet activation, aggregation and adhesion to collagen, and thrombus formation *in vivo*, predominantly via up-regulation of COX-2 and secretion of PGI₂.

Methods

This study has been approved by the human and animal ethical committees of the Montreal Heart Institute. All subjects were healthy men and women volunteers aged between 20 and 55 years old. They gave informed consent and were free from any drugs that interfere with platelet function.

The authors had full access to and take full responsibility for the integrity of the data. All authors have read and agree to the manuscript as written.

Culture and characterization of EPCs

Human PBMCs were isolated from peripheral blood by centrifugation on Ficoll density gradient according to the manufacturer's instructions (StemCell Technologies, Vancouver, BC). Mononuclear cells were then seeded onto fibronectine-coated 35 mm diameter 6-well tissue culture plates (BD Biosciences, Mississauga, ON) at a density of 5×10^6 cells/well, and supplemented with EndoCult™ Liquid Medium (StemCell Technologies). After 48 hours, the non-adherent cells were discarded by gentle washing with phosphate buffer saline (PBS), and fresh media was applied. The adherent cells were continually cultured in a complete media that was changed every 48 hours to allow formation of a well-circumscribed monolayer of spindle-shaped cells, as previously described.^{4, 5, 11, 17}

Freshly isolated PBMCs and the differentiated cells after 10 days of culture were examined by optical and confocal microscopy. Direct fluorescent staining was used to detect the binding of FITC-Conjugated Ulex-lectin (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) and the uptake of Dil-

Acetylated Low Density Lipoprotein (Ac-LDL, Molecular probes, Eugene, OR) by laser confocal microscopy. The cells were plated with fresh media onto Microwell Dishes (MatTek corporation, Ashland, MA) coated with fibronectin ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, Roche, Laval, Qc) for 1 hour at 37°C . Cells were then incubated with Ac-LDL ($2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$) and Ulex-lectin ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) for 1 hour at 37°C , and fixed with 2% paraformaldehyde for 10 minutes. Cells positive for both Ulex-lectin and Ac-LDL were classified as EPCs. Fluorescent confocal images (Z stacks) were acquired with a LSM 510 confocal microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). A 100x/1.3 Plan-Neofluar objective (Zeiss) was used for magnification. Z stacks-images were deconvolved with the Huygens Pro 3.0 software (Scientific Volume Imaging, Hilversum, The Netherlands), and the final images were reconstructed with the LSM510 software.

Surface marker expression

The expression of specific pan-leukocyte, progenitor and endothelial surface markers on freshly isolated PBMCs and EPCs were assessed by flow cytometry using saturating concentrations of mouse anti-human PE-conjugated monoclonal antibodies (mAbs) against CD14 (AbD Serotec, Raleigh, NC), CD34 (BD Biosciences), PSGL-1 (Santa Cruz, Santa Cruz, CA), CD62P or P-selectin (BD Biosciences), CD62L or L-selectin (AbD Serotec), VEGF Receptor 2 (VEGFR2, Abcam, Cambridge, MA), vWF (AbD Serotec), VE-Cadherin (BD Biosciences) or CD41 (Dako Mississauga, ON). Briefly, freshly isolated PBMCs or cultured cells at day 10 were detached from the culture plates by gentle scraping in 1 mM EDTA-PBS (pH 7.2) under inverted microscopy. Cells were then re-suspended in PBS containing 0.5% bovine serum albumin, plated in 96-microwell plates at 200×10^3 cells/well, blocked with normal mouse serum for 15 minutes at 4°C , washed, and labeled with saturating concentrations of the above mAbs for 20 minutes. The samples were then washed, fixed with paraformaldehyde, and analyzed with an Altra flow cytometer (Beckman Coulter, Mississauga, ON) as described previously.^{33, 34} Results were expressed as the percentage of positive cells obtained from 5000 events. Fluorescent isotype-matched antibodies were used as negative controls.

Platelet activation and binding

Platelets were prepared as previously described.³³⁻³⁵ Briefly, platelet rich plasma (PRP) was prepared by centrifugation of whole blood at 500 g for 15 minutes. Platelets were then obtained by centrifugation of PRP for 10 minutes and resuspended in Hanks balanced salt solution-HEPES buffer with 0.4 mmol/L: ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) (HBSS-EDTA) pH 6.5 free from Ca^{2+} and Mg^{2+} . The isolated platelets were centrifuged and resuspended in a HBSS-HEPES buffer pH 7.4 with Ca^{2+} (CaCl_2 1.3 mmol/L) and Mg^{2+} (MgSO_4 0.81 mmol/L) and adjusted to a final concentration of $250 \times 10^6/\text{ml}$, using an automated cell counter (T890, Coulter). The purity of platelet suspension normally exceeded 99% as determined by an electronic Coulter counter and by light microscopy examination. The binding of thrombin-activated platelets to PBMCs and EPCs, in mixed cell populations of 50:1 ratio, was determined using a dual-labeling technique with mAbs directed against platelet-CD41 (FITC) and PBMC-CD14 (PE) or EPC-CD34 (PE). The binding was assessed with and without blocking mAbs directed against P-selectin (AK6, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, AbD Serotec) and PSGL-1 (KPL-1, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Santa Cruz) for 5 minutes at 37°C, as detailed previously.³³⁻³⁵ Control experiments for specificity were done with a blocking anti-CD62L mAb (Dreg-56, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, BD Biosciences). The fluorescence threshold was set to analyze only dual FITC-and PE-labeled cells, corresponding to CD14^+ or CD34^+ that exhibited platelet-CD41 fluorescence from 5000 events. The number of platelets bound to 100 cells was calculated, as described previously.³⁶

Platelet ($250 \times 10^6/\text{mL}$) activation was determined by assessing P-selectin translocation (CD62P, BD Biosciences) and GPIIb/IIIa activation³³⁻³⁵ (PAC-1, BD Biosciences) at baseline and after stimulation with thrombin in the presence of cell-free supernatant, which was obtained by centrifugation (600 g, 10 minutes) of $5 \times 10^6/\text{mL}$ of freshly isolated PBMCs or EPCs culture media.

Platelet aggregation

Platelets, alone ($250 \times 10^6/\text{mL}$) or in the presence of $5 \times 10^6/\text{mL}$ PBMCs, EPCs, or their cell-free supernatants, were co-incubated in a 4-channel lumi-aggregometer (Chronolog, Havertown, PA) under shear conditions (1,000 rpm) at 37°C. Platelet aggregation was initiated by adding thrombin (0.1 U/mL) or collagen (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and then monitored by Aggro-Link software (Chronolog) for 5 minutes, as described previously.^{34, 35}

Platelet adhesion

The effects of PBMCs and EPCs on platelet adhesion to collagen under flow were assessed in an *ex-vivo* perfusion system.³⁷ Cells ($500 \times 10^3/200 \mu\text{l}$) or their supernatant were incubated with 2 ml of sodium citrate anticoagulated blood that was labeled with 10 $\mu\text{g/mL}$ Rhodamine 6G (Sigma-Aldrich) for 15 minutes at 37°C. Stained samples were then perfused simultaneously in glass capillaries (0.2 x 2.0 mm I.D., Fiber Optic Center Inc., Bedford, MA), pre-coated overnight at 4°C with 250 $\mu\text{g/mL}$ of fibrillar equine type 1 collagen (Chronolog), at a shear rate of 300 s^{-1} using a KD scientific syringe pump (Fisher Scientific, Ottawa, ON). After a washing step, images of the surfaces were captured using a digital Camera (Scion Corp., Frederick, MD) connected to a Nikon Diaphot 200 epifluorescence microscope (Plan 10x 0.25, Mississauga, ON). The percentage of platelet-covered surface, which represents platelet adhesion, was then quantified by morphometric analyses using the ImageJ software (NIH, Bethesda, MD).

PGI₂ and NO measurements

To assess the release of PGI₂ and NO, cells were incubated with culture media containing either a COX inhibitor (indomethacin, 10 $\mu\text{mol/L}$, Calbiochem, Darmstadt, Germany), or a selective NO scavenger (phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide or PTIO, 100 $\mu\text{mol/L}$, Sigma-Aldrich). PGI₂ release was measured with a radioimmunoassay (RIA, Sigma-Aldrich) for the stable metabolite of prostacyclin, 6-keto-PGF_{1 α} . NO release was measured with a nitrate/nitrite fluorometric assay kit (Cayman chemical, Ann Arbor, MI) according to the manufacturer's instructions. The concentrations of PGI₂ and NO were normalized per unit number for each cell type. Cell culture supernatants from control, indomethacin, PTIO, or a NOS inhibitor (N_o-Nitro-L-arginine or L-NNA, 100 μM , Sigma-Aldrich) treated cells were collected at 1 hour (day 0), and 10 days and used for platelet function assays.

Western Blot of COX and NOS

Twenty-five μg of protein from PBMCs, and EPCs (5×10^6 cells/mL) lysates were separated on 8% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and blotted onto nitrocellulose membranes. After blocking of non-specific binding, the membranes were incubated overnight at 4°C with antibodies (1:200) against COX-1, COX-2, eNOS or iNOS (Santa Cruz), and labeled with HRP-conjugated secondary antibodies (Santa-Cruz) at room temperature for

1 hour. Proteins were detected by enhanced chemiluminescence (PerkinElmer Life Sciences, Waltham, MA). β -actin was used as an internal control.

Model of mouse carotid thrombosis

The effects of freshly isolated PBMCs and culture-derived EPCs (500×10^3 cells)^{3, 5, 6, 26} on thrombus formation were determined in a FeCl_3 mouse carotid injury model, according to a standardized protocol.³⁸ Control experiments were done with culture media alone. Briefly, C57BL6 mice (14-16 weeks old, Jackson laboratory, Bar Harbor, ME) were anesthetized with a mixture of ketamine (Vetalar: 1.5 mg/kg I.P., Bioniche, Belleville, ON) and medetomidine (Domitor: 1 mg/kg I.P., Pfizer, Kirkland, QC) and the right carotid artery was carefully exposed. A miniature ultrasound flow probe (0.5 VB 552; Transonic Systems, Ithaca, NY), interfaced with a flow meter (T206; Transonic Systems) and a computer-based data acquisition program (Iox 2.2.17.19, Emka, Falls Church, VA), was positioned around the artery. After measuring baseline blood flow, a 0.5×1.0 -mm strip of filter paper (Whatman no. 1) soaked in 6.5% FeCl_3 was applied on the adventitial surface proximal to the flow probe for 3 minutes, after which blood flow and time to thrombotic occlusion (blood flow of 0 mL/min) were monitored.

Histology, immunostaining and confocal fluorescence

After completion of *in vivo* flow measurements in mice, the injured and the contralateral non-injured carotids were excised and fixed in 10% buffered formalin. These arterial segments were then embedded in paraffin, sectioned at 6 microns, and stained with hematoxylin and eosin, or with an anti-CD34 antibody (Santa Cruz). Samples were visualized using an Olympus BX60 microscope (Olympus imaging America Inc., Center Valley, PA) and images were captured with a Retiga 2000R camera (QImaging Corporation, Surrey, BC). The final images were acquired with Image Pro Plus 6.2 software (Media Cybernetics, Bethesda, MD).

For confocal fluorescence, 500×10^3 of PBMCs or EPCs were labeled with an intracellular photostable fluorescence marker (CellTrackerTM CM-DiI, Molecular Probes) according to the manufacturer's instructions. Cells were then washed with PBS, resuspended in fresh media and injected intravenously, and allowed to circulate for 15 minutes before inducing the mouse carotid injury. The carotids were excised immediately after completion of the blood flow measurements and immersed in liquid nitrogen. Labeled PBMCs and EPCs incorporated into the luminal aspect

of arterial thrombi were observed on cryostat sections of 14- μ m thickness using confocal microscopy. Fluorescent confocal images (Z stacks) were acquired with a LSM 510 confocal microscope (Zeiss). A 10x/1.3 Plan-Neofluar objective (Zeiss) was used for magnification. Z stacks-images were deconvolved with the Huygens Pro 3.0 software (Scientific Volume Imaging), and the final images were reconstructed with the LSM510 software.

Statistical analysis

Results are presented as mean \pm SEM of at least 3 independent experiments. The exact number of experiments for each test is indicated in the figure legends. Statistical comparisons were done using a one-way ANOVA, followed by a Dunnett-*t*-test for comparison against a single group. Data with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Characterization of PBMC-derived EPCs

We first characterized the differentiation of PBMCs into EPCs *in vitro* using optical and confocal imaging. As shown in Figure 1A, human PBMCs, cultured in conditioned media (EndoCult™), differentiated within 10 days into an adherent population, which formed a flat monolayer of spindle-shaped cells characteristic of EPCs. These cells were positive for Ac-LDL and Ulex-lectin staining. The expression of cell surface markers during the differentiation of PBMCs into EPCs was assessed by flow cytometry. Cells were gated with respect to CD14/CD34 expression. We observed that the expression pattern of surface markers of cultured cells became that of progenitor phenotype after 10 days of culture (Figure 1B). Freshly isolated PBMCs predominantly expressed the pan-leukocyte markers CD14 (87%), PSGL-1 (93%) and CD62L (46%), whereas the progenitor markers were missing. After 10 days of culture, the progenitor markers were highly expressed (63% CD34, 40% CD62P, 33% VEGFR2, 85% VE-Cadherin, and 97% vWF), whereas the leukocyte markers (CD14, PSGL-1 and CD62L) were absent. The platelet marker CD41 was absent in all cell populations, indicating that these cells were void of platelet contamination.

EPCs Bind Platelets

The adhesive interactions between platelets and EPCs were determined by assessing the number of activated platelets that bound to 100 cells. As shown in Figure 2A, the binding averaged 157 platelets/100 cells for freshly isolated PBMCs and decreased to 54 for EPCs at day 10 of culture. Inhibition of P-selectin significantly reduced platelet binding by 66% for PBMCs and 50% for EPCs, whereas the blockade of PSGL-1 was only effective in preventing the binding of platelet to PBMCs, but not to EPCs. Moreover, the binding of platelets to PBMCs or EPCs was not affected by L-selectin blockade, which was used as a negative control.

EPCs Inhibit Platelet Activation and Aggregation

We then investigated the impact of EPCs on thrombin-induced platelet activation by assessing the translocation of CD62P and activation of GPIIb/IIIa by flow cytometry. As shown in Figure 2B, C and D, platelet activation was completely inhibited in the presence of EPC supernatant as revealed by the absence of CD62P translocation and GPIIb/IIIa activation, while the supernatant of PBMCs had no significant effect on platelet activation.

Given that EPCs impair platelet activation, we sought to examine their functional impact on platelet aggregation in response to two physiological agonists, thrombin and collagen. Platelet aggregation was not affected by the presence of PBMCs but was significantly decreased in the presence of EPCs in response to both agonists (Figure 3A and D). Moreover, platelet aggregation was completely inhibited by the supernatant of EPCs in response to both platelet agonists, whereas the supernatant of PBMCs had no significant effect (Figure 3B and E). Taken together, these results indicate that EPCs reduce platelet function, whereas their predominant effects are related to the release of platelet inhibitory factors that modulate platelet activation and aggregation.

EPCs Inhibit Platelet Function via PGI₂ Secretion

In order to reveal the factor(s) responsible for the inhibitory effects of EPCs on platelet activation and aggregation, we pre-incubated differentiating cells with COX and NO inhibitors, as prostaglandins and NO constitute potent modulators of platelet function. These treatments did not affect the differentiation of PBMCs into EPCs, and did not alter their proliferative capacities

(data not shown). The culture supernatant from treated cells was collected and assessed for PGI₂ and NO secretion and tested on platelet aggregation. As shown in Figures 4A and 4B, EPCs released high levels of PGI₂ and NO. In contrast to EPCs, the amount of PGI₂ and NO released by PBMCs was negligible. Moreover, the release of PGI₂ and NO was totally prevented when differentiated EPCs were cultured in the presence of indomethacin (a COX inhibitor) or PTIO (a NO chelator), respectively. Interestingly, the anti-aggregatory or inhibitory effect of EPCs on platelets was reversed by incubating cultured EPCs with indomethacin, but not with PTIO (Figure 4C) or L-NNA, a NOS inhibitor (Insert).

To further validate the release of PGI₂ and NO from EPCs, we assessed the expression of the constitutive and inducible forms of cyclooxygenase (COX-1 and COX-2) and NOS (eNOS and iNOS isoforms) in cultured EPCs, in comparison with PBMCs, by Western blot. As shown in Figure 4D, COX-1 was detectable in freshly isolated PBMCs (day 0), and increased in EPCs at day 10. However, COX-2 was specifically up-regulated after the differentiation of PBMCs into EPCs. Similarly, iNOS was poorly expressed in the PBMC population and profoundly increased in EPCs, while eNOS was barely detectable in both cell populations. Taken together, these data indicate that, while EPCs specifically up-regulate the expression of COX-2 and iNOS and release PGI₂ and NO, their main effect on platelet activation and aggregation appears to be PGI₂-dependent.

EPCs Reduce Platelet Adhesion Under Flow

Since EPCs inhibit platelet activation and aggregation of washed platelets, we then assessed their impact on platelet adhesion to collagen in a whole blood perfusion system. As shown in Figure 5, perfusion of whole blood resulted in almost 25% coverage of the collagen surface with platelets, which was reduced to 7% coverage by a GPIIb/IIIa antagonist, Abciximab (positive control). Co-incubation of blood with PBMCs or their respective supernatants had no significant effect on platelet adhesion. In contrast, the presence of EPCs or their supernatant reduced significantly platelet adhesion by 23% and 53%, respectively. The effects of EPCs and their supernatant were reversed, once again, by pre-treating EPCs with the COX inhibitor indomethacin. Hence, the effects of EPCs on activation and aggregation of isolated platelets were also highlighted in a more physiological approach of platelet adhesion under flow in whole blood.

EPCs Incorporate at the Sites of Mouse Carotid Injury and Inhibit Thrombus Formation

Having shown the impact of EPCs on activation and aggregation of washed platelets and on adhesion in whole blood, we hypothesized that they may impair platelet function *in vivo*. Therefore, we examined the effect of EPCs on thrombus formation by injecting freshly isolated PBMCs and cultured EPCs intravenously into mice 15 minutes prior to FeCl₃-induced carotid artery injury. As shown in Figure 6A, mice that received PBMCs had similar blood flows to control mice, which were characterized by complete occlusion of the arteries approximately 10 minutes post-FeCl₃-induced injury. In contrast, injection of EPCs significantly impaired thrombus formation, leading to an incomplete occlusion with 50% residual flow.

To further analyze the characteristics of the formed thrombi, FeCl₃-injured carotid arteries from PBMC and EPC-treated mice and from control group were fixed immediately following blood flow measurements and were subjected to fluorescence confocal, histological and immunohistochemical analysis. The circumference of the arteries and thrombi was measured by computer-assisted planimetry, and the thrombus size was reported as percentage of total lumen area. As compared to control- and PBMC-treated arteries, which showed complete occlusion (Figure 6B and Figure 7A and 7E), the arterial thrombus formed in EPC-treated mice was partially occlusive (Figure 7I), and significantly reduced by 33% (Figure 6B), as compared to control. In another set of experiments, PBMCs and EPCs were labeled with a fluorescent cell tracker prior to their intravenous injection. Labeled PBMCs and EPCs were identified in the luminal aspect of the thrombi and appear as a cluster of red fluorescent clumps (Figure 7F and 7J). Injured arteries from control mice, used as negative control, were void from any staining (Figure 7B). This was also revealed in cross-histological sections of injured arteries immunostained with an anti-CD34 antibody, in control- (Figure 7D), PBMC- (Figure 7H) and EPC- (Figure 7L) treated mice. In control- and PBMC-treated mice, the injured carotids were negative in CD34⁺ cells. In contrast, focal accumulation of CD34⁺ cells, representing 10 ± 2 cells per thrombus cross-sectional area, was observed within the thrombus and along the vascular wall in the carotids of EPC-treated mice.

Discussion

The present study provides novel evidence for the regulation of platelet function by EPCs. We found first that human PBMC-derived EPCs bound platelets via CD62P and second that PBMC-derived EPCs inhibited platelet activation, aggregation and adhesion to collagen and thrombus formation *in vivo*, predominantly via up-regulation of COX-2 and secretion of PGI₂. This study reveals a new biological role for EPCs in controlling platelet function, which may in turn limit thrombogenesis and maintain hemostasis at the sites of vascular injury.

It is well established that mobilization and recruitment of EPCs from bone marrow contribute to cell-based therapy and vascular repair. So far, therapeutic application of EPCs is still limited by the paucity of available cells. The "*ex vivo*" outgrowth of EPCs are, therefore, very important to ensure that an adequate cell number is available for their characterization and therapeutic application. It has been shown indeed, that peripheral blood contains a complex assortment of progenitor cells that possess the ability to differentiate into EPCs *in vitro*.³⁹⁻⁴¹ In this connection, we succeeded in adequately differentiating EPCs from PBMCs according to a standardized method.^{4, 5} Such subtype of differentiated EPCs displayed similar morphological and phenotypical characteristics of endothelial colony-forming cells (ECFCs) that derived from the adherent population of PBMCs when plated on collagen or fibronectin in the presence of endothelial-specific growth media.^{2, 10, 11} The morphology of these cells changed from a population of irregular and small rounded cells to a flattened, spindle-shaped population that uptakes Dil-AcLDL and binds Ulex-lectin. Moreover, the expression pattern of surface markers of cultured cells changed during differentiation, as demonstrated by a decrease in pan-leukocyte markers and an increase in progenitor markers after 10 days of culture.

Accumulating evidence suggests that platelets play an important role not only in hemostasis and thrombosis, but also in inflammation and tissue repair through paracrine mechanisms or direct interactions with other blood cells.^{31, 42} Recently, it has been shown that platelets promote the homing and differentiation of EPCs at the sites of vascular injury,²³⁻³⁰ through highly concerted mechanisms involving chemotaxis, adhesion, migration, and integration of EPCs into the target tissue. Conversely, EPCs may influence platelet function and modulate their thrombogenic properties during vascular repair. In order to analyze and characterize the action of EPCs on platelet function, we first showed that platelets can bind EPCs after 10 days of culture, but to a lower extent than the binding to PBMCs. The decrease in binding during the

differentiation process may be explained by the dynamic changes in the expression of cell surface markers, as well as by the up-regulation of platelet inhibiting factors, throughout the process of PBMC differentiation into EPCs. Indeed, we observed a decrease in the expression of PSGL-1, and an increase in the secretion of PGI₂ and NO, thus providing a possible explanation for the significant decrease in the binding of activated platelets to EPCs. We also showed that PBMC-derived EPCs bind activated platelets in a CD62P-dependent manner, thus confirming previous findings demonstrating that the interaction between platelets and EPCs occurs, in part, via CD62P and its high affinity receptor PSGL-1.^{23, 27-30} In addition to PSGL-1, other mediators may be involved as demonstrated previously that, α_4 integrin, CXC chemokine receptor-2 and -4, and β_1 - and β_2 -integrins,²³⁻²⁶ participate in EPCs homing at the sites of vascular injury.

In addition to reduced binding of EPCs to platelets throughout the differentiation process, incubation of platelets with the releasate of EPCs resulted in a profound inhibition of platelet activation, as revealed by the inhibition of CD62P translocation and GPIIb/IIIa activation, both of which are involved in the formation and stabilization of platelet thrombus.^{43, 44} The functional impact of EPCs on platelets was also underlined by their inhibitory effects on thrombin- and collagen-induced aggregation of washed platelets and adhesion to collagen under flow in whole blood. The functional impact of EPCs on platelets was further depicted in a mouse arterial thrombosis model, in which, injection of EPCs impaired thrombus mass by 33%, leading to an incomplete occlusion with 50% residual flow. These findings may be of important pathophysiological relevance, since the acute vascular response to injury involves the adhesion, activation, and aggregation of platelets, followed by the recruitment of other platelets, leukocytes, and possibly circulating EPCs. The recruitment of circulating EPCs at the site of injury may contribute first, to attenuate the acute thrombotic response by inhibiting platelet function, and second, to promote re-endothelialization and vascular repair. This may explain earlier observations that *ex-vivo* expanded EPCs seeded onto the lumen of a small diameter vascular graft and implanted *in vivo*, have a much lower chance of thrombosis and subsequent rejection as compared to non-coated controls.^{12, 13} Moreover, the use of EPC capture stents during percutaneous coronary intervention reduces the incidence of late stent thrombosis.^{15, 22} Thus, EPCs modulate platelet function and appear to play an important role in the management of thrombotic reactions.

The fundamental role of EPCs on platelets may be facilitated primarily by the secretion of thrombo-resistant factors such as PGI₂ and NO, which are well known anti-platelet mediators. In fact, we have shown that PBMC-derived EPCs specifically up-regulate COX-2 and iNOS during their differentiation, and produce PGI₂ and NO. Surprisingly, the effects of EPCs on platelet function were reversed by COX inhibition, whereas NO scavenging or NOS inhibition was without any significant effect. In biological systems, PGI₂ synthesis is catalyzed by either the constitutive (COX-1) or the inducible (COX-2) form of COX, whereas NO can be generated via one or the other of three NO synthases [neuronal (nNOS), inducible (iNOS), and endothelial (eNOS)]. In ECs, PGI₂ and NO are predominantly generated by COX-2⁴⁵ and eNOS, respectively.⁴⁶ In the present study, however, we pointed out PGI₂ as the principal mediator involved in the inhibitory action of EPCs on platelet function. This is based on our findings that in contrast to PBMCs, which constitutively expressed COX-1 but did not produce PGI₂, EPCs specifically up-regulated COX-2 and produced PGI₂, which was inhibited by indomethacin. However, indomethacin is a COX-1/COX-2 inhibitor that can inhibit prostaglandins, thromboxane and prostacyclin production. In this regard, platelets express only the receptors for PGI₂, TXA₂, PGE₂ and PGD₂,⁴⁷ which have the potential to affect platelet function. Among them, the PGI₂ receptor is the major inhibitory prostaglandin receptor that maintains platelets in resting state via Gs activation of adenylate cyclase. On the other hand, TXA₂ is a platelet activator and PGE₂ has a bivalent effect on platelets, whereas the PGD₂ receptor is the least abundant of the prostanoid receptors on platelets and is, therefore, the least well characterized. In sum, PGI₂ most likely represents the major EPC-derived platelet inhibitor.

In our experiments, the high levels of NO released from EPCs could be correlated with a high expression of iNOS, whereas eNOS expression was negligible in EPCs. Our findings are in accordance with a recent study showing that iNOS, but not eNOS, is detectable in peripheral blood derived EPCs.⁴⁸ The low expression of eNOS in EPCs derived from peripheral blood may be explained by the fact that they are not fully matured ECs and are preferentially prone to produce NO in a monocytic/macrophage fashion through iNOS up-regulation. This may suggest that the level of NO production via iNOS is not sufficient to affect platelet function. Moreover, the role of iNOS in EPCs appears to be important in angiogenesis, perhaps by promoting the recruitment of EPCs near the damaged endothelium.⁴⁹ Taken together, this may explain, in part, our observation that the inhibitory effects of EPCs on platelet function *in vitro* was predominantly PGI₂-, but not

NO-dependent. This does not negate, however, the role of EPC-derived NO as a regulatory factor involved in the secondary phase of vascular repair, including angiogenesis.⁴⁹

Our data demonstrate that EPCs regulate platelet function, via up-regulation of COX-2 and a PGI₂-dependent inhibition of platelet activation, aggregation, adhesion, and thrombus formation. In addition to the well documented roles of EPCs in angiogenesis and vascular repair, our findings highlight a new biological role for EPCs in regulating platelet function, which may, in turn, limit thrombogenesis and maintain hemostasis at the sites of vascular injury.

Acknowledgements

We are grateful to M. Louis Villeneuve for his technical assistance with confocal microscopy.

Sources of Funding

This study was supported by grants from the Canadian Institute for Health Research (MOP-82767 for YM; IAP-73374 for ET & YM; and RMF-79023 for MT & YM).

Disclosures

None.

References

1. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. Feb 1 2000;95(3):952-958.
2. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, et al. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest*. Jan 2000;105(1):71-77.
3. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. Feb 14 1997;275(5302):964-967.
4. Rehman J, Li J, Orschell CM, et al. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*. Mar 4 2003;107(8):1164-1169.
5. Hur J, Yoon CH, Kim HS, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Feb 2004;24(2):288-293.
6. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 28 2000;97(7):3422-3427.
7. Urbich C, Heeschen C, Aicher A, et al. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation*. Nov 18 2003;108(20):2511-2516.
8. Romagnani P, Lasagni L, Romagnani S. Peripheral blood as a source of stem cells for regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther*. Mar 2006;6(3):193-202.
9. Elsheikh E, Uzunel M, He Z, et al. Only a specific subset of human peripheral-blood monocytes has endothelial-like functional capacity. *Blood*. Oct 1 2005;106(7):2347-2355.
10. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*. Nov 1 2004;104(9):2752-2760.
11. Yoder MC, Mead LE, Prater D, et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*. Mar 1 2007;109(5):1801-1809.
12. Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, et al. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med*. Sep 2001;7(9):1035-1040.
13. Shirota T, He H, Yasui H, et al. Human endothelial progenitor cell-seeded hybrid graft: proliferative and antithrombogenic potentials in vitro and fabrication processing. *Tissue Eng*. Feb 2003;9(1):127-136.
14. Werner N, Nickenig G. Clinical and therapeutical implications of EPC biology in atherosclerosis. *J Cell Mol Med*. Apr-Jun 2006;10(2):318-332.
15. Co M, Tay E, Lee CH, et al. Use of endothelial progenitor cell capture stent (Genous Bio-Engineered R Stent) during primary percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction: intermediate- to long-term clinical follow-up. *Am Heart J*. Jan 2008;155(1):128-132.
16. Harraz M, Jiao C, Hanlon HD, et al. CD34- blood-derived human endothelial cell progenitors. *Stem Cells*. 2001;19(4):304-312.
17. Krenning G, Dankers PY, Jovanovic D, et al. Efficient differentiation of CD14+ monocytic cells into endothelial cells on degradable biomaterials. *Biomaterials*. Mar 2007;28(8):1470-1479.

18. Fernandez Pujol B, Lucibello FC, Gehling UM, et al. Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes. *Differentiation*. May 2000;65(5):287-300.
19. Wang C, Jiao C, Hanlon HD, et al. Mechanical, cellular, and molecular factors interact to modulate circulating endothelial cell progenitors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. May 2004;286(5):H1985-1993.
20. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. Aug 6 1999;85(3):221-228.
21. Shirota T, Yasui H, Shimokawa H, et al. Fabrication of endothelial progenitor cell (EPC)-seeded intravascular stent devices and in vitro endothelialization on hybrid vascular tissue. *Biomaterials*. Jun 2003;24(13):2295-2302.
22. Miglionico M, Patti G, D'Ambrosio A, et al. Percutaneous coronary intervention utilizing a new endothelial progenitor cells antibody-coated stent: a prospective single-center registry in high-risk patients. *Catheter Cardiovasc Interv*. Apr 1 2008;71(5):600-604.
23. Massberg S, Konrad I, Schurzinger K, et al. Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *J Exp Med*. May 15 2006;203(5):1221-1233.
24. Chavakis E, Aicher A, Heeschen C, et al. Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *J Exp Med*. Jan 3 2005;201(1):63-72.
25. Langer H, May AE, Daub K, et al. Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro. *Circ Res*. Feb 3 2006;98(2):e2-10.
26. Hristov M, Zernecke A, Bidzhekov K, et al. Importance of CXC chemokine receptor 2 in the homing of human peripheral blood endothelial progenitor cells to sites of arterial injury. *Circ Res*. Mar 2 2007;100(4):590-597.
27. Lev EI, Estrov Z, Aboufatova K, et al. Potential role of activated platelets in homing of human endothelial progenitor cells to subendothelial matrix. *Thromb Haemost*. Oct 2006;96(4):498-504.
28. Daub K, Langer H, Seizer P, et al. Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells. *Faseb J*. Dec 2006;20(14):2559-2561.
29. Stellos K, Gawaz M. Platelet interaction with progenitor cells: potential implications for regenerative medicine. *Thromb Haemost*. Nov 2007;98(5):922-929.
30. de Boer HC, Verseyden C, Ulfman LH, et al. Fibrin and activated platelets cooperatively guide stem cells to a vascular injury and promote differentiation towards an endothelial cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Jul 2006;26(7):1653-1659.
31. Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med*. Dec 13 2007;357(24):2482-2494.
32. Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res*. Jun 22 2007;100(12):1673-1685.
33. Theoret JF, Bienvenu JG, Kumar A, et al. P-selectin antagonism with recombinant p-selectin glycoprotein ligand-1 (rPSGL-Ig) inhibits circulating activated platelet binding to neutrophils induced by damaged arterial surfaces. *J Pharmacol Exp Ther*. Aug 2001;298(2):658-664.

34. Yacoub D, Theoret JF, Villeneuve L, et al. Essential role of protein kinase C delta in platelet signaling, alpha IIb beta 3 activation, and thromboxane A2 release. *J Biol Chem.* Oct 6 2006;281(40):30024-30035.
35. Abou-Saleh H, Theoret JF, Yacoub D, et al. Neutrophil P-selectin-glycoprotein-ligand-1 binding to platelet P-selectin enhances metalloproteinase 2 secretion and platelet-neutrophil aggregation. *Thromb Haemost.* Dec 2005;94(6):1230-1235.
36. Evangelista V, Manarini S, Rotondo S, et al. Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction in dynamic conditions: evidence of adhesion cascade and cross talk between P-selectin and the beta 2 integrin CD11b/CD18. *Blood.* Dec 1 1996;88(11):4183-4194.
37. Andre P, LaRocca T, Delaney SM, et al. Anticoagulants (thrombin inhibitors) and aspirin synergize with P2Y12 receptor antagonism in thrombosis. *Circulation.* Nov 25 2003;108(21):2697-2703.
38. Konstantinides S, Schafer K, Thinnest T, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 and its cofactor vitronectin stabilize arterial thrombi after vascular injury in mice. *Circulation.* Jan 30 2001;103(4):576-583.
39. Schatteman GC, Awad O. Hemangioblasts, angioblasts, and adult endothelial cell progenitors. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* Jan 2004;276(1):13-21.
40. Balbarini A, Barsotti MC, Di Stefano R, et al. Circulating endothelial progenitor cells characterization, function and relationship with cardiovascular risk factors. *Curr Pharm Des.* 2007;13(16):1699-1713.
41. Prater DN, Case J, Ingram DA, et al. Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells. *Leukemia.* Jun 2007;21(6):1141-1149.
42. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest.* Dec 2005;115(12):3378-3384.
43. Caron A, Theoret JF, Mousa SA, et al. Anti-platelet effects of GPIIb/IIIa and P-selectin antagonism, platelet activation, and binding to neutrophils. *J Cardiovasc Pharmacol.* Aug 2002;40(2):296-306.
44. Theoret JF, Chahrour W, Yacoub D, et al. Recombinant P-selectin glycoprotein-ligand-1 delays thrombin-induced platelet aggregation: a new role for P-selectin in early aggregation. *Br J Pharmacol.* Jun 2006;148(3):299-305.
45. Caughey GE, Cleland LG, Penglis PS, et al. Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2. *J Immunol.* Sep 1 2001;167(5):2831-2838.
46. Fish JE, Marsden PA. Endothelial nitric oxide synthase: insight into cell-specific gene regulation in the vascular endothelium. *Cell Mol Life Sci.* Jan 2006;63(2):144-162.
47. Armstrong RA. Platelet prostanoid receptors. *Pharmacol Ther.* 1996;72(3):171-191.
48. Muscari C, Gamberini C, Carboni M, et al. Different expression of NOS isoforms in early endothelial progenitor cells derived from peripheral and cord blood. *J Cell Biochem.* Nov 1 2007;102(4):992-1001.
49. Mayr U, Zou Y, Zhang Z, et al. Accelerated arteriosclerosis of vein grafts in inducible NO synthase(-/-) mice is related to decreased endothelial progenitor cell repair. *Circ Res.* Feb 17 2006;98(3):412-420.

Figure legends

Figure 1: Characteristics of cultured cells

(A) Immediately after plating, freshly isolated PBMCs with rounded morphology and irregular size appear either as single cells or as small clumps. At day 10, cells form a flat monolayer of spindle-shaped cells characteristic of EPCs in culture. Cells were visualized with an inverted optical microscope (Leica) and images were captured and digitalized with a Sony 3CCD camera and NIH Scion corporation software (Magnifications X20). Staining of freshly isolated PBMCs and 10- day cultured cells with Ulex-lectin (green) and Ac-LDL (red) under a laser-scanning confocal microscope. Double stained cells appear after 10 days of culture, and were defined as EPCs. Fluorescent confocal images (Z stacks) were acquired with a LSM 510 confocal microscope (Zeiss). (A) 100x/1.3 Plan-Neofluar objective was used for magnification. Z stacks-images were deconvolved with the Huygens Pro 3.0 software (Scientific Volume Imaging), and the final images were reconstructed with the LSM510 software. (B) Representative histogram showing the expression of different cell surface markers, as determined by flow cytometry. Single color immunostaining of cultured cells was performed on day 0 (PBMCs), and day 10 (EPCs) with saturating concentrations of mouse anti-human PE-conjugated mAbs directed against different mononuclear (CD14, PSGL-1, CD62L), progenitor (CD34, VEGFR2, CD62P), endothelial (VE-Cadherin, vWF), and platelet (CD41) cell surface markers. Data are the mean \pm SEM of at least 5 independent experiments of cell surface markers expression as assessed by flow cytometry.

Figure 2: EPCs bind and inhibit platelet activation

(A) Bar graphs show the number of activated platelets/100 cells, and the effects of anti-P-selectin, anti-PSGL-1 or anti-L-selectin blocking monoclonal antibodies. The binding of activated platelets to PBMCs and EPCs, in mixed cell populations of 50:1 ratio, was determined using a dual-labeling technique with saturating concentrations of mAbs directed against platelet-CD41 (FITC) and PBMC-CD14 (PE) or EPC-CD34 (PE). The binding was assessed with and without blocking monoclonal antibodies directed against P-selectin (AK6, 10 μ g/mL), PSGL-1 (KPL-1, 10 μ g/mL), and L-selectin (Dreg-56, 10 μ g/mL) for 5 minutes at 37°C. The fluorescence threshold was set to analyze only dual FITC-and PE-labeled cells, corresponding to CD14⁺ or

CD34⁺ that exhibit platelet-CD41 fluorescence from 5000 events. Results represent the mean \pm SEM of at least 6 independent experiments representing the binding of freshly isolated PBMCs and culture-derived EPCs to activated platelets ($*p < 0.05$ versus control). Lower panels show flow cytometry plots from representative experiments illustrating platelet CD62P translocation (B) and GPIIb/IIIa activation (C) at baseline and after thrombin activation of platelets in the presence of the released supernatant from PBMC or EPC populations. (D) The mean data \pm SEM of the MFI of at least 3 independent experiments of platelets activation in the presence or not of PBMCs and EPCs supernatants are presented. ($*p < 0.05$ versus control).

Figure 3: Effect of EPCs on platelet aggregation

Representative traces of thrombin- (panel A & B) and collagen- (panel D & E) induced platelet aggregation with or without PBMCs, EPCs or their supernatants. Platelets alone ($250 \times 10^6/\text{mL}$), or in the presence of $5 \times 10^6/\text{mL}$ PBMCs, EPCs, or their supernatants were co- incubated in a 4-channel lumi-aggregometer under shear conditions (1,000 rpm) at 37°C. Platelet aggregation was initiated by adding thrombin or collagen and then monitored for 5 minutes. C and F represent the mean data of at least 4 independent experiments, summarizing the effects of the different cell populations on thrombin- and collagen-induced platelet aggregation, respectively. ($*p < 0.05$ versus control)

Figure 4: EPCs secrete PGI₂ and NO and up-regulate COX-2 and iNOS

Release of PGI₂ (A) and NO (B) from PBMCs and EPCs pre-treated or not with indomethacin or PTIO was assessed in the supernatants by RIA and Nitrate/Nitrite fluorometric assay, respectively ($n=3$, $*p < 0.05$ versus EPCs). (C) Reversible effect of indomethacin on EPC-induced platelet aggregation inhibition: representative traces of thrombin-induced platelet aggregation with the supernatant of EPCs pre-treated or not with indomethacin or PTIO. Insert: Representative traces of thrombin-induced platelet aggregation with the supernatant of EPCs pre-treated or not with indomethacin or L-NNA ($*p < 0.05$ vs. control and NS vs. EPCs). Traces shown are representative of mean data obtained from at least 4 independent experiments. (D) Expression of COX and NOS isoforms in cultured cells, by western blot. The lanes show the expression of COX-1, COX-2, eNOS and iNOS in PBMC and EPC populations. β -actin was used

as an internal control. The blots shown are representative of data from 3 independent experiments.

Figure 5: EPCs reduce platelet adhesion to collagen under flow

(A) Representative fluorescent photomicrographs of platelet adhesion in whole blood on collagen-coated surfaces in the presence of PBMCs, EPCs or their supernatants pre-incubated or not with indomethacin. Blood samples pre-treated with culture media or with an anti GPIIb/IIIa antagonist (Abciximab) were used as controls. Glass capillaries were coated overnight at 4°C with 250 µg/mL of collagen. Two milliliters of sodium citrate anticoagulated blood were mixed with 200 µL of cells (500×10^3) or their supernatant followed by incubation with 10 µg/mL Rhodamine for 15 minutes at 37°C. Stained samples were then perfused simultaneously at a shear rate of 300 s^{-1} . Image acquisition was performed using a digital Camera (Scion Corp.) connected to a Nikon Diaphot 200 epifluorescence microscope (Plan 10x 0.25). The percentage of platelet-covered surface was then quantified by morphometric analyses using the ImageJ software (NIH). (B) The mean data of platelet adhesion presented as the percentage of capillary surface covered with platelets. Results represent the mean of at least 3 independent experiments. ($*p < 0.05$ vs. control)

Figure 6: EPCs reduce thrombus formation in vivo

(A) PBMCs and culture-derived EPCs (500×10^3 cells) were injected 15 minutes prior to FeCl_3 -induced injury of mouse carotid arteries, and thrombus formation was monitored by residual blood flow. Control experiments were done with culture media alone. After a stabilization period and application of FeCl_3 for 3 minutes, blood flow was continuously monitored for 23 minutes post- FeCl_3 injury. Traces represent the mean data of 8 mice in each group. (B) Bar graphs show the mean data of cross-sectional area of arterial thrombi expressed as percentage of lumen area in at least 5 mice in each group. ($*p < 0.01$ and $**p < 0.001$)

Figure 7: EPCs are recruited into arterial thrombi in vivo and reduce thrombus formation

Representative histological transverse sections of FeCl_3 -injured mouse carotid arteries, stained with hematoxylin and eosin (Left panels). Samples were visualized using Olympus BX60 microscope (Olympus Imaging America Inc.) and images were acquired with a Retiga 2000R

camera (QImaging Corporation). The final images were performed with Image Pro Plus 6.2 software (Media Cybernetics). Arterial thrombus mass was completely occlusive in control- and PBMC-treated mice (panels A & E), and partially occlusive in arteries from EPC-treated mice (panel I). The images shown are representative of carotid arteries of at least 4 mice in each group. Middle panels show confocal imaging of mouse carotid arteries after vascular injury. PBMCs and EPCs were labeled with intracellular fluorescence marker (DiI) 1 hour prior to injection, and assessed by confocal fluorescence on cryostat cross-sections (panels F & J). Injured arteries from non-treated mice are used as negative control (panel B). Fluorescent confocal images (Z stacks) were acquired with a LSM 510 confocal microscope (Zeiss). A 10x/1.3 Plan-Neofluar objective (Zeiss) was used for magnification. Z stacks-images were deconvolved with the Huygens Pro 3.0 software (Scientific Volume Imaging), and the final images were reconstructed with the LSM510 software. The corresponding Differential Interference Contrast (D.I.C) of the identical sections is shown on the right (panels C-G-K). Photomicrographs represent carotid arteries of 3 mice in each group. Right panels show anti-CD34 immunostaining of the injured arteries. CD34 positive cells appeared only in the EPC-treated mice, confirming the recruitment of EPCs to the luminal aspect of arterial thrombi *in vivo* (arrows in L). The cells in D and H are CD34 negative. Images are representative of carotid arteries of at least 4 mice in each group.

Figure 1

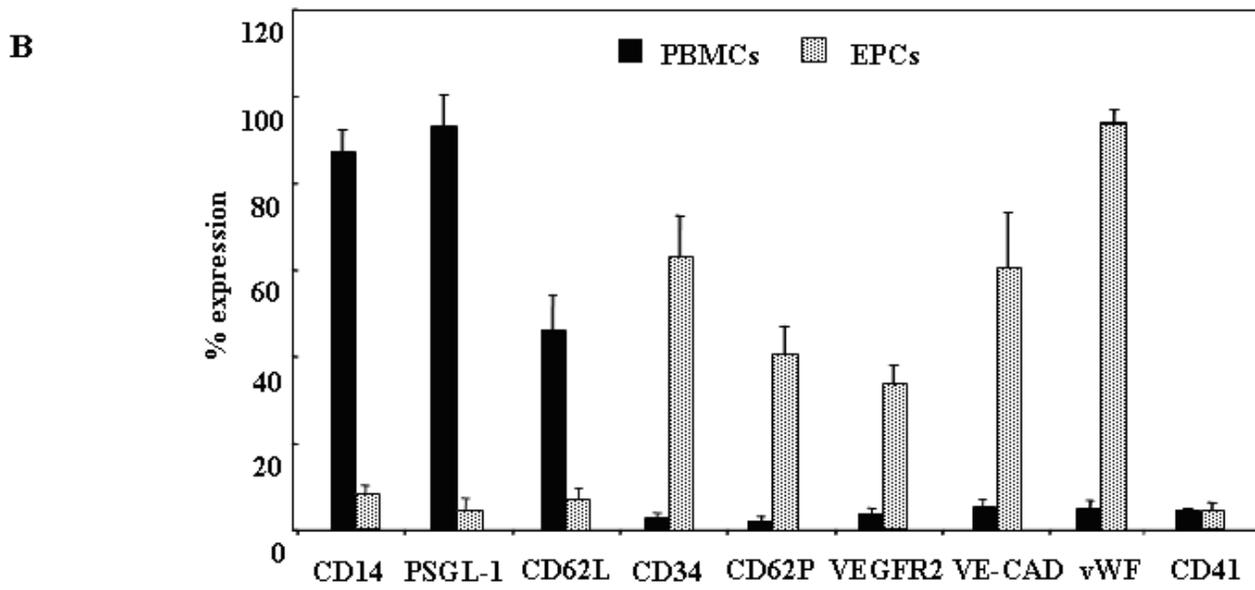
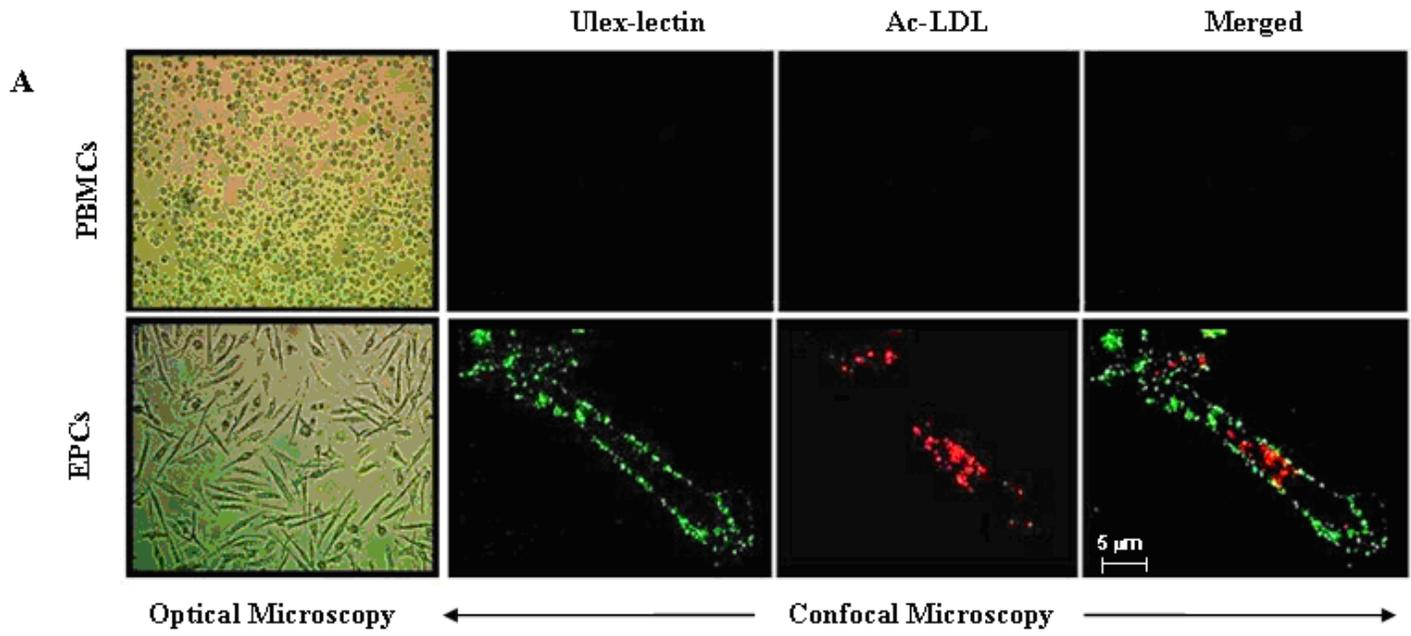


Figure 2

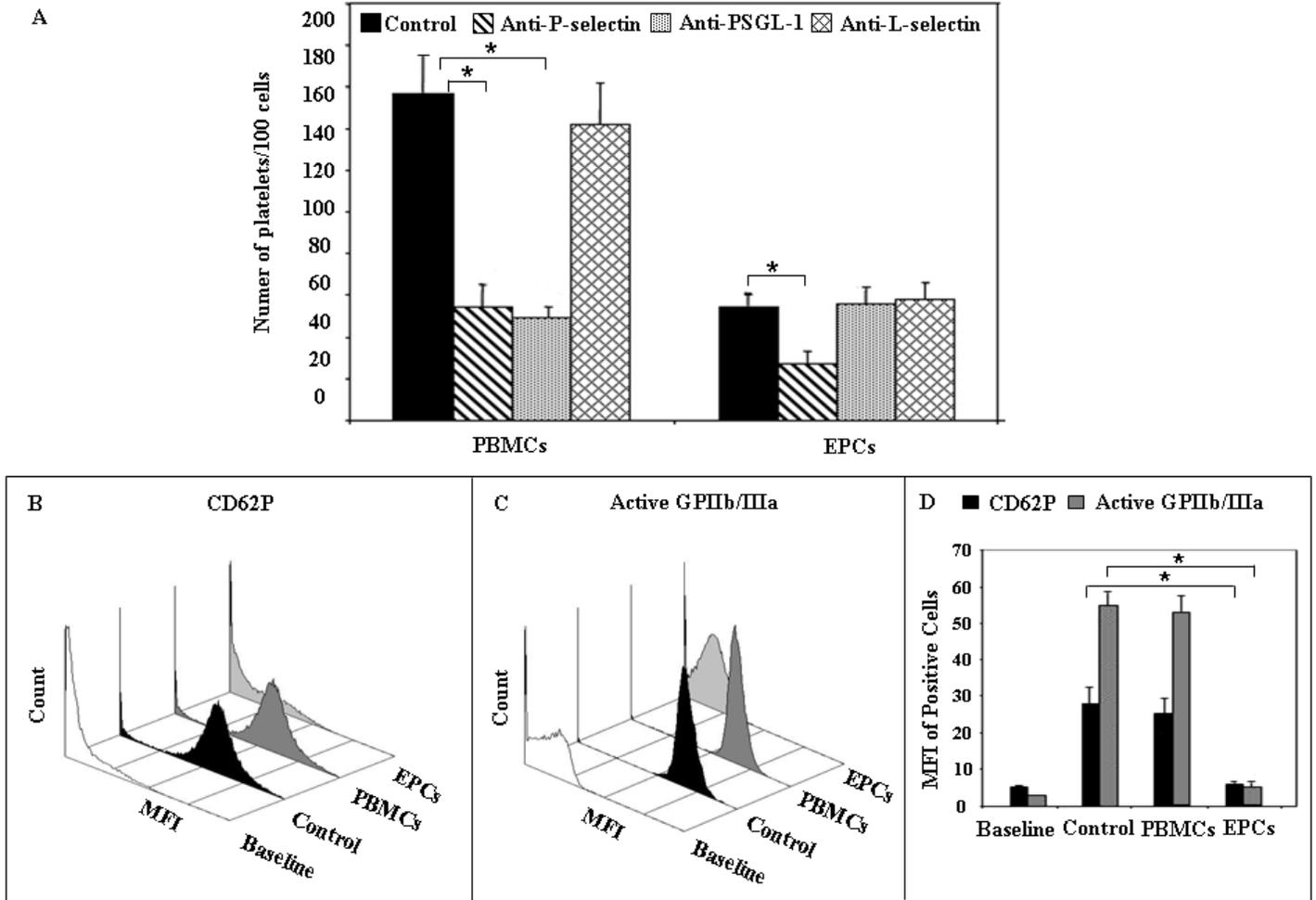


Figure 3

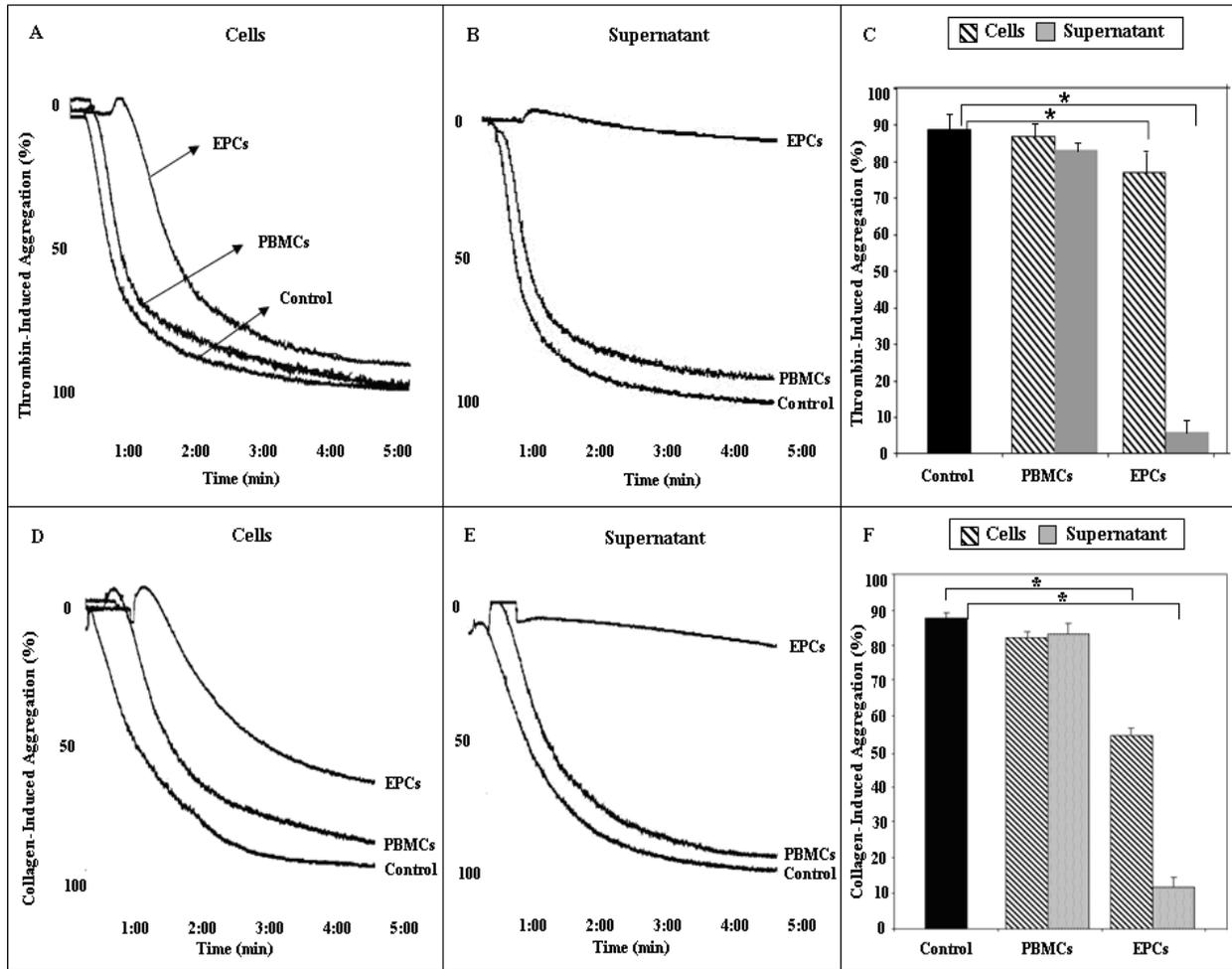


Figure 4

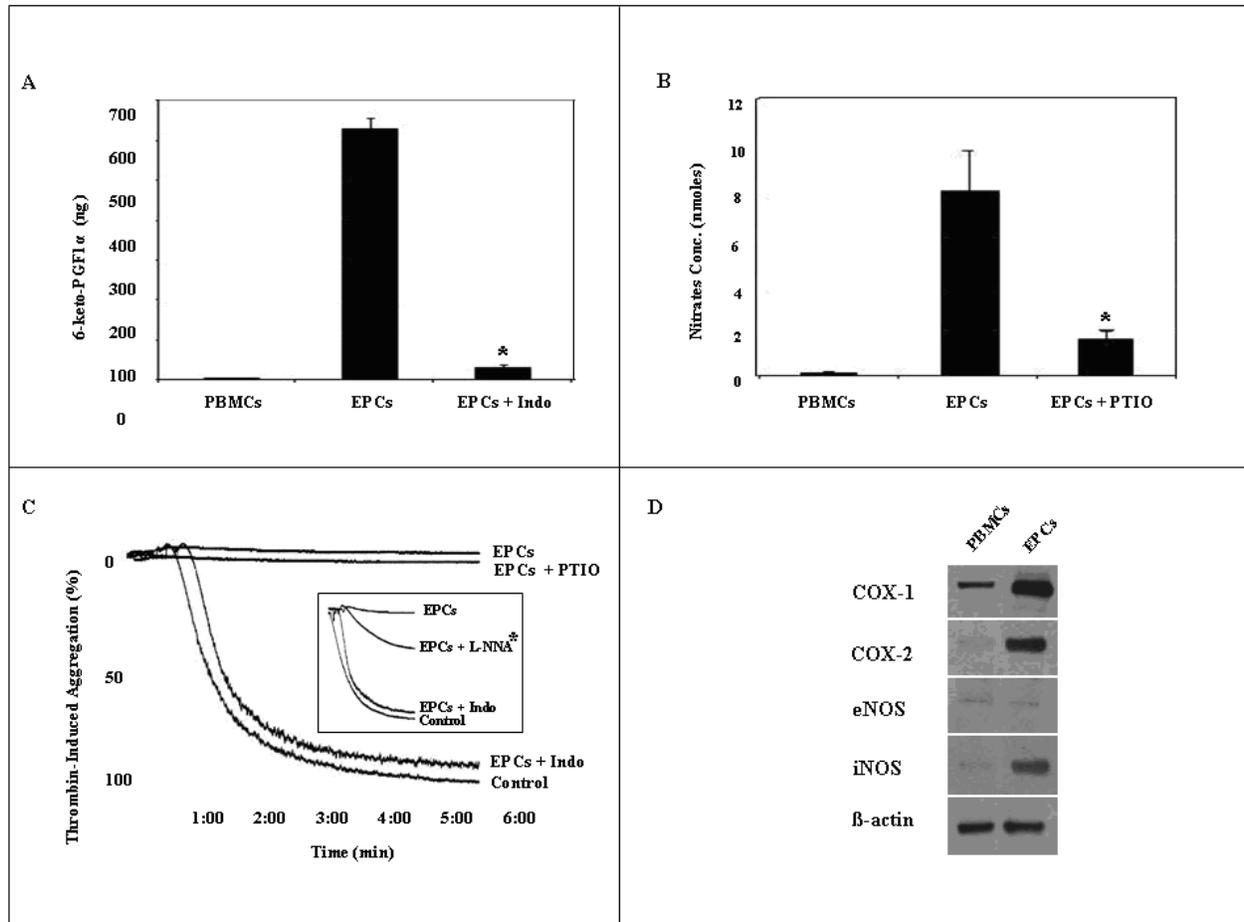


Figure 5

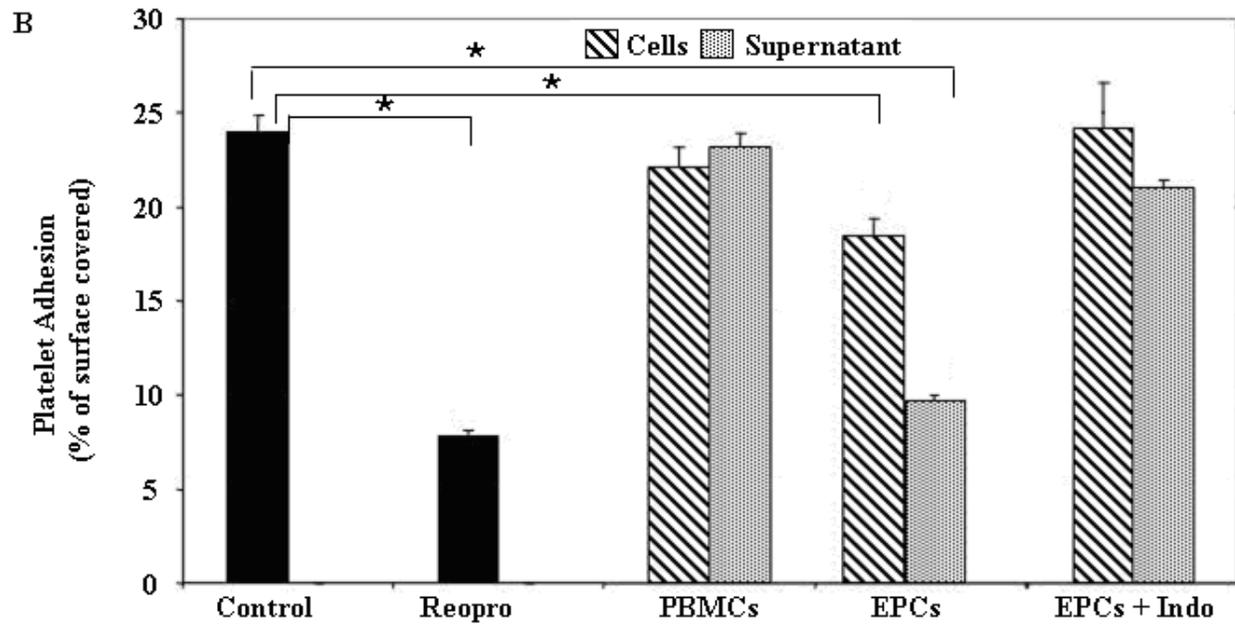
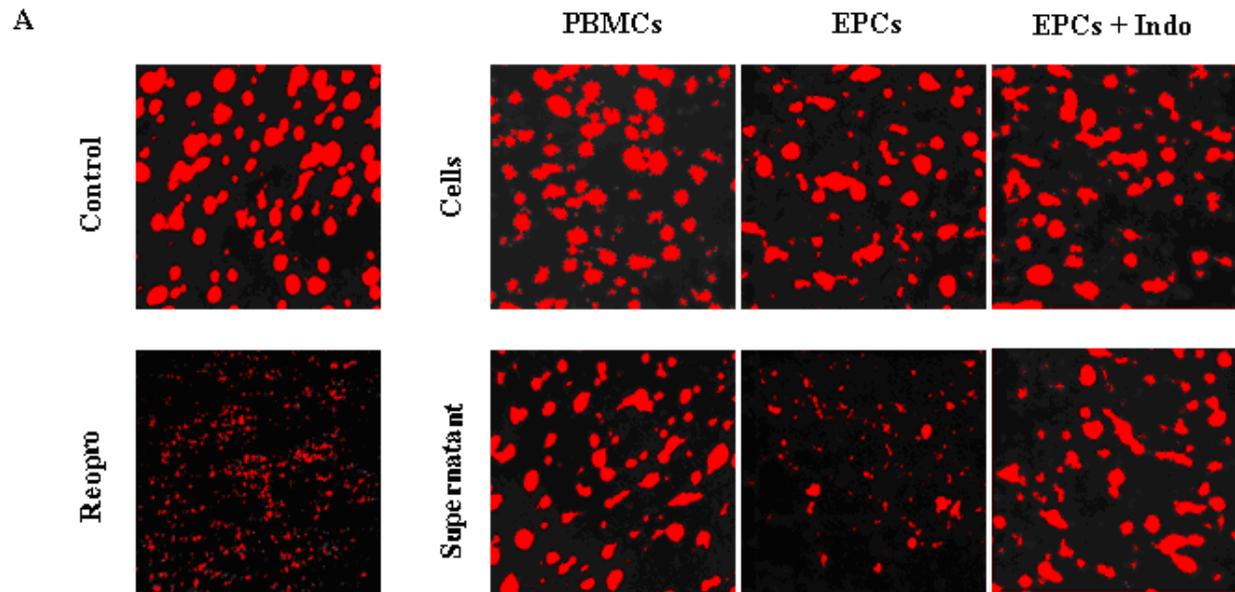


Figure 6

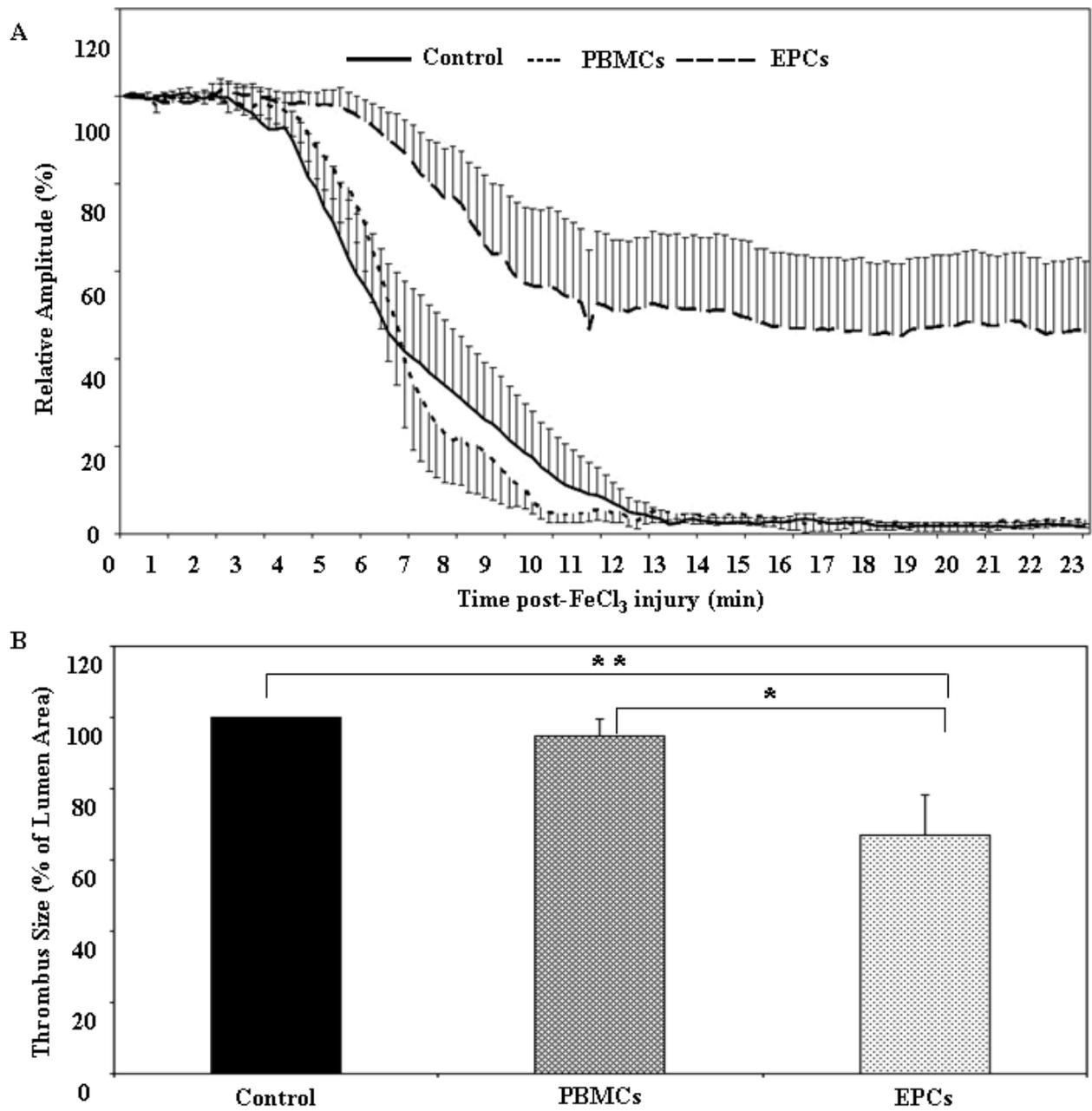
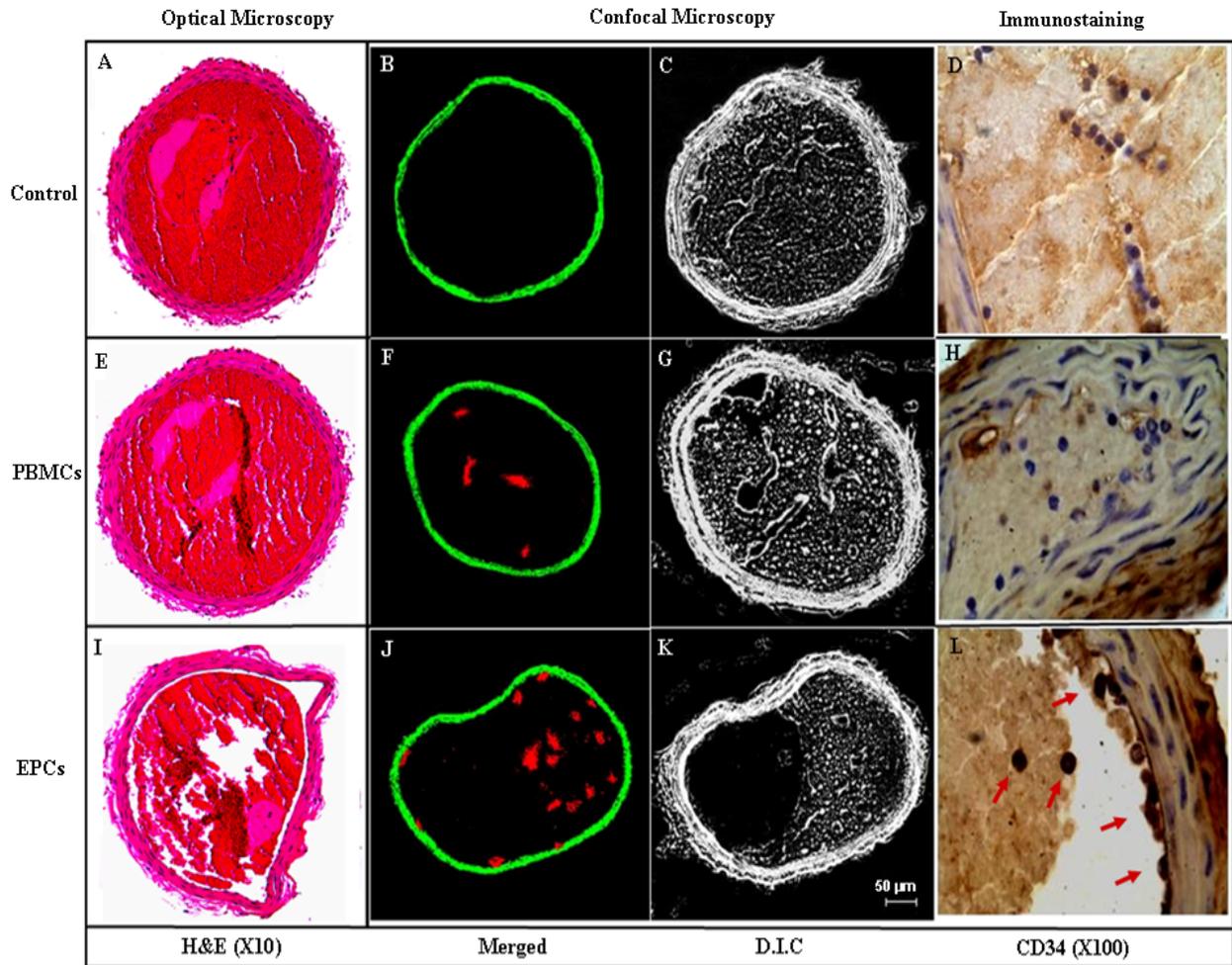


Figure 7



Mise en contexte pour le deuxième article :

Les cellules endothéliales progénitrices réduisent l'agrégation plaquettaire et la thrombose par un mécanisme dépendant de la P-sélectine

Dans notre étude précédente, nous avons démontré que les EPCs interagissent avec les plaquettes et inhibent l'adhésion, l'activation, et l'agrégation plaquettaire et altèrent la formation du thrombus. Ces effets semblent être dépendants de la sécrétion de la PGI₂ par les EPCs en culture. Cette étude vise à déterminer le rôle de la P-sélectine dans ce processus.

Les interactions des EPCs avec les plaquettes sanguines jouent un rôle substantiel dans le processus de réparation des vaisseaux lésés et sont gouvernées par l'expression des molécules d'adhésion spécifiques qui induisent des liaisons homotypiques et hétérotypiques entre les cellules au cours de la réparation vasculaire. Ces interactions adhésives entre les EPCs et les plaquettes peuvent stimuler l'activité fonctionnelle des EPCs et induire la sécrétion d'une variété de substances angiogéniques et thrombo-résistantes qui favorisent le processus d'endothélialisation. Sachant que la liaison des plaquettes activées aux EPCs est médiée essentiellement par l'expression de la P-sélectine plaquettaire qui facilite le recrutement primaire des EPCs sur la monocouche des plaquettes adhérees à la matrice sous-endothéliale, serait-il possible que les effets des EPCs sur l'agrégation plaquettaire et la thrombogenèse soient, eux aussi, dépendants de l'expression de la P-sélectine par les plaquettes ?

Cette étude a été désignée pour mettre en évidence le rôle de la P-sélectine plaquettaire dans le mécanisme d'action des EPCs sur l'agrégation plaquettaire *in vitro* et sur la formation du thrombus, *in vivo*. Ce rôle de la P-sélectine sera investigué dans un modèle de souris déficientes en P-sélectine (P-sel^{-/-}) et chez leurs congénères du type sauvage.

Contribution des auteurs

Haissam Abou-Saleh : Planification et exécution de la majorité des expériences, rédaction et correction de l'article.

Daniel Yacoub et Jean-Francois Théorêt : Exécution de certaines expériences, et correction de l'article.

Marc-Antoine Gillis : Exécution du modèle de thrombose chez la souris.

Maryam Tabrizian : Planification de certaines expériences et correction de l'article.

Yahye Merhi : Planification des expériences, rédaction et correction de l'article, et direction générale.

Essential Role of P-selectin in Endothelial Progenitor Cells-Induced Inhibition of Platelet Aggregation and Thrombus Formation

Haissam Abou-Saleh, MSc; Daniel Yacoub, MSc; Jean-François Théorêt, PhD; Marc-Antoine Gillis, MSc; Maryam Tabrizian, PhD; Yahye Merhi, PhD

Short title: Endothelial progenitor cells and platelet function

Subject Codes: [92] Platelets

[178] Aggregation,

[172] Arterial thrombosis,

[95] Endothelium/vascular type/nitric oxide

Word count: 5602

Status of the manuscript: Under preparation for submission to Circulation Journal

From the Research Center, Montreal Heart Institute and Université de Montréal, Faculty of Medicine (H.A.S., D.Y., J.-F.T., M.-A.G., Y.M.), and McGill University, Center for Biorecognition and Biosensors (M.T.), Montreal, Quebec, Canada.

Correspondence to Yahye Merhi, PhD, Laboratory of Thrombosis and Hemostasis, Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger, Montreal, Quebec, Canada, H1T 1C8; Tel: +514 376-3330 ext. 3035, Fax: +514 376-1355; E-mail: yahye.merhi@icm-mhi.org

Abstract

Background- We have previously shown that Endothelial Progenitor Cells (EPCs) bind and inhibit platelet function and impair thrombus formation, but the surrounding mechanisms that regulate this process have not been fully described. Herein, we addressed the mechanistic action of EPCs on platelet- thrombus formation and we highlighted the role of platelet P-selectin in this process.

Methods and results- EPCs were generated from human peripheral blood mononuclear cells after 10 days of culture on fibronectin in Endocult medium. The impact of EPCs on platelet aggregation and thrombus formation was investigated in P-selectin deficient (P-sel^{-/-}) and their wild-type counterparts (WT) mice. EPCs significantly impaired, in a concentration dependent-manner, collagen-induced whole blood platelet aggregation in WT mice; whereas in P-sel^{-/-} mice, EPCs had no significant effect. Moreover, in FeCl₃-injured arterial thrombosis model, infusion of EPCs significantly reduced thrombus formation in WT, but not in P-sel^{-/-} mice. Furthermore, the number of EPCs recruited within the thrombi and along the vascular wall was visually reduced in P-sel^{-/-} mice as compared to WT mice, and the relative mass of thrombi generated in EPC-treated P-sel^{-/-} mice was significantly larger than that in EPC- treated WT mice.

Conclusions- EPCs impair platelet aggregation and reduce thrombus formation by a cellular mechanism implying binding of platelet P-selectin. These findings add new insights into the role of EPCs in the regulation of platelet function and thrombotic reaction during vascular repair.

Key Words: endothelial progenitor cells ■ platelets ■ thrombosis ■ p-selectin

Introduction

Endothelial progenitor cells (EPCs) play an important role in vascular biology and homeostasis, as they enhance the process of re-endothelialization and neovascularisation of injured and ischemic tissues.¹⁻⁴ Interactions of EPCs with vascular and blood cells can largely influence their biological and functional properties and predict their destiny in the target tissues. More specifically, interactions of EPCs with circulating platelets provide the critical signal to ensure their migration and homing at the sites of vascular injury and their differentiation into endothelial cells.⁵⁻⁹ Indeed, platelets favor the adhesion of EPCs on the sub-endothelial matrix as they constitute a bridging mechanism for the firm arrest of EPCs on collagen surface under dynamic flow *in vitro*, and on the injured vessel wall *in vivo*.^{8, 10} This adhesive interaction between EPCs and platelets may improve EPC function and induce the secretion of various vasoactives substances that can modulate the microenvironment of the lesion, which, in turn, may limit thrombus formation, enhance vascular repair and accelerate the healing process.

Platelet aggregation represents the onset of thrombus formation during endothelial disruption. At the sites of vascular injury, platelets roll and interact with various components of the subendothelial matrix *via* a number of adhesive receptors expressed on the platelet surface.¹¹ This leads to the adhesion and activation of platelets, which is accompanied by the translocation and exposure of P-selectin (CD62P) on the surface membrane. P-selectin, a member of the selectin family of adhesion molecules, is expressed primarily on activated platelets¹² and promotes the interaction of platelets with leukocytes.¹³ In this regard, it has been shown that P-selectin is also involved in the adhesive interaction between platelets and EPCs, an interaction which reportedly dictates their functions during vascular repair.^{5-8, 10, 14} Indeed, previous works have shown that specific inhibition of P-selectin reduces the accumulation of EPCs on the surface of collagen-adherent platelets in parallel-plate flow chambers, and at the sites of endothelial damage.^{8, 10}

The functional impact of EPC interaction with platelets was indirectly explored in a number of studies showing that EPCs participate in the prevention of hybrid graft thrombosis and rejection and late stent thrombosis.¹⁵⁻²⁰ Moreover, in a rat model of chronic thrombosis, transplanted EPCs appear to alter the vein microenvironment by up-regulating cytokines associated with thrombotic re-organization and recanalization.²¹ Taken together, this strongly suggests that EPCs may play a potential role in the management of thrombotic reactions. However, the direct effect of EPCs on

the formation of platelet aggregates, presumably a critical biological event during the initial phase of thrombus formation has not been extensively studied. In this connection, we have recently showed that human EPCs regulate platelet function, via up-regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) and a prostacyclin (PGI₂)-dependent inhibition of platelet activation, aggregation, adhesion, and thrombus formation.²² Given that platelet P-selectin is the major receptor involved in the interaction of EPCs with platelets,^{5, 7, 8} we accordingly hypothesized that the impact of EPCs on platelet aggregation and subsequently, on thrombus formation, occurs through a mechanism that implies binding to platelet P-selectin. We, therefore, designed this study to address this question by assessing platelet aggregation and thrombus formation in wild type (WT) and P-selectin deficient (P-sel^{-/-}) mice. We found that P-selectin plays a critical role in EPC-induced inhibition of platelet aggregation *in vitro*, and thrombus formation *in vivo*. Moreover, we have demonstrated that P-selectin is a determinant adhesive receptor involved in the recruitment of EPCs into the platelet thrombi and along the injured vessel wall. This study adds new insight into the interplay between EPCs and platelets in the maintenance of vascular hemostasis and the management of thrombotic reactions.

Methods

This study has been approved by the human ethical committee of the Montreal Heart Institute. All human subjects were healthy volunteers of either sex, between 20 and 55 years of age. They gave informed consent and were free from any drugs that interfere with platelet function.

Mice

All mice used in this study were handled in accordance with the guidelines of animal use and care at Montreal Heart Institute and were maintained under specific pathogen-free conditions. Female 12 to 14 week-old C57BL/6 P-sel^{-/-} and their counterparts C57BL/6 WT mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). The number of mice used in each group is indicated in the figure legends.

Culture and characterization of EPCs

Human PBMCs were isolated from peripheral blood by centrifugation on a Ficoll density gradient according to the manufacturer's instructions (StemCell Technologies, Vancouver, BC).

Mononuclear cells were then seeded onto fibronectin coated 35-mm diameter 6-well tissue culture plates (BD Biosciences, Mississauga, ON) at a density of 5×10^6 cells/well, and supplemented with EndoCult™ Liquid Medium (StemCell Technologies). After 48 hours, the non-adherent cells were discarded by gentle washing with phosphate buffer saline (PBS), and fresh media was applied. The adherent cells were continually cultured in a complete media that was changed every 48 hours to allow formation of a well-circumscribed monolayer of spindle-shaped cells, as previously described.²³⁻²⁶

Changes in cell morphology during the differentiation process were assessed by optical and confocal microscopy, whereas changes in the expression of cell surface markers were assessed by flow cytometry, as extensively described in our previous study.²² Briefly, Direct fluorescent staining was used to detect the binding of FITC-Conjugated Ulex-lectin and the uptake of Dil-Acetylated Low Density Lipoprotein (Ac-LDL) by laser confocal microscopy. The expression of monocyte and progenitor/endothelial surface markers on freshly isolated PBMCs and EPCs were assessed by flow cytometry using saturating concentrations of mouse anti-human PE-conjugated monoclonal antibodies (mAbs) against CD14 (AbD Serotec, Raleigh, NC), CD34 (BD Biosciences) and VEGF Receptor 2 (VEGFR2, Abcam, Cambridge, MA) as described previously.²²

Platelet aggregation

Heparinized blood was collected by heart puncture of anesthetized mice, as previously described,²² and aggregation was monitored in a 4 channel whole blood aggregometry (Chrono-log corp, Havertown, PA), according to the manufacture's instructions. Briefly, 0.4 mL of whole blood was diluted with 0.4 mL of saline solution and gently swirled. Culture media (200 μ L) or EPCs (125×10^3 to 500×10^3 cells/200 μ L) was pre-incubated at 37°C with diluted blood samples and platelet aggregation was induced by collagen (3 μ g/mL, Chrono-log corp) at 37°C with a stirring speed of 1000 rpm. Results are expressed as the change in electrical impedance (ohms) after 5 minutes aggregation time.

Mouse carotid thrombosis

The impact of cultured EPCs (125×10^3 to 500×10^3 cells) on thrombus formation was determined in a FeCl₃- mouse carotid injury model, according to a standardized protocol

protocol,²⁷ as previously described.²² Control experiments were done with culture media alone. Briefly, C57BL6 mice of either P-sel^{-/-} or WT group (Jackson Laboratory) were anesthetized with a mixture of ketamine (Vetalar: 1.5 mg/kg I.P., Bioniche, Belleville, ON) and medetomidine (Domitor: 1 mg/kg I.P., Pfizer, Kirkland, QC) and the right carotid artery was carefully exposed. A miniature ultrasound flow probe (0.5 VB 552; Transonic Systems, Ithaca, NY), interfaced with a flow meter (T206; Transonic Systems) and a computer-based data acquisition program (Iox 2.2.17.19, Emka, Falls Church, VA), was positioned around the artery. After measuring baseline blood flow, a 0.5 × 1.0-mm strip of filter paper (Whatman no. 1) soaked in 6.5% FeCl₃ was applied on the adventitial surface proximal to the flow probe for 3 min, after which blood flow and time to thrombotic occlusion (blood flow of 0 mL/min) were monitored.

Histology, immunostaining and confocal fluorescence

After completion of *in vivo* flow measurements in mice, the injured and the contralateral non-injured carotids were excised and fixed in 10% buffered Formalin (Starplex Scientific Inc., Etobicoke, ON). These arterial segments were then embedded in paraffin, sectioned at 6 microns, and stained with hematoxylin and eosin, or an anti-CD34 antibody (Santa Cruz). Samples were visualized using an Olympus BX60 microscope (Olympus imaging America Inc., Center Valley, PA) and the computerized morphometric analyses were performed using a Retiga 2000R camera (QImaging Corporation, Surrey, BC), and Image Pro Plus 6.2 software (Media Cybernetics, Bethesda, MD).

For confocal fluorescence, 500 × 10³ EPCs were labeled with an intracellular fluorescence marker (CellTrackerTM CM-DiI, Molecular Probes) according to the manufacturer's instructions. Non-labeled PBMCs were used as negative control. Cells were then washed with PBS, resuspended in fresh media and injected intravenously, and allowed to circulate for 15 minutes prior to injury. The injured, as well as the contralateral non-injured carotids, were immediately excised after completion of the blood flow measurements and immersed in liquid nitrogen. Labeled EPCs incorporated into the luminal aspect of arterial thrombi were observed on cryostat sections of 14-μm thickness using confocal microscopy.²²

Statistical analysis

All data are presented as mean \pm SEM of at least 4 independent experiments. The exact number of experiments for each test is indicated in the figure legends. Statistical comparisons were done using a one-way ANOVA, followed by Benferroni multiple comparisons test. Data with $P < 0.05$ were considered statistically significant.

The authors had full access to and take full responsibility for the integrity of the data. All authors have read and agree to the manuscript as written.

Results

Characterization of EPCs

We followed the differentiation of PBMCs into EPCs *in vitro* using optical and confocal microscopy. As shown in Figure 1, freshly isolated PBMCs at day 0 appear as single cells with rounded morphology. Cultured in conditioned media, PBMCs start to assemble in colonies-like structures with irregular size after 3 days of culture. At day 5, the colonies became more organized and consist of a central cluster of round cells and sprouts of elongated cells at the periphery, a characteristic of the Colony Forming Units-Endothelial Cells (CFU-EC). After 10 days, the cells form a monolayer of spindle-shaped flat cells characteristic of Endothelial Colony-Forming Cells (ECFC). These cells were positive for Dil-AcLDL uptake and Ulex-lectin binding (data not shown).

To further characterize the differentiation of PBMCs into EPCs, we employed flow cytometry to quantify the expression of typical markers on the surface of the cells during their differentiation (Figure 2). Cells were gated with respect to CD14/CD34 expression. We observed that freshly isolated PBMCs highly expressed the pan-leukocyte markers CD14 ($86\% \pm 2\%$) whereas the progenitor/endothelial markers CD34 and VEGFR2 were missing (Figure 2, black overlay plots and bar graphs). After 10 days of culture, the progenitor/endothelial markers were expressed ($56\% \pm 2\%$ CD34 and $30\% \pm 5\%$ VEGFR-2), whereas the leukocyte marker CD14 was absent (Figure 2, gray overlay plots and bar graphs). Based on these characteristics, we used EPCs after 10 days in culture in the following experiments as it has been described in our previous study.

EPCs inhibit platelet aggregation and thrombus formation via a platelet P-selectin-dependent pathway

The effect of EPCs on the formation of platelet thrombi was first assessed on the aggregation process *in vitro*. Addition of EPCs to whole blood of WT mice inhibited collagen-induced platelet aggregation in a concentration-dependent manner, ranging from 22% inhibition with 125×10^3 EPCs to 75% inhibition with 500×10^3 EPCs (Figure 3A and 3B). In contrast, EPCs were unable to significantly affect platelet aggregation in P-selectin^{-/-} mice (Figure 3C and 3D).

Having shown the importance of platelet P-selectin in mediating the inhibitory effect of EPCs on platelet aggregation, we sought its role on thrombus formation *in vivo* using a murine model of carotid thrombosis. Intravenous injection of increasing concentrations of EPCs in WT mice resulted in an increment of arterial blood flow and prolongation of the time to occlusion in a concentration-dependent manner (Figure 4). As for platelet aggregation, the highest rates of blood flow were reached with a concentration of 500×10^3 EPCs/mouse. In marked contrast, the effects of EPCs on thrombus formation were not observed in P-selectin^{-/-} mice, in which injection of 500×10^3 EPCs had similar blood flows to control treated mice that received culture media (Figure 4 insert).

To further analyze the characteristics of the formed thrombi, FeCl₃-injured carotid arteries from WT and P-selectin^{-/-} mice were fixed immediately after completion of blood flow measurements and subjected to histological and morphometrical analysis. Carotids, excised from mice treated with culture media, were used as negative control. The circumferences of the arteries and thrombi were measured by computer-assisted planimetry, and the thrombus size was reported as percentage of total lumen area. In comparison to control- and PBMC- treated mice, in which thrombus was completely occlusive (Figure 5A, panels A and B), thrombus size from EPC-treated WT mice (500×10^3 cells) was significantly reduced by 47% (Figure 5A panel C and Figure 5B). In contrast, P-selectin^{-/-} mice treated with the same concentration of EPCs, showed no significant reduction in thrombus size and the thrombus formed was almost occlusive (Figure 5A, panel D and Figure 5B).

Hence, these results indicate that treatment of P-selectin^{-/-} mice with EPCs had no detectable effects on platelet aggregation or thrombus formation. This suggests that the presence of P-selectin is of utmost importance, first to promote the interaction between EPCs and platelets and second, to sustain their mechanism of action on platelet aggregation and thrombus formation.

Recruitment of EPCs to the sites of injury depends on platelet P-selectin

The role of P-selectin in the regulation of EPCs on thrombus formation was further depicted by analyzing the recruitment of EPCs into the injured sites. FeCl₃-injured carotid arteries from EPC- and PBMC-treated mice, from both WT and P-sel^{-/-} groups, were immediately fixed following blood flow measurements and were subjected to fluorescence confocal and immunohistochemical analysis. EPCs were labeled with a photostable fluorescent cell tracker prior to their intravenous injection in the mouse. Labeled EPCs were identified in the luminal aspect of the thrombi and appear as a cluster of red fluorescent clumps in the carotids of WT mice (Figure 6, panel D), while thrombi from P-sel^{-/-} mice showed significantly less incorporation, as testified by the decrease in positive fluorescence obtained by the animals (Figure 6, panel G). Injured arteries from unlabelled PBMC-treated mice, used as negative control, were void from any staining (Figure 6, panel A). In accordance with morphometrical analysis, thrombi mass generated in PBMC-treated mice showed complete occlusion of the carotid arteries (Figure 6, panel B) whereas, carotids from mice treated with 500 x 10³ EPCs gave a significantly smaller thrombi mass, indicative of a partial occlusion of the respective arteries (Figure 6, panel E). As expected, thrombi mass was majorly occlusive in P-sel^{-/-} mice treated with 500 x 10³ EPCs (Figure 6, panel H).

In another set of experiments, cross-histological sections of injured arteries from PBMC- and EPC-treated mice were immunostained with an anti-CD34 antibody. CD34 positive cells were uniformly distributed within the thrombus and along the vascular wall in EPC-injected mice from WT group (Figure 6, panel F), but poorly distributed in mice from P-sel^{-/-} group (Figure 6, panel I). The carotids of PBMC-treated mice (negative control) showed no staining (Figure 6, panel C).

In sum, these results confirm that, in addition to its role in mediating the adhesive interaction of EPCs with platelets, P-selectin promotes and sustains the anti-thrombotic effects of EPCs on platelet aggregation, and thrombus formation.

Discussion

The present study provides novel insights into the biology of PBMCs-derived EPCs and their interaction with activated platelets. Specifically, we addressed the molecular requirements and the mechanistic action of EPCs on platelet aggregation and thrombus formation, and have highlighted the role of platelet P-selectin in this process. We found that EPCs inhibit platelet aggregation *in vitro*, incorporate into the formed thrombi and along the vessel walls, and reduce thrombus extent *in vivo*. Moreover, we provide evidence that the inhibitory action of EPCs on platelet aggregation and thrombus formation is largely platelet P-selectin dependent.

Arterial thrombosis with its clinical cardiovascular complications is a multi-step process which is initiated by the formation of a platelet aggregate in the cavity of the artery. Depending on the mass of the generated thrombus, partial or complete obstruction of the blood flow may occur within the injured artery which can lead in the case of coronary arteries to the acute coronary syndrome and myocardial infarction. This process is governed by specific cell adhesion molecules (CAMs) which induce homotypic and heterotypic binding between platelets and other blood cells.^{28, 29} Among these CAMs, P-selectin has emerged as an important cell-cell interaction mediator which contributes, among others, to the recruitment of blood leukocytes¹³ and circulating EPCs.^{5-8, 10, 14} In addition to its role in thrombosis and inflammation, P-selectin has been shown to induce migration, homing and differentiation of EPCs at the sites of vascular lesion.⁵⁻⁹

The role of EPCs in the maintenance of vascular integrity and as "repair" cells in response to endothelial injury is well recognized. Indeed, EPCs circulate within the blood as "surveillance cells," encountering only transitory contacts with the intact vascular endothelium. When vessel damage occurs, EPCs are sued to engage, via autocrine and paracrine mechanisms, in the normal response to injury. Requirement of vascular repair is communicated to circulating EPCs by adherent/aggregated platelets at sites of vessel damage.

The use of *ex vivo*-expanded EPCs has been shown to improve re-endothelialization and neovascularization of ischemic hind limbs and ischemic hearts in animal models, as well as in the prevention of hybrid graft thrombosis, restenosis and rejection.^{15-20, 30, 31} In particular, in a rat model of chronic thrombosis, transplanted EPCs appear to alter the vein microenvironment by up-regulating cytokines associated with thrombic re-organization and recanalization.²¹ Moreover, recent clinical studies have provided ample evidence that the use of EPC- capture stent

conceivably limit the cascade of events leading to acute or subacute stent thrombosis and late stent thrombosis.^{19, 20} Taken together, these results point out to the potential role that EPCs may play in the management of thrombotic reactions. However, the direct effect of EPCs on the formation of platelet aggregates, presumably a critical biological event during the initial phase of thrombus formation has not been extensively studied. Nevertheless, in our previous work, we have demonstrated that EPCs bind and inhibit platelet aggregation, *in vitro*, and reduce thrombus formation *in vivo*.²² However, the lower numbers of EPCs incorporated into the capillaries after ischemia in some experimental studies may not explain the strong therapeutic effect observed after cell therapy.³²⁻³⁴ Therefore, the efficiency of EPC-induced neovascularization may not solely be due to the incorporation of EPC into newly formed vessels, but may also be influenced by the release of pro-angiogenic factors in paracrine manner. Indeed, data from our previous study²² and from other research reports have shown that EPCs can release various vasoactive substances in the microenvironment of the injury including angiogenic and growth factors, vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor, stromal-derived factor, granulocyte colony-stimulating factor, insulin-like growth factor as well as prostacycline (PGI₂) and nitric oxide (NO).^{8, 9, 18, 21, 24, 35-37} In fact, PGI₂ and NO are well known thrombo-resistant factors which are released from EPCs in a high output in response to various stimuli.^{18, 22} The release of anti-platelet mediators near the damaged endothelium can enhance angiogenesis, inhibiting platelet aggregation and limit thrombogenesis.^{22, 38, 39} In tissues, PGI₂ and NO act in paracrine manner and have a short-life period as they are rapidly scavenged or metabolized. This may explain, in part, our observations that the inhibitory effects of EPCs on platelet thrombi require a functional link between EPCs and platelets to be fully realized. In this regard, it has been shown that P-selectin can mediate the rolling of platelets on activated endothelium and various cell type including EPCs. This adhesive interaction between EPCs and platelets *via* P-selectin may enhance EPC activity and induce the generation of intracellular signals leading to the secretion of various vasoactives and anti-thrombotic substances that can modulate the microenvironment of the lesion and alter thrombus formation. However, this issue needs to be further addressed in detail.

In our study, we have shown that the inhibitory effects of EPCs on platelet aggregation and thrombus formation were mediated by EPC-platelet interactions *via* P-selectin-dependent pathway. Our findings are in accordance with studies from other groups showing that blockade or

lack of P-selectin drastically reduced the accumulation of EPCs on the surface of adherent platelets on collagen under flow, and at the sites of endothelial denudation.^{8, 10} Accordingly, we have adequately succeeded to demonstrate that in P-selectin deficient mice, the lack of P-selectin had substantially compromised the adhesive interaction between EPCs and platelets and consequently reversed the inhibitory effect of EPCs on platelet aggregation *in vitro*, and thrombus formation *in vivo*. The importance of platelet interactions with EPCs was further depicted in the recruitment of EPCs at the sites of injury. We have found that, indeed, the proportion of EPCs recruited within the thrombus and along the vessel wall was diminished in P-sel^{-/-} compared to WT mice. These findings may be of important physiological relevance in the process of vascular healing since EPCs must integrate into blood vessels and platelet thrombi to improve neovascularization and limit thrombogenesis.

Our data reveals a new biological role for the interaction between EPCs and platelets *via* P-selectin in the regulation of platelet aggregation and thrombotic reactions during vascular injury. Thus, platelet P-selectin contributes to the trapping of EPCs, which may in turn limit thrombogenesis and maintain hemostasis at the sites of vascular injury.

Acknowledgements

We are grateful to M. Louis Villeneuve for his technical assistance with confocal microscopy.

Sources of Funding

This study was supported by grants from the Canadian Institute for Health Research (MOP-82767 for YM; and RMF-79023 for MT & YM).

Disclosure

None.

References

1. Wassmann S, Werner N, Czech T, et al. Improvement of endothelial function by systemic transfusion of vascular progenitor cells. *Circ Res*. Oct 13 2006;99(8):e74-83.
2. Kong D, Melo LG, Gneccchi M, et al. Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries. *Circulation*. Oct 5 2004;110(14):2039-2046.
3. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. Feb 14 1997;275(5302):964-967.
4. Griese DP, Ehsan A, Melo LG, et al. Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy. *Circulation*. Nov 25 2003;108(21):2710-2715.
5. Daub K, Langer H, Seizer P, et al. Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells. *Faseb J*. Dec 2006;20(14):2559-2561.
6. de Boer HC, Verseyden C, Ulfman LH, et al. Fibrin and activated platelets cooperatively guide stem cells to a vascular injury and promote differentiation towards an endothelial cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Jul 2006;26(7):1653-1659.
7. Lev EI, Estrov Z, Aboulfatova K, et al. Potential role of activated platelets in homing of human endothelial progenitor cells to subendothelial matrix. *Thromb Haemost*. Oct 2006;96(4):498-504.
8. Massberg S, Konrad I, Schurzinger K, et al. Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *J Exp Med*. May 15 2006;203(5):1221-1233.
9. Stellos K, Langer H, Daub K, et al. Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human CD34+ cells to endothelial progenitor cells. *Circulation*. Jan 15 2008;117(2):206-215.
10. Langer H, May AE, Daub K, et al. Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro. *Circ Res*. Feb 3 2006;98(2):e2-10.
11. Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med*. Dec 13 2007;357(24):2482-2494.

12. Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, et al. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol.* Sep 1985;101(3):880-886.
13. Rinder CS, Bonan JL, Rinder HM, et al. Cardiopulmonary bypass induces leukocyte-platelet adhesion. *Blood.* Mar 1 1992;79(5):1201-1205.
14. Stellos K, Gawaz M. Platelet interaction with progenitor cells: potential implications for regenerative medicine. *Thromb Haemost.* Nov 2007;98(5):922-929.
15. Aoki J, Serruys PW, van Beusekom H, et al. Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34: the HEALING-FIM (Healthy Endothelial Accelerated Lining Inhibits Neointimal Growth-First In Man) Registry. *J Am Coll Cardiol.* May 17 2005;45(10):1574-1579.
16. Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, et al. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med.* Sep 2001;7(9):1035-1040.
17. Shirota T, Yasui H, Shimokawa H, et al. Fabrication of endothelial progenitor cell (EPC)-seeded intravascular stent devices and in vitro endothelialization on hybrid vascular tissue. *Biomaterials.* Jun 2003;24(13):2295-2302.
18. Shirota T, He H, Yasui H, et al. Human endothelial progenitor cell-seeded hybrid graft: proliferative and antithrombogenic potentials in vitro and fabrication processing. *Tissue Eng.* Feb 2003;9(1):127-136.
19. Co M, Tay E, Lee CH, et al. Use of endothelial progenitor cell capture stent (Genous Bio-Engineered R Stent) during primary percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction: intermediate- to long-term clinical follow-up. *Am Heart J.* Jan 2008;155(1):128-132.
20. Miglionico M, Patti G, D'Ambrosio A, et al. Percutaneous coronary intervention utilizing a new endothelial progenitor cells antibody-coated stent: a prospective single-center registry in high-risk patients. *Catheter Cardiovasc Interv.* Apr 1 2008;71(5):600-604.
21. Li XQ, Meng QY, Wu HR. Effects of bone marrow-derived endothelial progenitor cell transplantation on vein microenvironment in a rat model of chronic thrombosis. *Chin Med J (Engl).* Dec 20 2007;120(24):2245-2249.
22. Abou-Saleh H YD, Théorêt JF, Gillis MA, Neagoe PE, Labarthe B, Thérroux P, Sirois MG, Tabrizian M, Thorin E, Merhi Y. Endothelial progenitor cells bind and inhibit platelet function and thrombus formation. *Circulation (under review).* 2009.
23. Krenning G, Dankers PY, Jovanovic D, et al. Efficient differentiation of CD14+ monocytic cells into endothelial cells on degradable biomaterials. *Biomaterials.* Mar 2007;28(8):1470-1479.

24. Rehman J, Li J, Orschell CM, et al. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*. Mar 4 2003;107(8):1164-1169.
25. Hur J, Yoon CH, Kim HS, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Feb 2004;24(2):288-293.
26. Yoder MC, Mead LE, Prater D, et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*. Mar 1 2007;109(5):1801-1809.
27. Konstantinides S, Schafer K, Thinner T, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 and its cofactor vitronectin stabilize arterial thrombi after vascular injury in mice. *Circulation*. Jan 30 2001;103(4):576-583.
28. Jang Y, Lincoff AM, Plow EF, et al. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. Dec 1994;24(7):1591-1601.
29. Nash GB. Adhesion between neutrophils and platelets: a modulator of thrombotic and inflammatory events? *Thromb Res*. 1994;74 Suppl 1:S3-11.
30. Kunz GA, Liang G, Cuculi F, et al. Circulating endothelial progenitor cells predict coronary artery disease severity. *Am Heart J*. Jul 2006;152(1):190-195.
31. George J, Herz I, Goldstein E, et al. Number and adhesive properties of circulating endothelial progenitor cells in patients with in-stent restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Dec 2003;23(12):e57-60.
32. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 28 2000;97(7):3422-3427.
33. Urbich C, Heeschen C, Aicher A, et al. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation*. Nov 18 2003;108(20):2511-2516.
34. Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, et al. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation*. Mar 11 2003;107(9):1322-1328.
35. Urbich C, Aicher A, Heeschen C, et al. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol*. Nov 2005;39(5):733-742.

36. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*. Mar 30 2004;109(12):1543-1549.
37. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res*. Mar 19 2004;94(5):678-685.
38. Luscher TF, Noll G. The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. *Atherosclerosis*. Dec 1995;118 Suppl:S81-90.
39. Mayr U, Zou Y, Zhang Z, et al. Accelerated arteriosclerosis of vein grafts in inducible NO synthase(-/-) mice is related to decreased endothelial progenitor cell repair. *Circ Res*. Feb 17 2006;98(3):412-420.

Figure legends

Figure 1: Adherence, sequential changes and development of cultured cells are observed under inverted optical microscopy. A) At day 0, freshly isolated PBMCs were plated on fibronectin and the majority was non-adherent cells with rounded morphology. B) At day 3, the adherent cells appeared either as single cells or as irregular colony-like structures. C) At day 5, colonies are more defined and comprise a central cluster of round cells with elongated spindle-like cells at the periphery. D) At day 10, cells showed a flat monolayer of spindle-shaped cells.

Figure 2: A) Representative overlay plots showing the expression of cell surface markers, as determined by flow cytometry. Single color immunostaining of freshly isolated PBMCs at day 0 (black plots) and culture-derived EPCs at day 10 (gray plots), was performed with saturating concentrations of mouse anti-human PE-conjugated monoclonal antibodies directed against CD14, CD34 and VEGFR2 surface markers. Overlay plots shown are presented as the number of events over the log of associated fluorescence. B) Histogram represents the mean data \pm SEM of at least 4 independent experiments of cell surface markers expression as assessed by flow cytometry.

Figure 3: Effect of EPCs on collagen-induced platelet aggregation. Representative traces of whole mouse blood aggregation from WT mice (A) or from P-sel^{-/-} mice (C). Blood was pre-incubated with different concentrations of EPCs in a 4-channel lumi-aggregometer under shear (1,000 rpm) at 37°C. Platelet aggregation was initiated by adding collagen and then monitored for 5 minutes. B and D) The mean data \pm SEM of 5 independent experiments, summarizing the effects of different EPC concentrations on collagen- induced platelet aggregation in WT and P-sel^{-/-} mice.

Figure 4: Inhibitory effect of EPCs on thrombus formation in the carotid artery of WT mice infused with 125×10^3 cells/mouse (n =7), 250×10^3 cells/mouse (n = 7), or 500×10^3 cells/mouse (n = 7). Control mice were infused with culture media (n = 7). Insert: Thrombus formation in P-sel^{-/-} mice infused with culture media (n = 7) and the effects of EPCs infused at a concentration of 500×10^3 cells/mouse (n = 7) Culture media or cells were infused and allowed

to circulate for 5 minutes, followed by application of FeCl₃ for 3 minutes, blood flow was continuously monitored for 23 minutes post-FeCl₃ injury.

Figure 5: A) Representative histological transverse sections of FeCl₃-injured mouse carotid arteries treated with EPCs, PBMCs, or culture media (control) and stained with hematoxylin and eosin. (Magnifications X20). Arterial thrombus mass was completely occlusive in control- and PBMC-treated mice (panels A & B) and partially occlusive in arteries from EPC-treated mice (panel C). Panel D represent the injured artery from P-sel^{-/-} treated with 500 x 10³ EPCs. B) Bar graphs show the mean data ± SEM (n = 4) of cross-sectional area of arterial thrombi expressed as percentage of lumen area.

Figure 6: Photomicrographs show fluorescent confocal imaging and immunostaining of mouse carotid arteries after vascular injury. EPCs were labeled with intracellular fluorescence marker (DiI) 1 hour prior to injection in WT (Panel D) and P-sel^{-/-} (Panel G) mice and assessed by confocal fluorescence on cryostat cross-sections. Panel A represent the injured arteries from non-labeled PBMC-treated mice used as negative control. The corresponding Differential Interference Contrast (D.I.C) of the identical sections of each carotid is shown on the right (panels B, E & H). (Scale bar = 50 μm). Anti-CD34 immunostaining of the injured arteries in EPC-treated mice show that CD34 positive cells were uniformly distributed within the thrombus and along the vessel wall in WT - but poorly distributed in P-sel^{-/-} mice confirming the recruitment of EPCs to the luminal aspect of arterial thrombi *in vivo* (arrows in F and I). The cells in C are CD34 negative. The images are representative of at least 4 independent experiments.

Figure 1

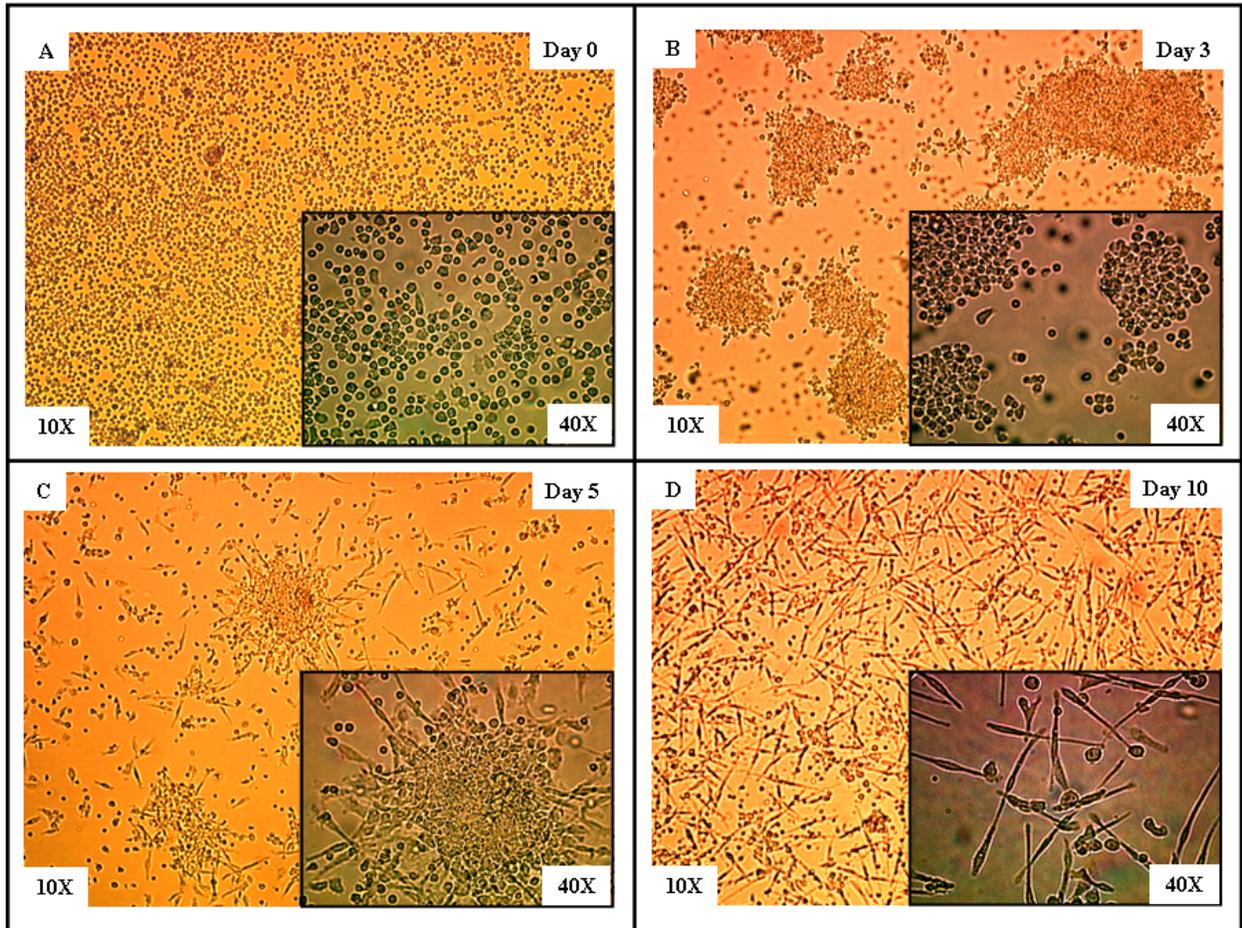


Figure 2

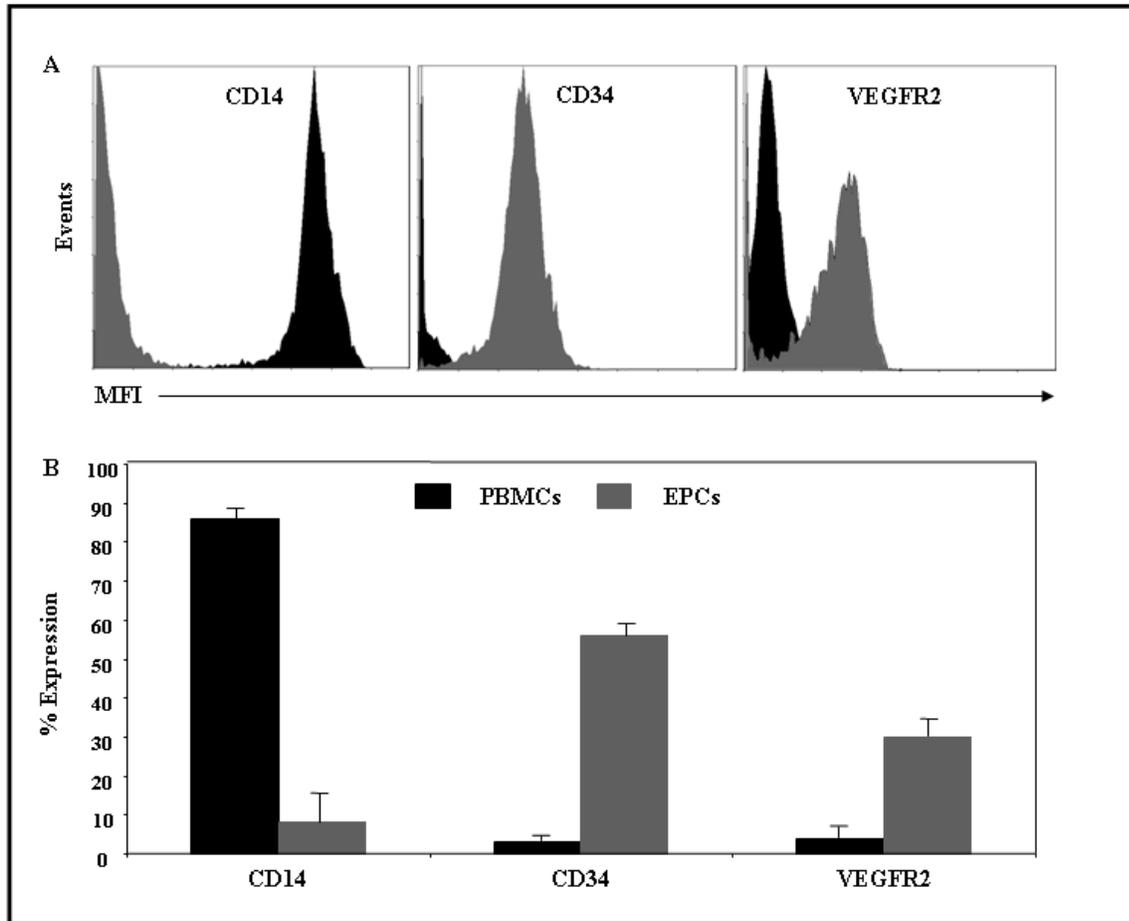


Figure 3

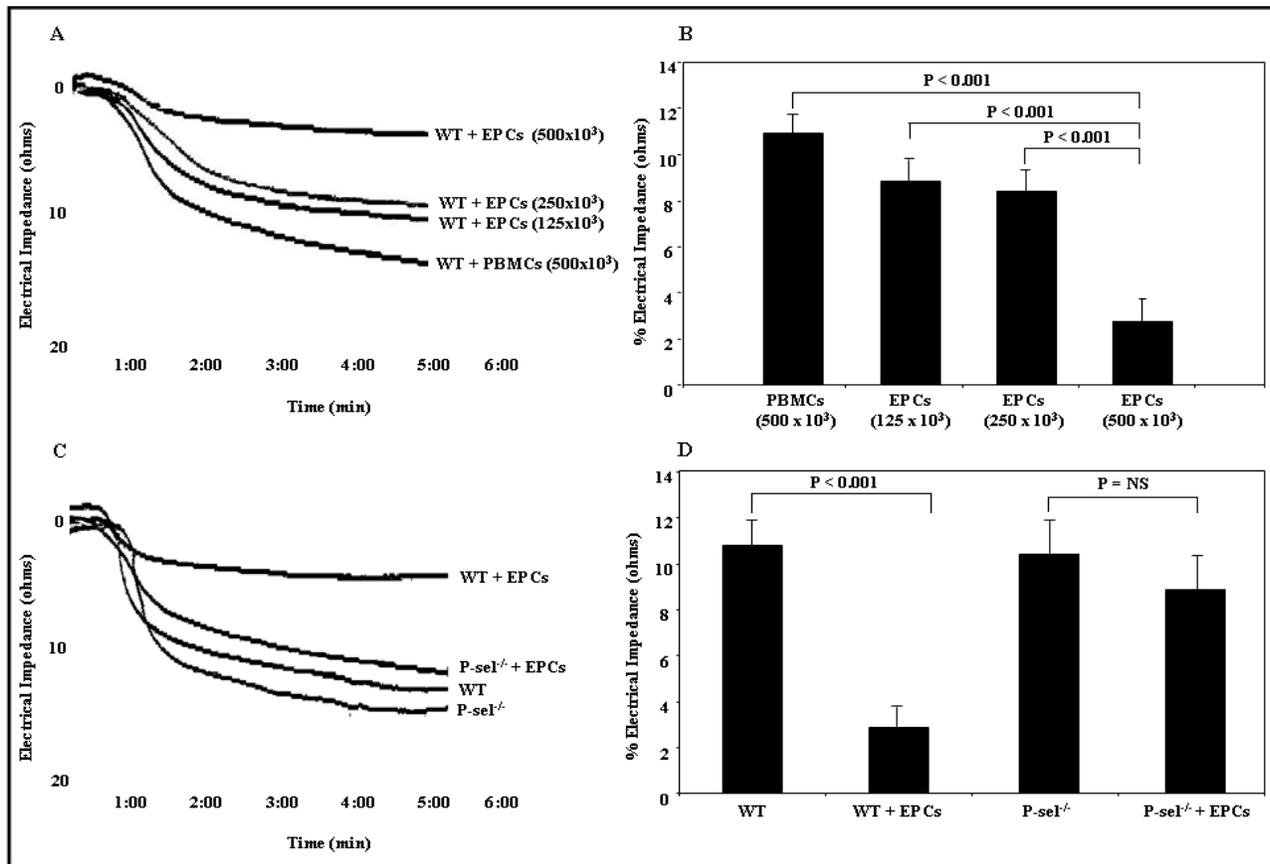


Figure 4

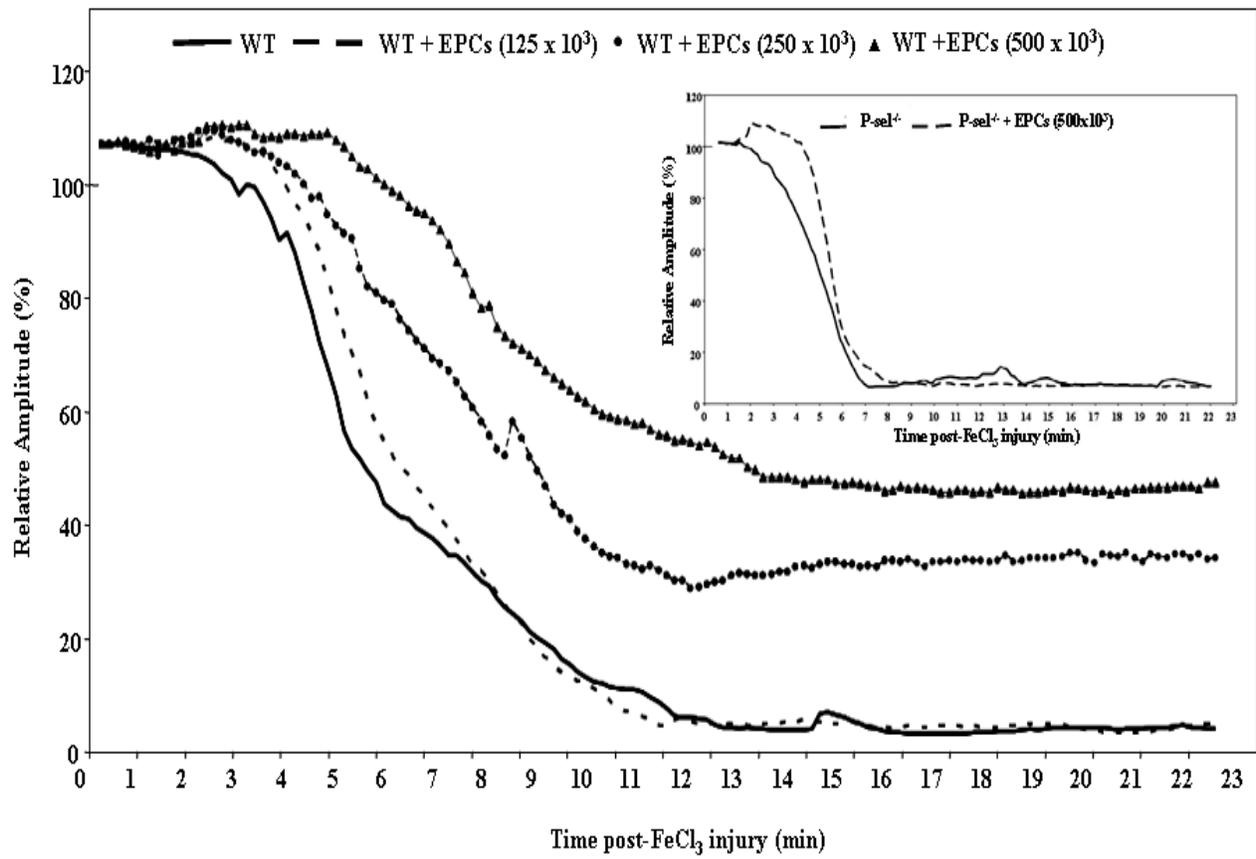


Figure 5

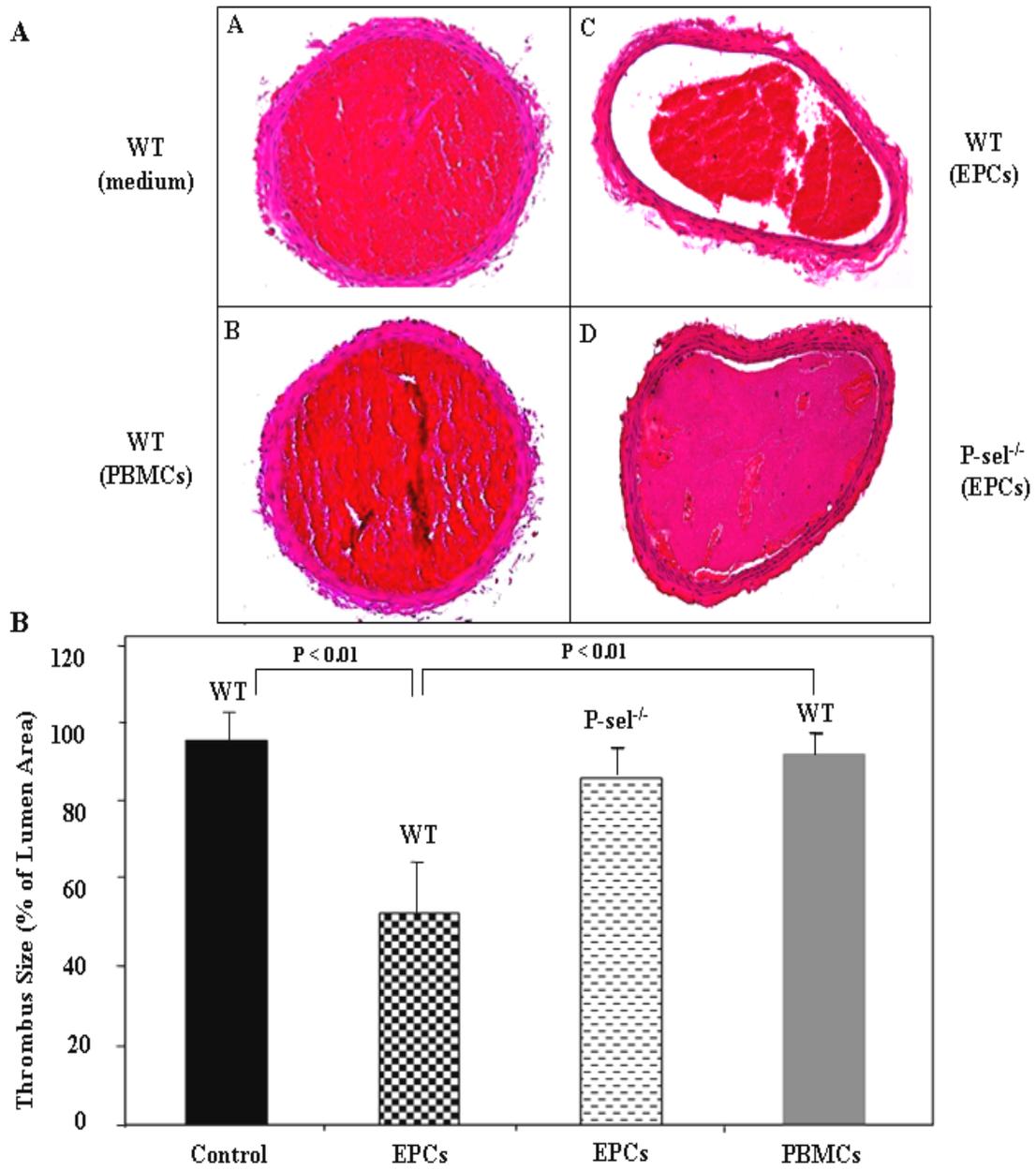
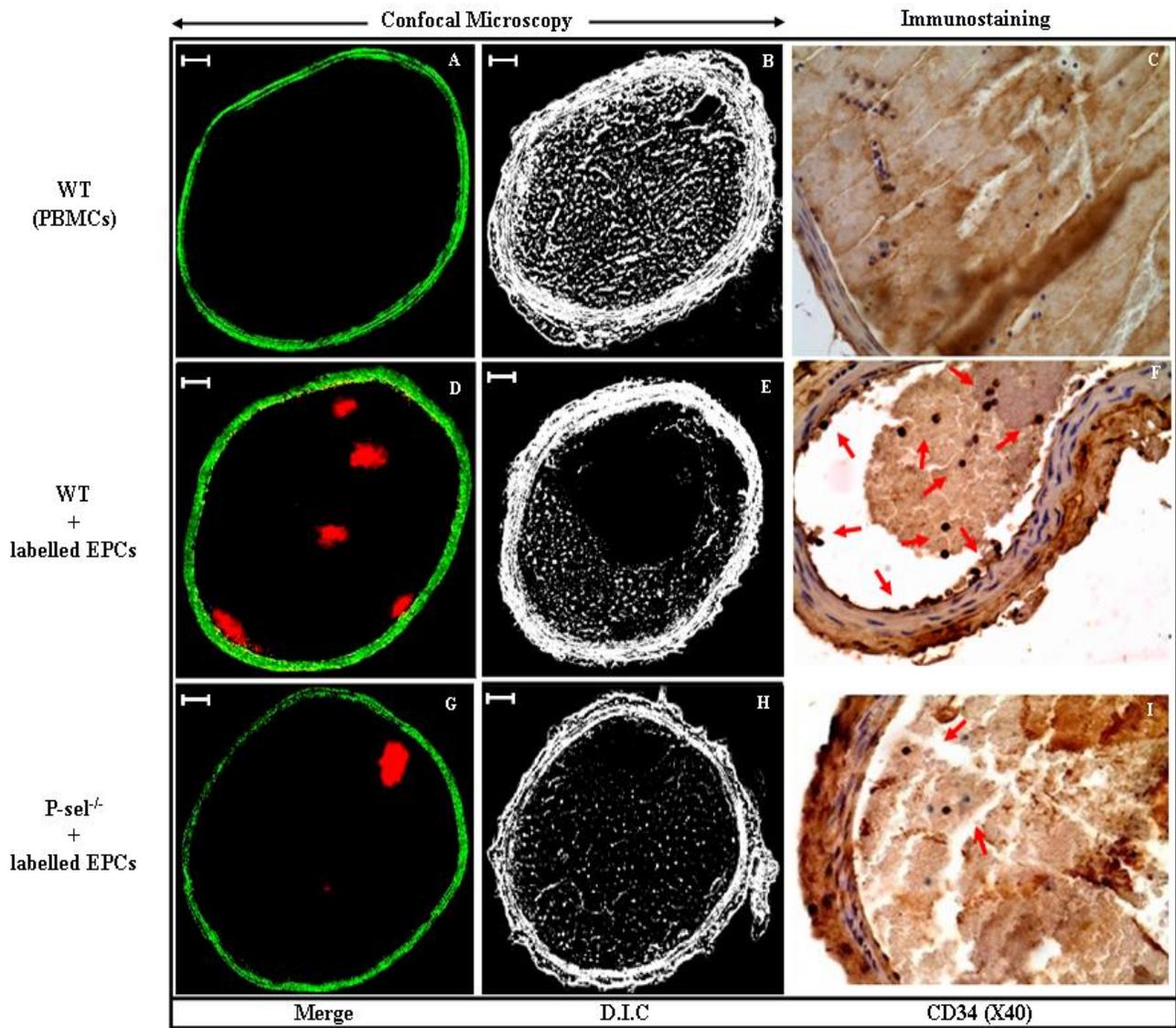


Figure 6



Discussion

Ces études fournissent de nouvelles évidences sur la régulation de la fonction plaquettaire et la thrombogenèse par les EPCs. En effet, le rôle des plaquettes dans la migration, le recrutement et la différenciation des EPCs aux sites de lésions vasculaires est relativement bien caractérisé mais l'effet des EPCs sur la fonction plaquettaire et par conséquent sur la formation du thrombus reste largement inexploré. Les objectifs spécifiques de ce projet étaient de différencier des EPCs fonctionnelles à partir de culture de PBMCs, d'étudier leurs effets sur la fonction générale des plaquettes *in vitro* et, subséquemment, de définir leur rôle dans la thrombogenèse *in vivo*.

Les principaux résultats de ces études révèlent que les EPCs dérivées de la culture des PBMCs interagissent avec les plaquettes activées *via* la P-sélectine plaquettaire, inhibent l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettaire *in vitro*, essentiellement par une sécrétion paracrine impliquant la PGI₂. En utilisant une lignée de souris sauvages et P-sel^{-/-}, nous avons démontré que les EPCs inhibent l'agrégation plaquettaire du sang complet chez les souris sauvages, mais non pas chez les souris P-sel^{-/-}. De plus, dans un modèle murin de thrombose carotidienne chez la souris nous avons trouvé que les EPCs s'incorporent au niveau des sites de lésion vasculaire et altèrent la formation du thrombus en réduisant considérablement sa masse. Par contre, chez les souris P-sel^{-/-}, l'impact des EPCs sur l'agrégation plaquettaire et la formation du thrombus n'avait pas d'effet significatif.

La mobilisation et le recrutement des EPCs à partir de la moelle osseuse représentent une forme de thérapie cellulaire prometteuse dans la réparation vasculaire. Toutefois, l'application thérapeutique des EPCs est limitée par leur faible proportion dans le sang (0.0001%).⁶⁷ La culture et l'expansion des EPCs *in vitro* s'avèrent d'une grande importance afin de procurer un nombre adéquat de cellules pour leur caractérisation et leur application thérapeutique. Les PBMCs regroupent plusieurs populations de cellules qui possèdent la capacité de se différencier, *in vitro*, en EPCs.^{71, 396, 397} En particulier, les cellules CD14⁺/CD34⁻ qui représentent la fraction la plus commune et la plus abondante de la lignée monocytaire, constituent une source possible de précurseurs endothéliaux.^{48, 52, 80, 81} En effet, cette fraction de PBMCs peut être sélectionnée et différenciée *in vitro* en EPCs en utilisant plusieurs approches.⁷² Mises en culture en présence de facteurs de croissance angiogéniques, cette population monocyttaire se différencie en deux types d'EPCs : les "early"- et "late" EPCs avec des propriétés morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles distinctes.^{50, 52, 58, 69, 83, 88, 398} Par ailleurs, ces cellules ont montré une application

thérapeutique potentielle en régénération vasculaire, en ingénierie tissulaire et en thérapie cellulaire.^{65, 73,74-76}

Les "early" EPCs sont obtenues en cultivant les PBMCs pour une période de quatre à sept jours.^{3, 58, 399} Morphologiquement, les "early" EPCs est une population hétérogène formée d'un amas de cellules rondes et fusiformes. Elles possèdent un faible taux de prolifération⁵² et survivent entre deux à quatre semaines en culture.^{69, 84} Un nombre important d'études fonctionnelles ont utilisé des "early" EPCs puisqu'elles étaient capables de favoriser le processus de néovascularisation *in vivo*.⁶⁵ Ces cellules possèdent quelques caractéristiques phénotypiques des cellules endothéliales : elles lient l'Ulex-lectine, internalisent l'Ac-LDL et expriment certains marqueurs endothéliaux (CD34, VEGFR2, vWF et VE-Cad).⁵² Bien que plusieurs marqueurs soient partagés entre les "early"- et "late" EPCs, le niveau d'expression de chaque marqueur peut varier de façon individuelle. Par exemple, dans les "early" EPCs, on note une faible expression de CD34 et une forte expression de CD31, VEGFR2 et VE-Cad.⁵⁸ Contrairement aux cellules endothéliales matures, les "early" EPCs partagent des caractères communs avec la lignée myéloïde parce qu'elles expriment des marqueurs leucocytaires comme le CD14 et le CD45.⁸³ Les "early" EPCs sont incapables de former un réseau vasculaire ("vascular network") *in vitro*,^{69, 84} mais elles peuvent adhérer aux cellules endothéliales et promouvoir l'angiogenèse par un mécanisme paracrine.⁸⁴

Les "late" EPCs sont obtenues en cultivant les PBMCs pour une période de deux à trois semaines.^{58, 399} À l'inverse des "early" EPCs, les "late" EPCs présentent une morphologie pavimenteuse uniforme ("cobblestone morphology"), se divisent à un grand rythme et peuvent survivre jusqu'à quatre semaines en culture.⁵² Les "late" EPCs sont capables de former un réseau vasculaire *in vitro* et peuvent s'incorporer dans les vaisseaux néoformés "*in situ*".^{58, 69} Bien que les "late" EPCs partagent plusieurs caractéristiques avec les "early" EPCs, elles n'expriment pas les marqueurs leucocytaires CD14 et CD45 et possèdent des propriétés fonctionnelles distinctes.⁶⁹ De ce fait, et en se basant sur les caractéristiques morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles, les "late" EPCs ressemblent plus aux cellules endothéliales que les "early" EPCs.

Dans la première partie de notre étude, nous sommes parvenus à différencier adéquatement des EPCs selon une méthode standardisée,^{52, 69} en ensemençant des PBMCs sur une surface de fibronectine dans un milieu spécifique (EndocultTM) qui a été conçu pour permettre la différenciation des EPCs humaines à partir des PBMCs. Dans de telles conditions,

les PBMCs subissaient des transformations morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles importantes. En effet, les PBMCs fraîchement isolées étaient une population de cellules de forme ronde et de taille irrégulière. Après cinq jours de culture, ces cellules donnaient naissance à des colonies qui consistaient en un noyau de cellules rondes au centre entouré par une couronne de cellules fusiformes en périphérie (résultats non-publiés). Ces colonies disparaissaient après dix jours de culture et étaient remplacées par une monocouche de cellules minces et aplaties. Ces deux types de cellules différenciées étaient positifs pour l'Ulex-lectine et l'Ac-LDL (marqueurs conventionnels des EPCs). Parallèlement, au cours de leur différenciation, les cellules perdaient progressivement les marqueurs leucocytaires (CD14, PSGL-1 et L-sélectine) et exprimaient certains marqueurs progéniteurs/endothéliaux (CD34, VEGFR2, vWF et VE-Cadhérine).

Dans le cadre de notre étude, les effets des EPCs sur la fonction plaquettaire et la thrombogénèse ont été évalués avec les deux types d'EPCs obtenus après cinq et dix jours de culture. Cependant, et puisque les effets majeurs étaient observés avec les EPCs au dixième jour, nous avons considéré ces dernières comme étant des vraies EPCs ou des EPCs fonctionnelles. De plus, nous précisons que le but principal de cette étude n'était pas destiné à caractériser les différentes populations d'EPCs obtenues par culture de PBMCs mais plutôt d'étudier les effets des EPCs sur la fonction générale des plaquettes. Par ailleurs, ce type d'EPCs différenciées au dixième jour présentait des caractéristiques morphologiques et phénotypiques identiques aux "late" EPCs décrites ci-haut. Toutefois, et étant donné que la période de culture de ces EPCs (dix jours) se situait à la limite entre les deux populations, nous croyons vraisemblablement que ces cellules consistaient en une population hétérogène d'EPCs dans les deux stades de différenciation : "early"- et "late" EPCs. En effet, dans le dixième jour de culture, seulement 63% de cellules sont CD34⁺ ce qui confirme davantage l'hétérogénéité de cette population d'EPCs. Aussi, il est fort probable que cette population d'EPCs contenait quelques cellules endothéliales matures ou que les conditions de culture favorisaient la différenciation des EPCs en un phénotype endothélial mature. Mais, contrairement aux cellules endothéliales matures, nos EPCs n'exprimaient pas la protéine endothéliale eNOS. Ceci n'exclut pas cependant que ces cellules étaient possiblement en voie de différenciation en des cellules endothéliales matures. Toutefois, ce processus se produit normalement après deux ou trois semaines de culture *in vitro*^{58, 72} ou après le recrutement des EPCs dans les tissus lésés *in vivo*.⁹⁰ Pour cela, et en se basant sur les caractéristiques morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles nous croyons que les EPCs qui

ont été obtenues après dix jours de culture ressemblaient mais n'étaient pas de vraies cellules endothéliales.

Cependant, il n'était pas assez clair si cette population reflétait des stades de différenciation distinctes entre l'hémangioblaste et les cellules endothéliales matures ou si elle dérivait de précurseurs différents.⁵⁸ Cette complexité résidait dans le fait que notre population de départ contenait plus qu'un seul type de précurseurs endothéliaux et que, initialement, nous n'avons sélectionné aucun marqueur spécifique. Cette hétérogénéité se reflétait aussi dans les différences morphologiques et phénotypiques des cellules dans les premiers jours de culture. Ceci reposait sur la nature hétérogène de la population de PBMCs qui regroupait 25% de cellules CD14⁺ et 75% de cellules CD14⁻ (résultats non-publiés). Or, notre décision de travailler avec une telle population hétérogène était basée sur l'idée que les méthodes de purification usuelles (billes magnétiques, enrichissement cellulaire) pouvaient affecter la viabilité des EPCs ou exclure les cellules possédant un potentiel progéniteur. En conséquence, le nombre des cellules isolées dans une population donnée et l'efficacité du processus de différenciation pourront être considérablement réduits. Ainsi, en travaillant dans des conditions de culture optimales et en utilisant un milieu de culture spécifique nous étions capables de générer des EPCs fonctionnelles à partir des PBMCs.

De point de vue fonctionnel, la capacité des cellules à influencer la fonction plaquettaire et la formation du thrombus augmentait en fonction de leur degré de différenciation/temps de culture. Ceci se traduisait par une inhibition partielle de l'agrégation plaquettaire en présence de surnageant des EPCs au cinquième jour (résultats non-publiés) et par une inhibition complète de l'activation, l'adhésion et l'agrégation plaquettaire en présence de surnageant des EPCs au dixième jour. Au niveau cellulaire, cette propriété inhibitrice des EPCs est associée avec une augmentation graduelle de l'expression des enzymes inductibles COX-2 et iNOS entre le premier, le cinquième et le dixième jour de culture (résultats non-publiés pour le cinquième jour). Cette augmentation de l'expression de COX-2 et d'iNOS résultait en une sécrétion de PGI₂ et du NO qui correspondait au même profil d'expression des deux enzymes inductibles. Ces résultats faisaient le lien entre l'effet cellulaire exercé par les EPCs sur la fonction plaquettaire et le mécanisme moléculaire sous-jacent.

Dans la thérapie cellulaire, la sécrétion des facteurs paracrines par les cellules souches et les EPCs semble être une composante majeure de l'effet thérapeutique observé.^{52, 201, 400} Plus

spécifiquement, les EPCs ont démontré la capacité de sécréter un nombre important de facteurs de croissance angiogénique. Cette propriété peut expliquer, au moins en partie, l'effet bénéfique sur la néovascularisation suite à la transplantation des EPCs dans les modèles animaux.^{52, 400} De façon similaire, le rôle potentiel des EPCs dans la régulation de la fonction plaquettaire est facilité probablement par la sécrétion des facteurs thrombo-résistants tels que la PGI₂ et le NO, qui sont des puissants agents anti-plaquettaires.⁷⁴ En conditions physiologiques, ces substances vasoactives sont capables d'inhiber l'agrégation plaquettaire, de prévenir la prolifération néointimale et de favoriser la relaxation du tonus vasculaire.^{258, 401} En effet, nous avons démontré que les EPCs surexprimaient COX-2 et iNOS de façon spécifique pendant leur différenciation et produisaient activement la PGI₂ et le NO. Étonnement, les effets des EPCs sur la fonction plaquettaire ont été renversés par l'inhibition de COX, tandis que l'inhibition du NOS ou la chélation du NO n'avaient aucun effet significatif. Dans les systèmes biologiques, la synthèse de la PGI₂ à partir de l'acide arachidonique est catalysée par la forme constitutive (COX-1) ou inductible (COX-2) de la cyclooxygénase, alors que le NO est généré par une des trois synthétases de l'oxyde nitrique : nNOS, eNOS ou iNOS. Dans les cellules endothéliales, la PGI₂ et le NO sont principalement générés par COX-2⁴⁰² et eNOS,⁴⁰³ respectivement. Dans notre étude, nous avons désigné la PGI₂ comme étant le médiateur principal impliqué dans l'inhibition de la fonction plaquettaire par les EPCs. Ceci était basé sur nos observations que les PBMCs exprimaient COX-1 de façon constitutive mais ne produisaient pas de PGI₂, tandis que les EPCs surexprimaient spécifiquement COX-2 et produisaient la PGI₂ qui a été inhibée par l'indométhacine. Cependant, l'indométhacine est un inhibiteur non-sélectif des COXs qui peut inhiber la sécrétion des prostaglandines, de la thromboxane et de la PGI₂. D'ailleurs, les plaquettes expriment des récepteurs pour la PGI₂, la TXA₂, la prostaglandine E₂ (PGE₂) et la prostaglandine D₂ (PGD₂),⁴⁰⁴ qui possèdent tous la capacité d'affecter la fonction plaquettaire. Or, parmi ceux-ci, le récepteur de la PGI₂ est le récepteur majeur des prostaglandines qui maintient les plaquettes à l'état inactif par une voie dépendante de l'activation de l'adénylate cyclase. D'autre part, la TXA₂ est un activateur plaquettaire tandis que la PGE₂ exerce un effet bivalent sur les plaquettes, et le récepteur de la PGD₂ est le récepteur des prostanoïdes le moins abondant et le moins caractérisé sur la surface des plaquettes. Ainsi, la PGI₂ semble être l'inhibiteur plaquettaire principal dérivant des EPCs. Dans notre étude, les concentrations élevées du NO sécrété par les EPCs peuvent être corrélées à une haute expression d'iNOS, alors

que l'expression d'eNOS est négligeable dans les EPCs. Notre résultat est en accord avec une étude récente démontrant qu'iNOS et non pas eNOS est exprimé dans les EPCs dérivées de la culture du sang périphérique.⁴⁰⁵ La faible expression d'eNOS dans les EPCs dérivées de la culture du sang périphérique peut être due au fait que ces dernières ne sont pas de vraies cellules endothéliales matures et optent à produire le NO à l'image des monocytes/macrophages, c'est-à-dire, par une surexpression d'iNOS. Ceci nous permet de spéculer que le niveau du NO produit *via* iNOS n'est pas suffisant pour affecter la fonction plaquettaire. D'autre part, le rôle d'iNOS dans les EPCs semble être plus important dans l'angiogenèse, probablement en favorisant le recrutement des EPCs au niveau de l'endothélium endommagé.⁴⁰² En somme, ceci peut justifier, en partie, nos conclusions que les effets inhibiteurs exercés par les EPCs sur la fonction plaquettaire *in vitro*, sont dépendants de l'action de la PGI₂ plutôt que celle du NO. Ceci n'exclut pas le rôle du NO produit par les EPCs comme étant un facteur régulateur impliqué dans la deuxième phase de la réparation vasculaire, incluant l'angiogenèse.⁴⁰² Cependant, ce phénomène nécessite encore plus de recherches.

De fortes évidences suggèrent que les plaquettes jouent un rôle important non seulement dans l'hémostase et la thrombose, mais aussi dans l'inflammation et la réparation tissulaire à travers des mécanismes de sécrétions paracrines et/ou des interactions directes avec les autres cellules sanguines et endothéliales.^{406, 407} Récemment, il a été clairement démontré que les plaquettes favorisent le recrutement et la différenciation des EPCs aux sites de lésion vasculaire *via* des mécanismes concertés incluant le chimiotactisme, la migration et l'intégration des EPCs dans les tissus cibles.^{101, 106-109, 111, 121, 122} Réciproquement, nous avons démontré que les EPCs peuvent influencer la fonction des plaquettes et moduler leurs propriétés thrombogéniques au cours de la lésion vasculaire. Dans le but d'analyser et de caractériser l'action des EPCs sur la fonction plaquettaire, nous avons premièrement démontré que les EPCs dérivant des PBMCs se liaient aux plaquettes activées de façon dépendante de la P-sélectine plaquettaire. Ces résultats sont en accord avec des études antérieures qui ont démontré que les interactions adhésives entre les plaquettes et les EPCs se produisent principalement *via* la P-sélectine et son récepteur de haute affinité, le PSGL-1, une interaction qui semble dicter leur fonctionnement au cours de la réparation vasculaire.^{106, 109, 111, 121, 388} Cependant, nous ne sommes pas parvenus à démontrer l'expression du PSGL-1 à la surface des EPCs après dix jours de culture. De plus, un traitement anti-PSGL-1 était incapable de réduire la liaison des EPCs aux plaquettes activées. En

conséquence, au dixième jour, nous avons constaté une diminution de la liaison des EPCs aux plaquettes activées par rapport à celle des EPCs du cinquième jour (résultats non-publiés). Ceci suggère que d'autres médiateurs peuvent être impliqués dans la liaison des EPCs aux plaquettes, tels que les récepteurs-2 et -4 de la chémokine CXCL, et les intégrines β_1 - et β_2 qui participent au recrutement des EPCs aux sites de lésion vasculaire.^{101, 107-109} On ne peut pas négliger, toutefois, le fait que le PSGL-1 était impliqué dans la liaison des EPCs aux plaquettes dans la première phase de différenciation (c'est-à-dire entre le premier et le cinquième jour de culture). Ceci était confirmé par le fait que le PSGL-1 était exprimé sur les EPCs après cinq jours de culture et qu'un traitement anti-PSGL-1 inhibait complètement la liaison de ces EPCs aux plaquettes activées (résultats non-publiés).

La baisse de liaison entre les EPCs et les plaquettes après dix jours de culture peut être expliquée par le changement dynamique dans l'expression des récepteurs cellulaires de surface et par la synthèse des facteurs inhibiteurs des plaquettes par les EPCs. En effet, au cours de la différenciation cellulaire, nous avons observé une diminution progressive de l'expression des marqueurs leucocytaires et une augmentation de l'expression de marqueurs progéniteurs. En particulier, nous avons noté une diminution significative dans l'expression du PSGL-1 et une augmentation importante de la synthèse de la PGI₂ et du NO, apportant ainsi une explication possible pour la baisse de liaison des plaquettes activées aux EPCs après dix jours de culture. Ces résultats nous permettent de croire que la cinétique de l'interaction EPCs-plaquettes est composée de deux phases. La première phase est celle qui suit immédiatement l'adhésion plaquettaire sur la surface thrombogénique. Cette phase est caractérisée par une interaction entre les EPCs et les plaquettes mettant en jeu le PSGL-1 des EPCs et la P-sélectine des plaquettes. Les EPCs et les plaquettes adhérentes au niveau du site de la lésion vont favoriser le recrutement d'autres EPCs et plaquettes en circulation propageant ainsi la réponse hémostatique envers le traumatisme vasculaire. De plus, ces EPCs vont initier le processus d'angiogenèse par une sécrétion paracrine de facteurs pro-angiogéniques. Dans les heures et les jours qui suivent le recrutement primaire des EPCs, ces dernières vont s'intégrer dans la paroi vasculaire endommagée, se différencier en un phénotype endothélial mature et favoriser le processus de réparation endothéliale. Au niveau cellulaire, cette deuxième phase est marquée par la disparition du PSGL-1 (donc une habilité moindre à lier les plaquettes activées) et une sécrétion accrue de facteurs angiogéniques et anti-thrombotiques. En plus de la baisse de liaison des EPCs aux

plaquettes, l'incubation des plaquettes avec le surnageant des EPCs du jour dix résultait en une inhibition profonde de l'activation plaquettaire. Ce phénomène était démontrée par l'inhibition de la translocation de la P-sélectine et de l'activation de la GPIIb/IIIa, dont toutes les deux sont impliquées dans la formation et la stabilisation du thrombus.^{408, 409} Aussi, l'impact fonctionnel des EPCs sur les plaquettes a été souligné dans leurs effets inhibiteurs sur l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine et le collagène et sur l'adhésion plaquettaire sur une surface de collagène perfusée avec du sang complet.

Dans la deuxième partie de notre étude, nous avons cherché à comprendre la signification physiologique de l'action des EPCs sur la fonction plaquettaire *in vivo*, en utilisant un modèle standardisé de thrombose carotidienne chez la souris.⁴¹⁰ L'infusion des EPCs chez des souris du type sauvage altèrait la formation du thrombus ce qui résultait en une occlusion incomplète de l'artère avec un débit résiduel de 50%. De plus, les EPCs infusées s'incorporaient au niveau de la paroi vasculaire endommagée et dans le thrombus en réduisant significativement sa masse. Les effets inhibiteurs des EPCs sur la fonction plaquettaire et la formation du thrombus nous ont incités à pousser plus loin notre étude et de rechercher le mécanisme d'action cellulaire régissant l'action des EPCs sur l'agrégation plaquettaire et la formation du thrombus.

La thrombose artérielle est un processus complexe qui est initié par la formation d'un agrégat plaquettaire ou thrombus blanc dans les cavités artérielles. Selon la masse du thrombus formé, une obstruction complète ou partielle du courant sanguin pourra se produire au niveau de la lésion vasculaire, engendrant des épisodes d'angine de poitrine, suivies par une ischémie ou un infarctus du myocarde. Ce processus de formation d'agrégat plaquettaire est gouverné par des molécules d'adhésion cellulaires spécifiques qui induisent des interactions homotypiques et hétérotypiques entre les plaquettes et les autres cellules sanguines.^{366, 411} Dans ce contexte, la P-sélectine plaquettaire est un médiateur important dans les interactions cellulaires et contribue, parmi d'autres, au recrutement des plaquettes et des leucocytes dans le thrombus et au niveau de la matrice sous-endothéliale.⁴¹² En plus de son rôle dans la thrombose et l'inflammation, la P-sélectine est largement impliquée dans le processus de recrutement et de différenciation des EPCs aux sites de lésions vasculaires.^{106, 109, 111, 121, 122}

Étant donné que la P-sélectine plaquettaire représente la molécule maîtresse impliquée dans les interactions adhésives entre les EPCs et les plaquettes, nous avons posé l'hypothèse que les effets inhibiteurs des EPCs sur les plaquettes dépendaient de la P-sélectine. Pour valider cette

hypothèse, nous avons eu recours à des souris sauvages et P-sel^{-/-}, chez lesquelles nous avons examiné l'effet des EPCs sur l'agrégation plaquettaire dans le sang complet *in vitro*, et sur la formation du thrombus, *in vivo*. Les résultats obtenus révélèrent que les EPCs étaient capables d'inhiber l'agrégation plaquettaire de manière dépendante de la concentration chez les souris sauvages, mais non pas chez les souris P-sel^{-/-}. De plus, les EPCs infusées dans les souris sauvages altéraient la formation du thrombus, s'incorporaient au niveau de la paroi vasculaire lésée et dans le thrombus en formation et réduisaient considérablement sa masse. Par contre, chez les souris P-sel^{-/-}, les EPCs infusées n'avaient aucun effet significatif.

Le rôle des EPCs dans le maintien de l'intégrité vasculaire en tant que cellules "réparatrices" de l'endothélium endommagé est bien reconnu. En effet, les EPCs circulent dans le sang dans un mode de "surveillance" et entreprennent de contacts transitoires avec la paroi vasculaire intacte. Cependant, quand un endommagement artériel se produit, les EPCs s'engagent, de façon autocrine et paracrine, dans la réponse de l'organisme à la lésion. Le besoin d'une réparation vasculaire est communiqué aux EPCs circulantes par les plaquettes adhérentes/agrégées. L'utilisation des EPCs cultivées *in vitro* a démontré une application thérapeutique dans la ré-endothélialisation et la néovascularisation des tissus ischémiques, ainsi que dans la prévention de la thrombose, de la resténose et du rejet des prothèses vasculaires implantées *in vivo*.^{73, 76, 77, 137, 251, 255} Ainsi, dans un modèle de thrombose des veines profondes chez le rat, la transplantation d'EPCs semble altérer le microenvironnement de la lésion ce qui se traduit par une recanalisation et un remodelage du thrombus.²⁵⁶ De plus, dans des études cliniques récentes, l'utilisation de stents capteurs d'EPCs lors de l'angioplastie coronarienne réduisait le risque de la thrombose tardive du stent.^{76, 77} En somme, ces données soulignent le rôle potentiel que peuvent jouer les EPCs dans la régulation des réactions thrombotiques.

Dans notre étude, l'injection des EPCs chez la souris sauvage ayant subi la lésion carotidienne altérait la formation du thrombus conduisant à une occlusion incomplète de l'artère avec un flux résiduel de 50%. Ces résultats ont un impact physiopathologique important étant donné que la réponse hémostatique à la lésion vasculaire comprend l'adhésion, l'activation, et l'agrégation des plaquettes, suivi par le recrutement d'autres plaquettes, leucocytes, et probablement d'EPCs circulantes. Le recrutement des EPCs circulantes au niveau de sites de lésions vasculaires peut contribuer en premier lieu, à atténuer la réaction thrombotique aiguë et ensuite à promouvoir le processus de ré-endothélialisation et de réparation vasculaire. En effet,

l'incorporation des EPCs dans le thrombus peut empêcher le recrutement secondaire des plaquettes ce qui contribuera à limiter/déstabiliser la formation du thrombus. Ceci aura comme conséquence de favoriser le processus d'endothélialisation et de réparation vasculaire à long terme. Cependant, le faible nombre d'EPCs incorporées dans les vaisseaux néoformés après l'ischémie ne reflète pas l'effet bénéfique observé après la thérapie cellulaire. Pour cela, l'efficacité de la néovascularisation induite par les EPCs peut être due non seulement à l'incorporation des EPCs dans les vaisseaux mais aussi à la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques de manière paracrine.^{65, 68, 113} En effet, les EPCs en culture sont en mesure de sécréter une variété de substances vasoactives dans le microenvironnement de la lésion telle que le VEGF, HGF, SDF, G-CSF, ILF-I, ainsi que la PGI₂ et le NO.^{52, 74, 86, 87, 109, 122, 201, 256} En particulier, la PGI₂ et le NO sont des puissants agents anti-plaquettaires et thrombo-résistants qui sont abondamment sécrétés par les EPCs en réponse à de nombreux stimuli.^{74, 257} Cette sécrétion de facteurs anti-thrombotiques au niveau de la paroi vasculaire endommagée peut favoriser l'angiogénèse, inhiber l'agrégation plaquettaire et altérer la formation du thrombus.²⁵⁷⁻²⁵⁹ Dans les tissus, la PGI₂ et le NO agissent de manière paracrine, possèdent un temps de demi-vie assez bref et sont rapidement métabolisés ou séquestrés. Ceci peut justifier notre observation que l'effet inhibiteur des EPCs (*via* la PGI₂) sur l'agrégation plaquettaire requérait un rapprochement étroit ou un bref contact entre les EPCs et les plaquettes pour qu'il puisse se produire de façon efficace. Dans cette perspective, il a été démontré que la P-sélectine facilite le roulement des plaquettes sur l'endothélium activé et sur une variété de cellules y compris les EPCs. Cette interaction adhésive entre les EPCs et les plaquettes *via* la P-sélectine va amener les EPCs en contact avec les plaquettes adhérentes permettant à la PGI₂ d'agir localement de manière efficace. En outre, cette interaction peut stimuler l'activité des EPCs et induire la génération de signaux intracellulaires conduisant à la sécrétion d'un nombre important de substances vasoactives et anti-thrombotiques capables de moduler le microenvironnement de la lésion et altérer la formation du thrombus. Toutefois, cette hypothèse nécessite encore plus d'investigations.

Dans notre étude, nous avons démontré que l'inhibition de l'agrégation plaquettaire et de la formation du thrombus était médiée par une interaction adhésive entre les EPCs et les plaquettes, mettant en jeu la P-sélectine plaquettaire. Ces résultats sont en accord avec d'autres études qui ont démontré que l'absence ou le blocage de la P-sélectine réduisait de façon dramatique l'accumulation des EPCs sur une monocouche de plaquettes adhérentes sur une

surface de collagène et au niveau des sites de dénudation endothéliale.^{108, 109, 122} Par analogie, nous avons adéquatement réussi à démontrer que chez les souris P-sel^{-/-}, l'absence de la P-sélectine a substantiellement compromis l'interaction adhésive entre les plaquettes et les EPCs et a renversé l'effet inhibiteur des EPCs sur l'agrégation plaquettaire, *in vitro*, et sur la formation du thrombus *in vivo*. Bien que l'expression de la P-sélectine par les plaquettes joue un rôle important dans le mécanisme d'action des EPCs, leurs effets prédominants sont médiés essentiellement par une sécrétion paracrine, impliquant la PGI₂. Néanmoins, un rapprochement étroit ou un bref contact entre les EPCs et les plaquettes est requis pour que cette fonction soit complètement réalisée. En fait, il semble que le mécanisme d'action des EPCs sur la formation du thrombus plaquettaire est composé virtuellement de deux étapes : une brève interaction cellulaire suivie d'une sécrétion paracrine de substances anti-thrombotiques.

L'importance de l'interaction EPC-plaquette a été aussi mise en évidence dans le processus de recrutement des EPCs au niveau des sites de lésion. Nous avons trouvé que le nombre d'EPCs recrutées dans le thrombus et au niveau de la paroi vasculaire est visiblement réduite chez les souris P-sel^{-/-} en comparaison avec les souris sauvages. Ces résultats ont une retombée physiologique importante puisque les EPCs doivent s'intégrer dans les vaisseaux lésés et dans le thrombus plaquettaire afin de promouvoir le processus d'angiogenèse et limiter la thrombogenèse.

En conclusion, notre étude démontre, pour la première fois, que les EPCs dérivées de la culture du sang humain périphérique, peuvent réguler l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettaire, *in vitro*, et altérer la formation du thrombus *in vivo*. Aussi, nous avons étudié les interactions adhésives entre les EPCs et les plaquettes et nous avons démontré que la P-sélectine plaquettaire participe à ce processus en constituant la voie d'interaction majeure. De plus, nous avons identifié les principaux facteurs anti-plaquettaires sécrétés par les EPCs et nous avons désigné la PGI₂ comme étant l'effecteur principal. De surcroît, nous avons élucidé le mécanisme d'action de l'effet inhibiteur des EPCs sur la formation du thrombus plaquettaire et nous avons identifié les éléments nécessaires pour que cet effet soit complètement réalisé soit la sécrétion de PGI₂ par les EPCs et l'expression de la P-sélectine par les plaquettes. En plus de leur implication dans l'angiogenèse et la réparation vasculaire, notre étude impute aux EPCs un rôle important dans la régulation de la fonction plaquettaire et dans la formation du thrombus. Ceci contribuera

certes à maintenir l'homéostasie vasculaire en limitant la propagation de la réaction thrombotique aux sites de lésions vasculaires.

Conclusions et directions futures

Les résultats de ces études révèlent un nouveau rôle pour les EPCs dans la régulation de la fonction plaquettaire et la formation du thrombus. De plus, au cours de ces études, nous avons identifié le facteur soluble sécrété par les EPCs et responsable de l'action inhibitrice sur les plaquettes. D'autre part, nous avons étudié les interactions adhésives entre les EPCs et les plaquettes et nous avons déterminé la voie d'interaction majeure. Dans cette perspective, en utilisant des lignées de souris sauvages et déficientes en P-sélectine plaquettaire, nous avons élucidé les mécanismes d'action des EPCs sur l'agrégation plaquettaire et la formation du thrombus et nous avons mis en évidence le rôle de la P-sélectine dans ces processus. Cependant, encore bien des interrogations se dressent et nécessitent d'être abordées.

Généralement, des stratégies doivent être élaborées pour accroître le nombre d'EPCs permettant l'expansion d'un nombre adéquat de cellules pour les applications thérapeutiques. De plus, il y a un besoin urgent de standardiser les protocoles d'isolation et de culture d'EPCs pour optimiser leurs applications thérapeutiques. En effet, les différentes méthodes d'isolation et de culture des EPCs entre les laboratoires contribuent à faire varier les résultats découlant de leurs applications thérapeutiques. En conséquence, il sera bien difficile de comparer les effets thérapeutiques des différentes populations d'EPCs (par exemple "late" EPCs versus "early" EPCs). De même, les stratégies pour augmenter la rétention et la survie de cellules transplantées méritent d'être développées. Le moment d'administration des cellules, les conditions cliniques appropriées, le nombre cellulaire optimal et surtout la sécurité de transplantation cellulaire sont des éléments qui doivent être bien définies.

L'utilisation des EPCs comme arsenal thérapeutique dans le traitement des maladies cardiovasculaires dépend du progrès qu'on effectue dans la compréhension de leur biologie. Pour cela, il s'avère important d'élargir notre connaissance la cascade de mobilisation, de recrutement, de survie et de différenciation dans les tissus cibles. Dans ce contexte, l'ingénierie génétique des EPCs peut fournir une stratégie importante pour augmenter leur biodisponibilité.

Cependant, les questions spécifiques que soulèvent notre étude et qui méritent d'être examinées sont :

- 1- Quels sont les autres récepteurs adhésifs impliqués dans l'interaction EPCs-plaquettes ?
- 2- Quel rôle peut jouer la P-sélectine plaquettaire dans la génération de signaux intracellulaires chez les EPCs ?

- 3- Quel est l'effet de développement des EPCs modifiées génétiquement (EPCs transfectées) sur l'interaction EPCs-plaquettes et sur la fonction plaquettaire?
- 4- Quelle est l'influence de la sévérité de l'endommagement artériel sur le recrutement des EPCs ?

La résolution de ces questions suscitera certainement plusieurs projets de recherche dans un avenir prochain. Les résultats qui en découleront apporteront sans doute une contribution importante à nos connaissances sur la biologie des EPCs et sur leur rôle potentiel dans l'angiogenèse et la réparation vasculaire. De plus, ces réponses vont mettre en perspective l'importance de l'interaction EPC-plaquette dans la régulation de la fonction plaquettaire et la formation/remodelage du thrombus plaquettaire aux sites de lésion vasculaire. Par ailleurs, nous serons probablement en mesure de mieux comprendre la dualité dans le rôle des EPCs, quant à leur capacité de se lier avec les plaquettes en premier lieu et ensuite à leur capacité d'inhiber la fonction plaquettaire.

Bibliographie

1. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* Apr 2000;6(4):389-395.
2. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* Apr 17 1997;386(6626):671-674.
3. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* Feb 14 1997;275(5302):964-967.
4. Simons M. Angiogenesis: where do we stand now? *Circulation.* Mar 29 2005;111(12):1556-1566.
5. Skalak TC. Angiogenesis and microvascular remodeling: a brief history and future roadmap. *Microcirculation.* Jan-Feb 2005;12(1):47-58.
6. Rafii S. Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *J Clin Invest.* Jan 2000;105(1):17-19.
7. Cohnheim. J. Uber Entzundung Und Eiterung. *Pathol Anat Physiol Klin Med.* 1867.;40:1-79.
8. Choi K, Kennedy M, Kazarov A, et al. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development.* Feb 1998;125(4):725-732.
9. Flamme I, Risau W. Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development.* Oct 1992;116(2):435-439.
10. Folkman J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med.* Dec 28 1995;333(26):1757-1763.
11. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* Jun 5 1992;267(16):10931-10934.
12. Risau W, Sariola H, Zerwes HG, et al. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development.* Mar 1988;102(3):471-478.
13. Peters KG, De Vries C, Williams LT. Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 1 1993;90(19):8915-8919.
14. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature.* Jul 6 1995;376(6535):62-66.
15. Shalaby F, Ho J, Stanford WL, et al. A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell.* Jun 13 1997;89(6):981-990.
16. Eichmann A, Marcelle C, Breant C, et al. Two molecules related to the VEGF receptor are expressed in early endothelial cells during avian embryonic development. *Mech Dev.* Jul 1993;42(1-2):33-48.
17. Eichmann A, Corbel C, Nataf V, et al. Ligand-dependent development of the endothelial and hemopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 13 1997;94(10):5141-5146.
18. Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, et al. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell.* Mar 26 1993;72(6):835-846.
19. Flamme I, Breier G, Risau W. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo. *Dev Biol.* Jun 1995;169(2):699-712.

20. Schuh AC, Faloon P, Hu QL, et al. In vitro hematopoietic and endothelial potential of flk-1(-/-) embryonic stem cells and embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 2 1999;96(5):2159-2164.
21. Heissig B, Hattori K, Dias S, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. May 31 2002;109(5):625-637.
22. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. Feb 10 2004;109(5):656-663.
23. Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, et al. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*. Jul 20 2004;110(3):349-355.
24. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. Sep 19 2003;114(6):763-776.
25. Wurmser AE, Nakashima K, Summers RG, et al. Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature*. Jul 15 2004;430(6997):350-356.
26. El-Helou V, Beguin PC, Assimakopoulos J, et al. The rat heart contains a neural stem cell population; Role in sympathetic sprouting and angiogenesis. *J Mol Cell Cardiol*. Jul 31 2008.
27. Korbli M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med*. Aug 7 2003;349(6):570-582.
28. Orlic D. Adult bone marrow stem cells regenerate myocardium in ischemic heart disease. *Ann N Y Acad Sci*. May 2003;996:152-157.
29. Parker RC. The Development Of Organized Vessels In Cultures Of Blood Cells. *Science*. Jun 2 1933;77(2005):544-546.
30. White JF, Parshley MS. Growth in vitro of blood vessels from bone marrow of adult chickens. *Am J Anat*. Sep 1951;89(2):321-345.
31. Stump MM, Jordan GL, Jr., Debaeky ME, et al. Endothelium Grown From Circulating Blood On Isolated Intravascular Dacron Hub. *Am J Pathol*. Sep 1963;43:361-367.
32. Mackenzie JR, Hackett M, Topuzlu C, et al. Origin of arterial prosthesis lining from circulating blood cells. *Arch Surg*. Dec 1968;97(6):879-885.
33. Scott SM, Barth MG, Gaddy LR, et al. The role of circulating cells in the healing of vascular prostheses. *J Vasc Surg*. Apr 1994;19(4):585-593.
34. Shi Q, Wu MH, Hayashida N, et al. Proof of fallout endothelialization of impervious Dacron grafts in the aorta and inferior vena cava of the dog. *J Vasc Surg*. Oct 1994;20(4):546-556; discussion 556-547.
35. Wu MH, Shi Q, Wechezak AR, et al. Definitive proof of endothelialization of a Dacron arterial prosthesis in a human being. *J Vasc Surg*. May 1995;21(5):862-867.
36. Noishiki Y, Tomizawa Y, Yamane Y, et al. Autocrine angiogenic vascular prosthesis with bone marrow transplantation. *Nat Med*. Jan 1996;2(1):90-93.
37. Asahara T, Bauters C, Pastore C, et al. Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation*. Jun 1 1995;91(11):2793-2801.
38. Sbarbati R, de Boer M, Marzilli M, et al. Immunologic detection of endothelial cells in human whole blood. *Blood*. Feb 15 1991;77(4):764-769.

39. George F, Brisson C, Poncelet P, et al. Rapid isolation of human endothelial cells from whole blood using S-Endo1 monoclonal antibody coupled to immuno-magnetic beads: demonstration of endothelial injury after angioplasty. *Thromb Haemost.* Jan 23 1992;67(1):147-153.
40. Sinzinger H, Fitscha P, Kritz H, et al. Prostaglandin E1 decreases circulating endothelial cells. *Prostaglandins.* Jan 1996;51(1):61-68.
41. Siena S, Bregni M, Brando B, et al. Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood.* Nov 1 1989;74(6):1905-1914.
42. Fritsch G, Stimpfl M, Kurz M, et al. Characterization of hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci.* Dec 29 1995;770:42-52.
43. Young PE, Baumhueter S, Lasky LA. The sialomucin CD34 is expressed on hematopoietic cells and blood vessels during murine development. *Blood.* Jan 1 1995;85(1):96-105.
44. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, et al. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood.* Jan 1 1996;87(1):1-13.
45. Shi Q, Rafii S, Wu MH, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood.* Jul 15 1998;92(2):362-367.
46. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* Feb 1 2000;95(3):952-958.
47. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, et al. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest.* Jan 2000;105(1):71-77.
48. Fernandez Pujol B, Lucibello FC, Gehling UM, et al. Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes. *Differentiation.* May 2000;65(5):287-300.
49. Schatteman GC, Hanlon HD, Jiao C, et al. Blood-derived angioblasts accelerate blood-flow restoration in diabetic mice. *J Clin Invest.* Aug 2000;106(4):571-578.
50. Yoder MC, Mead LE, Prater D, et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood.* Mar 1 2007;109(5):1801-1809.
51. Case J, Ingram DA, Haneline LS. Oxidative Stress Impairs Endothelial Progenitor Cell Function. *Antioxid Redox Signal.* Jul 16 2008.
52. Rehman J, Li J, Orschell CM, et al. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation.* Mar 4 2003;107(8):1164-1169.
53. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells functional characterization. *Trends Cardiovasc Med.* Nov 2004;14(8):318-322.
54. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood.* Nov 1 2004;104(9):2752-2760.
55. Franz WM, Zaruba M, Theiss H, et al. Stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet.* Aug 30 2003;362(9385):675-676.
56. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med.* Aug 2004;10(8):858-864.

57. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med.* Apr 1999;5(4):434-438.
58. Marsboom G, Janssens S. Endothelial progenitor cells: new perspectives and applications in cardiovascular therapies. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* Jun 2008;6(5):687-701.
59. Schmeisser A, Garlich CD, Zhang H, et al. Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovasc Res.* Feb 16 2001;49(3):671-680.
60. Zhao Y, Glesne D, Huberman E. A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 4 2003;100(5):2426-2431.
61. Solovey A, Lin Y, Browne P, et al. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Engl J Med.* Nov 27 1997;337(22):1584-1590.
62. Mutunga M, Fulton B, Bullock R, et al. Circulating endothelial cells in patients with septic shock. *Am J Respir Crit Care Med.* Jan 2001;163(1):195-200.
63. Clancy R, Marder G, Martin V, et al. Circulating activated endothelial cells in systemic lupus erythematosus: further evidence for diffuse vasculopathy. *Arthritis Rheum.* May 2001;44(5):1203-1208.
64. Segal MS, Bihorac A, Koc M. Circulating endothelial cells: tea leaves for renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* Jul 2002;283(1):F11-19.
65. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 28 2000;97(7):3422-3427.
66. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med.* Apr 2001;7(4):430-436.
67. Ingram DA, Caplice NM, Yoder MC. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood.* Sep 1 2005;106(5):1525-1531.
68. Urbich C, Heeschen C, Aicher A, et al. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation.* Nov 18 2003;108(20):2511-2516.
69. Hur J, Yoon CH, Kim HS, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Feb 2004;24(2):288-293.
70. Elsheikh E, Uzunel M, He Z, et al. Only a specific subset of human peripheral-blood monocytes has endothelial-like functional capacity. *Blood.* Oct 1 2005;106(7):2347-2355.
71. Romagnani P, Lasagni L, Romagnani S. Peripheral blood as a source of stem cells for regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther.* Mar 2006;6(3):193-202.
72. Prater DN, Case J, Ingram DA, et al. Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells. *Leukemia.* Jun 2007;21(6):1141-1149.
73. Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, et al. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med.* Sep 2001;7(9):1035-1040.
74. Shirota T, He H, Yasui H, et al. Human endothelial progenitor cell-seeded hybrid graft: proliferative and antithrombogenic potentials in vitro and fabrication processing. *Tissue Eng.* Feb 2003;9(1):127-136.

75. Werner N, Nickenig G. Clinical and therapeutical implications of EPC biology in atherosclerosis. *J Cell Mol Med.* Apr-Jun 2006;10(2):318-332.
76. Co M, Tay E, Lee CH, et al. Use of endothelial progenitor cell capture stent (Genous Bio-Engineered R Stent) during primary percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction: intermediate- to long-term clinical follow-up. *Am Heart J.* Jan 2008;155(1):128-132.
77. Miglionico M, Patti G, D'Ambrosio A, et al. Percutaneous coronary intervention utilizing a new endothelial progenitor cells antibody-coated stent: a prospective single-center registry in high-risk patients. *Catheter Cardiovasc Interv.* Apr 1 2008;71(5):600-604.
78. Shirota T, Yasui H, Shimokawa H, et al. Fabrication of endothelial progenitor cell (EPC)-seeded intravascular stent devices and in vitro endothelialization on hybrid vascular tissue. *Biomaterials.* Jun 2003;24(13):2295-2302.
79. Zhou Z, Shi S, Song M, et al. Development of transgenic endothelial progenitor cell-seeded stents. *J Biomed Mater Res A.* Nov 4 2008.
80. Krenning G, Dankers PY, Jovanovic D, et al. Efficient differentiation of CD14+ monocytic cells into endothelial cells on degradable biomaterials. *Biomaterials.* Mar 2007;28(8):1470-1479.
81. Harraz M, Jiao C, Hanlon HD, et al. CD34- blood-derived human endothelial cell progenitors. *Stem Cells.* 2001;19(4):304-312.
82. Wang C, Jiao C, Hanlon HD, et al. Mechanical, cellular, and molecular factors interact to modulate circulating endothelial cell progenitors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* May 2004;286(5):H1985-1993.
83. Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, et al. Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Circ Res.* Nov 28 2003;93(11):1023-1025.
84. Sieveking DP, Buckle A, Celermajer DS, et al. Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: insights from a novel human angiogenesis assay. *J Am Coll Cardiol.* Feb 12 2008;51(6):660-668.
85. He T, Smith LA, Harrington S, et al. Transplantation of circulating endothelial progenitor cells restores endothelial function of denuded rabbit carotid arteries. *Stroke.* Oct 2004;35(10):2378-2384.
86. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation.* Mar 30 2004;109(12):1543-1549.
87. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res.* Mar 19 2004;94(5):678-685.
88. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* Feb 13 2003;348(7):593-600.
89. Ingram DA, Mead LE, Moore DB, et al. Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood.* Apr 1 2005;105(7):2783-2786.
90. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res.* Aug 20 2004;95(4):343-353.

91. Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol*. Sep 2002;30(9):973-981.
92. Levesque JP, Takamatsu Y, Nilsson SK, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*. Sep 1 2001;98(5):1289-1297.
93. Levesque JP, Hendy J, Takamatsu Y, et al. Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide. *J Clin Invest*. Jan 2003;111(2):187-196.
94. Ribatti D, Vacca A, Nico B, et al. Cross-talk between hematopoiesis and angiogenesis signaling pathways. *Curr Mol Med*. Sep 2002;2(6):537-543.
95. Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med*. Oct-Dec 2004;8(4):498-508.
96. Heissig B, Werb Z, Rafii S, et al. Role of c-kit/Kit ligand signaling in regulating vasculogenesis. *Thromb Haemost*. Oct 2003;90(4):570-576.
97. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med*. Nov 2003;9(11):1370-1376.
98. Vajkoczy P, Blum S, Lamparter M, et al. Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis. *J Exp Med*. Jun 16 2003;197(12):1755-1765.
99. Muller WA. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Lab Invest*. May 2002;82(5):521-533.
100. Soligo D, Schiro R, Luksch R, et al. Expression of integrins in human bone marrow. *Br J Haematol*. Nov 1990;76(3):323-332.
101. Chavakis E, Aicher A, Heeschen C, et al. Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *J Exp Med*. Jan 3 2005;201(1):63-72.
102. Wu Y, Ip JE, Huang J, et al. Essential role of ICAM-1/CD18 in mediating EPC recruitment, angiogenesis, and repair to the infarcted myocardium. *Circ Res*. Aug 4 2006;99(3):315-322.
103. Nishiwaki Y, Yoshida M, Iwaguro H, et al. Endothelial E-selectin potentiates neovascularization via endothelial progenitor cell-dependent and -independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Mar 2007;27(3):512-518.
104. Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, et al. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation*. Jun 25 2002;105(25):3017-3024.
105. Fujiyama S, Amano K, Uehira K, et al. Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells. *Circ Res*. Nov 14 2003;93(10):980-989.
106. Lev EI, Estrov Z, Aboulfatova K, et al. Potential role of activated platelets in homing of human endothelial progenitor cells to subendothelial matrix. *Thromb Haemost*. Oct 2006;96(4):498-504.

107. Hristov M, Zerneck A, Bidzhekov K, et al. Importance of CXC chemokine receptor 2 in the homing of human peripheral blood endothelial progenitor cells to sites of arterial injury. *Circ Res*. Mar 2 2007;100(4):590-597.
108. Langer H, May AE, Daub K, et al. Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro. *Circ Res*. Feb 3 2006;98(2):e2-10.
109. Massberg S, Konrad I, Schurzinger K, et al. Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *J Exp Med*. May 15 2006;203(5):1221-1233.
110. Stellos K, Gawaz M. Platelets and stromal cell-derived factor-1 in progenitor cell recruitment. *Semin Thromb Hemost*. Mar 2007;33(2):159-164.
111. de Boer HC, Verseyden C, Ulfman LH, et al. Fibrin and activated platelets cooperatively guide stem cells to a vascular injury and promote differentiation towards an endothelial cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Jul 2006;26(7):1653-1659.
112. Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet*. Aug 30 2003;362(9385):697-703.
113. Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, et al. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation*. Mar 11 2003;107(9):1322-1328.
114. Lee SH, Wolf PL, Escudero R, et al. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med*. Mar 2 2000;342(9):626-633.
115. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. Jun 12 2001;103(23):2776-2779.
116. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ Res*. Jun 23 2000;86(12):1198-1202.
117. Kryczek I, Lange A, Mottram P, et al. CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers. *Cancer Res*. Jan 15 2005;65(2):465-472.
118. Schattman GC, Dunnwald M, Jiao C. Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Jan 2007;292(1):H1-18.
119. Kollet O, Spiegel A, Peled A, et al. Rapid and efficient homing of human CD34(+)/CD38(-/low)/CXCR4(+) stem and progenitor cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Blood*. May 15 2001;97(10):3283-3291.
120. De Falco E, Porcelli D, Torella AR, et al. SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells. *Blood*. Dec 1 2004;104(12):3472-3482.
121. Daub K, Langer H, Seizer P, et al. Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells. *Faseb J*. Dec 2006;20(14):2559-2561.
122. Stellos K, Langer H, Daub K, et al. Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human CD34+ cells to endothelial progenitor cells. *Circulation*. Jan 15 2008;117(2):206-215.

123. Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood*. May 15 2000;95(10):3106-3112.
124. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest*. Aug 2001;108(3):391-397.
125. Guo Y, Chan R, Ramsey H, et al. The homeoprotein Hex is required for hemangioblast differentiation. *Blood*. Oct 1 2003;102(7):2428-2435.
126. Zippo A, De Robertis A, Bardelli M, et al. Identification of Flk-1 target genes in vasculogenesis: Pim-1 is required for endothelial and mural cell differentiation in vitro. *Blood*. Jun 15 2004;103(12):4536-4544.
127. Hristov M, Erl W, Linder S, et al. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*. Nov 1 2004;104(9):2761-2766.
128. Laufs U, Werner N, Link A, et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation*. Jan 20 2004;109(2):220-226.
129. Adams V, Lenk K, Linke A, et al. Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Apr 2004;24(4):684-690.
130. Strehlow K, Werner N, Berweiler J, et al. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation*. Jun 24 2003;107(24):3059-3065.
131. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*. Jul 6 2001;89(1):E1-7.
132. Krankel N, Adams V, Linke A, et al. Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Apr 2005;25(4):698-703.
133. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation*. Nov 26 2002;106(22):2781-2786.
134. Loomans CJ, de Koning EJ, Staal FJ, et al. Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes*. Jan 2004;53(1):195-199.
135. Gill M, Dias S, Hattori K, et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res*. Feb 2 2001;88(2):167-174.
136. Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, et al. CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation*. Sep 7 2004;110(10):1209-1212.
137. George J, Herz I, Goldstein E, et al. Number and adhesive properties of circulating endothelial progenitor cells in patients with in-stent restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Dec 2003;23(12):e57-60.
138. Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, et al. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow--derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest*. Aug 2001;108(3):399-405.

139. Werner N, Priller J, Laufs U, et al. Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Oct 1 2002;22(10):1567-1572.
140. Min TQ, Zhu CJ, Xiang WX, et al. Improvement in endothelial progenitor cells from peripheral blood by ramipril therapy in patients with stable coronary artery disease. *Cardiovasc Drugs Ther.* May 2004;18(3):203-209.
141. Imanishi T, Hano T, Nishio I. Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress. *J Hypertens.* Jan 2005;23(1):97-104.
142. Cho HJ, Kim HS, Lee MM, et al. Mobilized endothelial progenitor cells by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor accelerate reendothelialization and reduce vascular inflammation after intravascular radiation. *Circulation.* Dec 9 2003;108(23):2918-2925.
143. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, et al. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood.* Aug 15 2003;102(4):1340-1346.
144. Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, et al. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood.* Feb 1 2004;103(3):921-926.
145. Liehn EA, Schober A, Weber C. Blockade of keratinocyte-derived chemokine inhibits endothelial recovery and enhances plaque formation after arterial injury in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Oct 2004;24(10):1891-1896.
146. Seeger FH, Haendeler J, Walter DH, et al. p38 mitogen-activated protein kinase downregulates endothelial progenitor cells. *Circulation.* Mar 8 2005;111(9):1184-1191.
147. Verma S, Kuliszewski MA, Li SH, et al. C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease. *Circulation.* May 4 2004;109(17):2058-2067.
148. Li B, Sharpe EE, Maupin AB, et al. VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *Faseb J.* Jul 2006;20(9):1495-1497.
149. Moore MA, Hattori K, Heissig B, et al. Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector-mediated elevation of serum levels of SDF-1, VEGF, and angiopoietin-1. *Ann N Y Acad Sci.* Jun 2001;938:36-45; discussion 45-37.
150. Li X, Tjwa M, Moons L, et al. Revascularization of ischemic tissues by PDGF-CC via effects on endothelial cells and their progenitors. *J Clin Invest.* Jan 2005;115(1):118-127.
151. Pistrosch F, Herbrig K, Oelschlaegel U, et al. PPARgamma-agonist rosiglitazone increases number and migratory activity of cultured endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis.* Nov 2005;183(1):163-167.
152. Han JK, Lee HS, Yang HM, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-delta agonist enhances vasculogenesis by regulating endothelial progenitor cells through genomic and nongenomic activations of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Circulation.* Sep 2 2008;118(10):1021-1033.
153. Hoetzer GL, Van Guilder GP, Irmiger HM, et al. Aging, exercise, and endothelial progenitor cell clonogenic and migratory capacity in men. *J Appl Physiol.* Mar 2007;102(3):847-852.
154. Yao EH, Yu Y, Fukuda N. Oxidative stress on progenitor and stem cells in cardiovascular diseases. *Curr Pharm Biotechnol.* Apr 2006;7(2):101-108.

155. Chen JZ, Zhang FR, Tao QM, et al. Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)*. Sep 2004;107(3):273-280.
156. Werner N, Nickenig G. Influence of cardiovascular risk factors on endothelial progenitor cells: limitations for therapy? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Feb 2006;26(2):257-266.
157. Tamarat R, Silvestre JS, Le Ricousse-Roussanne S, et al. Impairment in ischemia-induced neovascularization in diabetes: bone marrow mononuclear cell dysfunction and therapeutic potential of placenta growth factor treatment. *Am J Pathol*. Feb 2004;164(2):457-466.
158. Wang CH, Ciliberti N, Li SH, et al. Rosiglitazone facilitates angiogenic progenitor cell differentiation toward endothelial lineage: a new paradigm in glitazone pleiotropy. *Circulation*. Mar 23 2004;109(11):1392-1400.
159. Sorrentino SA, Bahlmann FH, Besler C, et al. Oxidant stress impairs in vivo reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells from patients with type 2 diabetes mellitus: restoration by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *Circulation*. Jul 10 2007;116(2):163-173.
160. Bahlmann FH, de Groot K, Mueller O, et al. Stimulation of endothelial progenitor cells: a new putative therapeutic effect of angiotensin II receptor antagonists. *Hypertension*. Apr 2005;45(4):526-529.
161. Wang X, Chen J, Tao Q, et al. Effects of ox-LDL on number and activity of circulating endothelial progenitor cells. *Drug Chem Toxicol*. Aug 2004;27(3):243-255.
162. Imanishi T, Hano T, Sawamura T, et al. Oxidized low-density lipoprotein induces endothelial progenitor cell senescence, leading to cellular dysfunction. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. Jul 2004;31(7):407-413.
163. Imanishi T, Hano T, Matsuo Y, et al. Oxidized low-density lipoprotein inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial progenitor cell differentiation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. Sep 2003;30(9):665-670.
164. Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, et al. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Aug 2004;24(8):1442-1447.
165. Wang X, Zhu J, Chen J, et al. Effects of nicotine on the number and activity of circulating endothelial progenitor cells. *J Clin Pharmacol*. Aug 2004;44(8):881-889.
166. Laufs U, Wassmann S, Czech T, et al. Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Apr 2005;25(4):809-814.
167. Sandri M, Adams V, Gielen S, et al. Effects of exercise and ischemia on mobilization and functional activation of blood-derived progenitor cells in patients with ischemic syndromes: results of 3 randomized studies. *Circulation*. Jun 28 2005;111(25):3391-3399.
168. Laufs U, Urhausen A, Werner N, et al. Running exercise of different duration and intensity: effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. Aug 2005;12(4):407-414.
169. Tousoulis D, Andreou I, Antoniadis C, et al. Role of inflammation and oxidative stress in endothelial progenitor cell function and mobilization: Therapeutic implications for cardiovascular diseases. *Atherosclerosis*. May 28 2008.

170. Ueda S, Masutani H, Nakamura H, et al. Redox control of cell death. *Antioxid Redox Signal*. Jun 2002;4(3):405-414.
171. Noble M, Smith J, Power J, et al. Redox state as a central modulator of precursor cell function. *Ann N Y Acad Sci*. Jun 2003;991:251-271.
172. Fujino G, Noguchi T, Takeda K, et al. Thioredoxin and protein kinases in redox signaling. *Semin Cancer Biol*. Dec 2006;16(6):427-435.
173. Lander HM, Milbank AJ, Tauras JM, et al. Redox regulation of cell signalling. *Nature*. May 30 1996;381(6581):380-381.
174. Lander HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *Faseb J*. Feb 1997;11(2):118-124.
175. Yoshida T, Oka S, Masutani H, et al. The role of thioredoxin in the aging process: involvement of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. Oct 2003;5(5):563-570.
176. Thum T, Fraccarollo D, Schultheiss M, et al. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling impairs endothelial progenitor cell mobilization and function in diabetes. *Diabetes*. Mar 2007;56(3):666-674.
177. Marumo T, Uchimura H, Hayashi M, et al. Aldosterone impairs bone marrow-derived progenitor cell formation. *Hypertension*. Sep 2006;48(3):490-496.
178. Urbich C, Knau A, Fichtlscherer S, et al. FOXO-dependent expression of the proapoptotic protein Bim: pivotal role for apoptosis signaling in endothelial progenitor cells. *Faseb J*. Jun 2005;19(8):974-976.
179. Ma FX, Zhou B, Chen Z, et al. Oxidized low density lipoprotein impairs endothelial progenitor cells by regulation of endothelial nitric oxide synthase. *J Lipid Res*. Jun 2006;47(6):1227-1237.
180. Zhu JH, Chen JZ, Wang XX, et al. Homocysteine accelerates senescence and reduces proliferation of endothelial progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol*. May 2006;40(5):648-652.
181. Thum T, Tsikas D, Stein S, et al. Suppression of endothelial progenitor cells in human coronary artery disease by the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol*. Nov 1 2005;46(9):1693-1701.
182. Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont PJ, Davis BH, et al. Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. *Circulation*. Jul 29 2003;108(4):457-463.
183. Scheubel RJ, Zorn H, Silber RE, et al. Age-dependent depression in circulating endothelial progenitor cells in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *J Am Coll Cardiol*. Dec 17 2003;42(12):2073-2080.
184. Edelberg JM, Tang L, Hattori K, et al. Young adult bone marrow-derived endothelial precursor cells restore aging-impaired cardiac angiogenic function. *Circ Res*. May 31 2002;90(10):E89-93.
185. Rivard A, Fabre JE, Silver M, et al. Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation*. Jan 5-12 1999;99(1):111-120.
186. Gennaro G, Menard C, Michaud SE, et al. Age-dependent impairment of reendothelialization after arterial injury: role of vascular endothelial growth factor. *Circulation*. Jan 21 2003;107(2):230-233.
187. Rivard A, Berthou-Soulie L, Principe N, et al. Age-dependent defect in vascular endothelial growth factor expression is associated with reduced hypoxia-inducible factor 1 activity. *J Biol Chem*. Sep 22 2000;275(38):29643-29647.

188. Tschudi MR, Barton M, Bersinger NA, et al. Effect of age on kinetics of nitric oxide release in rat aorta and pulmonary artery. *J Clin Invest*. Aug 15 1996;98(4):899-905.
189. Cooke JP, Losordo DW. Nitric oxide and angiogenesis. *Circulation*. May 7 2002;105(18):2133-2135.
190. Hoffmann J, Haendeler J, Aicher A, et al. Aging enhances the sensitivity of endothelial cells toward apoptotic stimuli: important role of nitric oxide. *Circ Res*. Oct 12 2001;89(8):709-715.
191. Chen JZ, Zhu JH, Wang XX, et al. Effects of homocysteine on number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood. *J Mol Cell Cardiol*. Feb 2004;36(2):233-239.
192. Suh W, Kim KL, Choi JH, et al. C-reactive protein impairs angiogenic functions and decreases the secretion of arteriogenic chemo-cytokines in human endothelial progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. Aug 13 2004;321(1):65-71.
193. Assmus B, Urbich C, Aicher A, et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce senescence and increase proliferation of endothelial progenitor cells via regulation of cell cycle regulatory genes. *Circ Res*. May 16 2003;92(9):1049-1055.
194. Endemann DH. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(8):1983-1992.
195. Drexler H, Hornig B. Endothelial dysfunction in human disease. *J Mol Cell Cardiol*. Jan 1999;31(1):51-60.
196. Bunting S, Moncada S, Vane JR. Antithrombotic properties of vascular endothelium. *Lancet*. Nov 19 1977;2(8047):1075-1076.
197. Vane JR, Botting RM. Endothelium--thromboresistance. *Wien Klin Wochenschr*. 1991;103(14):403-404.
198. Xu Q. The impact of progenitor cells in atherosclerosis. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. Feb 2006;3(2):94-101.
199. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. Aug 6 1999;85(3):221-228.
200. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation*. Aug 28 2001;104(9):1046-1052.
201. Urbich C, Aicher A, Heeschen C, et al. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol*. Nov 2005;39(5):733-742.
202. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*. Feb 6 2001;103(5):634-637.
203. Griese DP, Ehsan A, Melo LG, et al. Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy. *Circulation*. Nov 25 2003;108(21):2710-2715.
204. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation*. Jun 19 2001;103(24):2885-2890.

205. Kong D, Melo LG, Mangi AA, et al. Enhanced inhibition of neointimal hyperplasia by genetically engineered endothelial progenitor cells. *Circulation*. Apr 13 2004;109(14):1769-1775.
206. Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, et al. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation*. Feb 12 2002;105(6):732-738.
207. Dome B, Hendrix MJ, Paku S, et al. Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol*. Jan 2007;170(1):1-15.
208. Goon PK, Lip GY, Boos CJ, et al. Circulating endothelial cells, endothelial progenitor cells, and endothelial microparticles in cancer. *Neoplasia*. Feb 2006;8(2):79-88.
209. Peters BA, Diaz LA, Polyak K, et al. Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat Med*. Mar 2005;11(3):261-262.
210. Natori T, Sata M, Washida M, et al. G-CSF stimulates angiogenesis and promotes tumor growth: potential contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. Oct 4 2002;297(4):1058-1061.
211. Op den Buijs J, Musters M, Verrips T, et al. Mathematical modeling of vascular endothelial layer maintenance: the role of endothelial cell division, progenitor cell homing, and telomere shortening. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Dec 2004;287(6):H2651-2658.
212. Wassmann S, Werner N, Czech T, et al. Improvement of endothelial function by systemic transfusion of vascular progenitor cells. *Circ Res*. Oct 13 2006;99(8):e74-83.
213. Werner N, Junk S, Laufs U, et al. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ Res*. Jul 25 2003;93(2):e17-24.
214. Rossig L, Dimmeler S, Zeiher AM. Apoptosis in the vascular wall and atherosclerosis. *Basic Res Cardiol*. Feb 2001;96(1):11-22.
215. Gunsilius E, Duba HC, Petzer AL, et al. Evidence from a leukaemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells. *Lancet*. May 13 2000;355(9216):1688-1691.
216. Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest*. May 1999;103(9):1231-1236.
217. Yang C, Zhang ZH, Lu SH, et al. [Transplantation of cord blood endothelial progenitor cells ameliorates limb ischemia]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. Aug 25 2003;83(16):1437-1441.
218. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation*. Feb 13 2001;103(6):897-903.
219. Murohara T, Ikeda H, Duan J, et al. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest*. Jun 2000;105(11):1527-1536.
220. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*. Aug 10 2002;360(9331):427-435.
221. Iba O, Matsubara H, Nozawa Y, et al. Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs. *Circulation*. Oct 8 2002;106(15):2019-2025.

222. Itescu S, Kocher AA, Schuster MD. Myocardial neovascularization by adult bone marrow-derived angioblasts: strategies for improvement of cardiomyocyte function. *Ann Hematol.* 2002;81 Suppl 2:S21-25.
223. Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, et al. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation.* Jan 28 2003;107(3):461-468.
224. Walter DH, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: regulation and contribution to adult neovascularization. *Herz.* Nov 2002;27(7):579-588.
225. Hirata K, Li TS, Nishida M, et al. Autologous bone marrow cell implantation as therapeutic angiogenesis for ischemic hindlimb in diabetic rat model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Jan 2003;284(1):H66-70.
226. Li TS, Hamano K, Suzuki K, et al. Improved angiogenic potency by implantation of ex vivo hypoxia prestimulated bone marrow cells in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Aug 2002;283(2):H468-473.
227. Herold J, Pipp F, Fernandez B, et al. Transplantation of monocytes: a novel strategy for in vivo augmentation of collateral vessel growth. *Hum Gene Ther.* Jan 2004;15(1):1-12.
228. Fuchs S, Baffour R, Zhou YF, et al. Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol.* May 2001;37(6):1726-1732.
229. Vicario J, Piva J, Pierini A, et al. Transcoronary sinus delivery of autologous bone marrow and angiogenesis in pig models with myocardial injury. *Cardiovasc Radiat Med.* Apr-Jun 2002;3(2):91-94.
230. Waksman R, Fournadjiev J, Baffour R, et al. Transepocardial autologous bone marrow-derived mononuclear cell therapy in a porcine model of chronically infarcted myocardium. *Cardiovasc Radiat Med.* Jul-Sep 2004;5(3):125-131.
231. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation.* Dec 10 2002;106(24):3009-3017.
232. Lyden D, Hattori K, Dias S, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med.* Nov 2001;7(11):1194-1201.
233. Okazaki T, Ebihara S, Asada M, et al. Granulocyte colony-stimulating factor promotes tumor angiogenesis via increasing circulating endothelial progenitor cells and Gr1+CD11b+ cells in cancer animal models. *Int Immunol.* Jan 2006;18(1):1-9.
234. Zhang H, Vakil V, Braunstein M, et al. Circulating endothelial progenitor cells in multiple myeloma: implications and significance. *Blood.* Apr 15 2005;105(8):3286-3294.
235. Hilbe W, Dirnhofer S, Oberwasserlechner F, et al. CD133 positive endothelial progenitor cells contribute to the tumour vasculature in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol.* Sep 2004;57(9):965-969.
236. Lee IG, Chae SL, Kim JC. Involvement of circulating endothelial progenitor cells and vasculogenic factors in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Eye.* May 2006;20(5):546-552.
237. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, et al. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest.* Feb 2002;109(3):337-346.

238. Grant MB, May WS, Caballero S, et al. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med*. Jun 2002;8(6):607-612.
239. Yoon CH, Hur J, Park KW, et al. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation*. Sep 13 2005;112(11):1618-1627.
240. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. Dec 19-26 2002;420(6917):868-874.
241. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med*. Sep 8 2005;353(10):999-1007.
242. Leclercq F, Grolleau R. [Mechanisms of restenosis after coronary angioplasty]. *Arch Mal Coeur Vaiss*. Mar 1996;89(3):359-365.
243. Kivela A, Hartikainen J. Restenosis related to percutaneous coronary intervention has been solved? *Ann Med*. 2006;38(3):173-187.
244. Welt FG, Rogers C. Inflammation and restenosis in the stent era. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Nov 1 2002;22(11):1769-1776.
245. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab Invest*. Sep 1983;49(3):327-333.
246. Wu X, Wang K, Cui L, et al. Effects of granulocyte-colony stimulating factor on the repair of balloon-injured arteries. *Pathology*. Aug 2008;40(5):513-519.
247. Matsuo Y, Imanishi T, Hayashi Y, et al. The effect of senescence of endothelial progenitor cells on in-stent restenosis in patients undergoing coronary stenting. *Intern Med*. 2006;45(9):581-587.
248. Lei LC, Huo Y, Li JP, et al. [Activities of circulating endothelial progenitor cells in patients with in-stent restenosis]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. Dec 25 2007;87(48):3394-3398.
249. Ii M, Takenaka H, Asai J, et al. Endothelial progenitor thrombospondin-1 mediates diabetes-induced delay in reendothelialization following arterial injury. *Circ Res*. Mar 17 2006;98(5):697-704.
250. Blindt R, Vogt F, Astafieva I, et al. A novel drug-eluting stent coated with an integrin-binding cyclic Arg-Gly-Asp peptide inhibits neointimal hyperplasia by recruiting endothelial progenitor cells. *J Am Coll Cardiol*. May 2 2006;47(9):1786-1795.
251. Aoki J, Serruys PW, van Beusekom H, et al. Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34: the HEALING-FIM (Healthy Endothelial Accelerated Lining Inhibits Neointimal Growth-First In Man) Registry. *J Am Coll Cardiol*. May 17 2005;45(10):1574-1579.
252. Davies MJ, Thomas AC. Plaque fissuring--the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina. *Br Heart J*. Apr 1985;53(4):363-373.
253. Massberg S, Brand K, Gruner S, et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med*. Oct 7 2002;196(7):887-896.
254. Kroll MH, Harris TS, Moake JL, et al. von Willebrand factor binding to platelet GpIb initiates signals for platelet activation. *J Clin Invest*. Nov 1991;88(5):1568-1573.
255. Kunz GA, Liang G, Cuculi F, et al. Circulating endothelial progenitor cells predict coronary artery disease severity. *Am Heart J*. Jul 2006;152(1):190-195.

256. Li XQ, Meng QY, Wu HR. Effects of bone marrow-derived endothelial progenitor cell transplantation on vein microenvironment in a rat model of chronic thrombosis. *Chin Med J (Engl)*. Dec 20 2007;120(24):2245-2249.
257. Abou-Saleh H YD, Théorêt JF, Gillis MA, Neagoe PE, Labarthe B, Thérooux P, Sirois MG, Tabrizian M, Thorin E, Merhi Y. Endothelial progenitor cells bind and inhibit platelet function and thrombus formation. *Circulation (under review)*. 2009.
258. Luscher TF, Noll G. The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. *Atherosclerosis*. Dec 1995;118 Suppl:S81-90.
259. Mayr U, Zou Y, Zhang Z, et al. Accelerated arteriosclerosis of vein grafts in inducible NO synthase(-/-) mice is related to decreased endothelial progenitor cell repair. *Circ Res*. Feb 17 2006;98(3):412-420.
260. George JN. Platelets. *Lancet*. Apr 29 2000;355(9214):1531-1539.
261. Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood*. Apr 15 1998;91(8):2645-2657.
262. Furie B, Furie BC, Flaumenhaft R. A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion. *Thromb Haemost*. Jul 2001;86(1):214-221.
263. Shattil SJ, Ginsberg MH, Brugge JS. Adhesive signaling in platelets. *Curr Opin Cell Biol*. Oct 1994;6(5):695-704.
264. Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, et al. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol*. Sep 1985;101(3):880-886.
265. Lopez JA, Andrews RK, Afshar-Kharghan V, et al. Bernard-Soulier syndrome. *Blood*. Jun 15 1998;91(12):4397-4418.
266. Santoro SA, Rajpara SM, Staatz WD, et al. Isolation and characterization of a platelet surface collagen binding complex related to VLA-2. *Biochem Biophys Res Commun*. May 31 1988;153(1):217-223.
267. Saelman EU, Nieuwenhuis HK, Hese KM, et al. Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa (alpha 2 beta 1-integrin). *Blood*. Mar 1 1994;83(5):1244-1250.
268. Staatz WD, Rajpara SM, Wayner EA, et al. The membrane glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) complex mediates the Mg⁺⁺-dependent adhesion of platelets to collagen. *J Cell Biol*. May 1989;108(5):1917-1924.
269. Moroi M, Jung SM, Shinmyozu K, et al. Analysis of platelet adhesion to a collagen-coated surface under flow conditions: the involvement of glycoprotein VI in the platelet adhesion. *Blood*. Sep 15 1996;88(6):2081-2092.
270. He L, Pappan LK, Grenache DG, et al. The contributions of the alpha 2 beta 1 integrin to vascular thrombosis in vivo. *Blood*. Nov 15 2003;102(10):3652-3657.
271. Clemetson JM, Polgar J, Magnenat E, et al. The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to FcalphaR and the natural killer receptors. *J Biol Chem*. Oct 8 1999;274(41):29019-29024.
272. Diaz-Ricart M, Tandon NN, Carretero M, et al. Platelets lacking functional CD36 (glycoprotein IV) show reduced adhesion to collagen in flowing whole blood. *Blood*. Jul 15 1993;82(2):491-496.

273. Kehrel B, Kronenberg A, Rauterberg J, et al. Platelets deficient in glycoprotein IIIb aggregate normally to collagens type I and III but not to collagen type V. *Blood*. Dec 1 1993;82(11):3364-3370.
274. Daniel JL, Dangelmaier C, Strouse R, et al. Collagen induces normal signal transduction in platelets deficient in CD36 (platelet glycoprotein IV). *Thromb Haemost*. Mar 1994;71(3):353-356.
275. Collier BS, Peerschke EI, Scudder LE, et al. Studies with a murine monoclonal antibody that abolishes ristocetin-induced binding of von Willebrand factor to platelets: additional evidence in support of GPIb as a platelet receptor for von Willebrand factor. *Blood*. Jan 1983;61(1):99-110.
276. Berndt MC, Gregory C, Kabral A, et al. Purification and preliminary characterization of the glycoprotein Ib complex in the human platelet membrane. *Eur J Biochem*. Sep 16 1985;151(3):637-649.
277. Modderman PW, Admiraal LG, Sonnenberg A, et al. Glycoproteins V and Ib-IX form a noncovalent complex in the platelet membrane. *J Biol Chem*. Jan 5 1992;267(1):364-369.
278. Berndt MC, Shen Y, Dopheide SM, et al. The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Thromb Haemost*. Jul 2001;86(1):178-188.
279. Du X, Ginsberg MH. Integrin alpha IIb beta 3 and platelet function. *Thromb Haemost*. Jul 1997;78(1):96-100.
280. Clemetson KJ. Platelet activation: signal transduction via membrane receptors. *Thromb Haemost*. Jul 1995;74(1):111-116.
281. Kulkarni S, Dopheide SM, Yap CL, et al. A revised model of platelet aggregation. *J Clin Invest*. Mar 2000;105(6):783-791.
282. Phillips DR, Charo IF, Parise LV, et al. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood*. Apr 1988;71(4):831-843.
283. Jennings LK, Phillips DR. Purification of glycoproteins IIb and III from human platelet plasma membranes and characterization of a calcium-dependent glycoprotein IIb-III complex. *J Biol Chem*. Sep 10 1982;257(17):10458-10466.
284. Shattil SJ. Regulation of platelet anchorage and signaling by integrin alpha IIb beta 3. *Thromb Haemost*. Jul 1 1993;70(1):224-228.
285. Byzova TV, Plow EF. Networking in the hemostatic system. Integrin alphaIIb beta3 binds prothrombin and influences its activation. *J Biol Chem*. Oct 24 1997;272(43):27183-27188.
286. Felding-Habermann B, Silletti S, Mei F, et al. A single immunoglobulin-like domain of the human neural cell adhesion molecule L1 supports adhesion by multiple vascular and platelet integrins. *J Cell Biol*. Dec 15 1997;139(6):1567-1581.
287. Shattil SJ. Function and regulation of the beta 3 integrins in hemostasis and vascular biology. *Thromb Haemost*. Jul 1995;74(1):149-155.
288. Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science*. Apr 14 1995;268(5208):233-239.
289. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science*. Aug 13 1999;285(5430):1028-1032.
290. Hantgan RR, Paumi C, Rocco M, et al. Effects of ligand-mimetic peptides Arg-Gly-Asp-X (X = Phe, Trp, Ser) on alphaIIb beta3 integrin conformation and oligomerization. *Biochemistry*. Nov 2 1999;38(44):14461-14474.

291. Stephens G, O'Lunaigh N, Reilly D, et al. A sequence within the cytoplasmic tail of GpIIb independently activates platelet aggregation and thromboxane synthesis. *J Biol Chem*. Aug 7 1998;273(32):20317-20322.
292. Miyamoto S, Akiyama SK, Yamada KM. Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function. *Science*. Feb 10 1995;267(5199):883-885.
293. Miyamoto S, Teramoto H, Coso OA, et al. Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol*. Nov 1995;131(3):791-805.
294. Reverter JC, Beguin S, Kessels H, et al. Inhibition of platelet-mediated, tissue factor-induced thrombin generation by the mouse/human chimeric 7E3 antibody. Potential implications for the effect of c7E3 Fab treatment on acute thrombosis and "clinical restenosis". *J Clin Invest*. Aug 1 1996;98(3):863-874.
295. Yang J, Furie BC, Furie B. The biology of P-selectin glycoprotein ligand-1: its role as a selectin counterreceptor in leukocyte-endothelial and leukocyte-platelet interaction. *Thromb Haemost*. Jan 1999;81(1):1-7.
296. Bevilacqua M, Butcher E, Furie B, et al. Selectins: a family of adhesion receptors. *Cell*. Oct 18 1991;67(2):233.
297. Israels SJ, Gerrard JM, Jacques YV, et al. Platelet dense granule membranes contain both granulophysin and P-selectin (GMP-140). *Blood*. Jul 1 1992;80(1):143-152.
298. Norcott JP, Solari R, Cutler DF. Targeting of P-selectin to two regulated secretory organelles in PC12 cells. *J Cell Biol*. Sep 1996;134(5):1229-1240.
299. Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood*. Nov 1 1996;88(9):3259-3287.
300. Hsu-Lin S, Berman CL, Furie BC, et al. A platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion. Studies using a monoclonal antibody specific for thrombin-activated platelets. *J Biol Chem*. Jul 25 1984;259(14):9121-9126.
301. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, et al. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest*. Jul 1989;84(1):92-99.
302. Bonfanti R, Furie BC, Furie B, et al. PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood*. Apr 1989;73(5):1109-1112.
303. Koedam JA, Cramer EM, Briend E, et al. P-selectin, a granule membrane protein of platelets and endothelial cells, follows the regulated secretory pathway in AtT-20 cells. *J Cell Biol*. Feb 1992;116(3):617-625.
304. Disdier M, Morrissey JH, Fugate RD, et al. Cytoplasmic domain of P-selectin (CD62) contains the signal for sorting into the regulated secretory pathway. *Mol Biol Cell*. Mar 1992;3(3):309-321.
305. Malik AB. Endothelial cell interactions and integrins. *New Horiz*. Feb 1993;1(1):37-51.
306. Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest*. Feb 1993;91(2):379-387.
307. Furie B, Furie BC. The molecular basis of platelet and endothelial cell interaction with neutrophils and monocytes: role of P-selectin and the P-selectin ligand, PSGL-1. *Thromb Haemost*. Jul 1995;74(1):224-227.
308. Moore KL, Patel KD, Bruehl RE, et al. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol*. Feb 1995;128(4):661-671.
309. Vachino G, Chang XJ, Veldman GM, et al. P-selectin glycoprotein ligand-1 is the major counter-receptor for P-selectin on stimulated T cells and is widely distributed in non-

- functional form on many lymphocytic cells. *J Biol Chem*. Sep 15 1995;270(37):21966-21974.
310. Moore KL, Eaton SF, Lyons DE, et al. The P-selectin glycoprotein ligand from human neutrophils displays sialylated, fucosylated, O-linked poly-N-acetyllactosamine. *J Biol Chem*. Sep 16 1994;269(37):23318-23327.
 311. Romo GM, Dong JF, Schade AJ, et al. The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J Exp Med*. Sep 20 1999;190(6):803-814.
 312. Moog S, Mangin P, Lenain N, et al. Platelet glycoprotein V binds to collagen and participates in platelet adhesion and aggregation. *Blood*. Aug 15 2001;98(4):1038-1046.
 313. Giesberts AN, van Willigen G, Lapetina EG, et al. Regulation of platelet glycoprotein IIb/IIIa (integrin alpha IIB beta 3) function via the thrombin receptor. *Biochem J*. Jul 15 1995;309 (Pt 2):613-620.
 314. Schneider DJ, Taatjes DJ, Sobel BE. Paradoxical inhibition of fibrinogen binding and potentiation of alpha-granule release by specific types of inhibitors of glycoprotein IIb-IIIa. *Cardiovasc Res*. Jan 14 2000;45(2):437-446.
 315. Bachelot C, Rendu F, Gulino D. Anti-GPIIb/IIIa antibodies: powerful tools to investigate function and regulation of an integrin. *Semin Thromb Hemost*. 1995;21(1):23-36.
 316. Andrews RK, Lopez JA, Berndt MC. Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *Int J Biochem Cell Biol*. Jan 1997;29(1):91-105.
 317. Frenette PS, Moyna C, Hartwell DW, et al. Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules. *Blood*. Feb 15 1998;91(4):1318-1324.
 318. Wilkins PP, McEver RP, Cummings RD. Structures of the O-glycans on P-selectin glycoprotein ligand-1 from HL-60 cells. *J Biol Chem*. Aug 2 1996;271(31):18732-18742.
 319. Frenette PS, Denis CV, Weiss L, et al. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med*. Apr 17 2000;191(8):1413-1422.
 320. Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIbIIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alphavbeta3 integrin, and GPIIbalpha. *J Exp Med*. Feb 2 1998;187(3):329-339.
 321. Moroi M, Jung SM. Integrin-mediated platelet adhesion. *Front Biosci*. Jul 23 1998;3:d719-728.
 322. Ruggeri ZM. Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *Thromb Haemost*. Jul 1997;78(1):611-616.
 323. Ware JA, Heistad DD. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Platelet-endothelium interactions. *N Engl J Med*. Mar 4 1993;328(9):628-635.
 324. Ruf A, Morgenstern E. Ultrastructural aspects of platelet adhesion on subendothelial structures. *Semin Thromb Hemost*. 1995;21(2):119-122.
 325. Ruf A, Patscheke H, Morgenstern E. Role of internalization in platelet activation induced by collagen fibers--differential effects of aspirin, cytochalasin D, and prostaglandin E1. *Thromb Haemost*. Dec 2 1991;66(6):708-714.
 326. Frojmovic MM. Platelet aggregation in flow: differential roles for adhesive receptors and ligands. *Am Heart J*. May 1998;135(5 Pt 2 Su):S119-131.
 327. Offermanns S. The role of heterotrimeric G proteins in platelet activation. *Biol Chem*. May-Jun 2000;381(5-6):389-396.
 328. Bennett JS. Novel platelet inhibitors. *Annu Rev Med*. 2001;52:161-184.

329. Sixma JJ, Slot JW, Geuze HJ. Immunocytochemical localization of platelet granule proteins. *Methods Enzymol.* 1989;169:301-311.
330. Costa JL, Reese TS, Murphy DL. Serotonin storage in platelets: estimation of storage-packet size. *Science.* Feb 8 1974;183(124):537-538.
331. Brass LF, Manning DR, Cichowski K, et al. Signaling through G proteins in platelets: to the integrins and beyond. *Thromb Haemost.* Jul 1997;78(1):581-589.
332. Barnes MJ, Knight CG, Farndale RW. The collagen-platelet interaction. *Curr Opin Hematol.* Sep 1998;5(5):314-320.
333. Rink TJ, Smith SW, Tsien RY. Cytoplasmic free Ca²⁺ in human platelets: Ca²⁺ thresholds and Ca-independent activation for shape-change and secretion. *FEBS Lett.* Nov 1 1982;148(1):21-26.
334. Knight DE, Hallam TJ, Scrutton MC. Agonist selectivity and second messenger concentration in Ca²⁺-mediated secretion. *Nature.* Mar 18 1982;296(5854):256-257.
335. Ware JA, Johnson PC, Smith M, et al. Effect of common agonists on cytoplasmic ionized calcium concentration in platelets. Measurement with 2-methyl-6-methoxy 8-nitroquinoline (quin2) and aequorin. *J Clin Invest.* Mar 1986;77(3):878-886.
336. Carty DJ, Spielberg F, Gear AR. Thrombin causes subsecond changes in protein phosphorylation of platelets. *Blood.* Jun 1986;67(6):1738-1743.
337. Tyers M, Rachubinski RA, Stewart MI, et al. Molecular cloning and expression of the major protein kinase C substrate of platelets. *Nature.* Jun 2 1988;333(6172):470-473.
338. Reed GL, Houg AK, Fitzgerald ML. Human platelets contain SNARE proteins and a Sec1p homologue that interacts with syntaxin 4 and is phosphorylated after thrombin activation: implications for platelet secretion. *Blood.* Apr 15 1999;93(8):2617-2626.
339. Chung SH, Polgar J, Reed GL. Protein kinase C phosphorylation of syntaxin 4 in thrombin-activated human platelets. *J Biol Chem.* Aug 18 2000;275(33):25286-25291.
340. Libersan D, Merhi Y. Platelet P-selectin expression: requirement for protein kinase C, but not protein tyrosine kinase or phosphoinositide 3-kinase. *Thromb Haemost.* Jun 2003;89(6):1016-1023.
341. Lefebvre P, White JG, Krumwiede MD, et al. Role of actin in platelet function. *Eur J Cell Biol.* Dec 1993;62(2):194-204.
342. Rozenvayn N, Flaumenhaft R. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate mediates Ca²⁺-induced platelet alpha-granule secretion: evidence for type II phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase function. *J Biol Chem.* Jun 22 2001;276(25):22410-22419.
343. Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules--Part 1. *N Engl J Med.* Jun 6 1996;334(23):1526-1529.
344. Rozenvayn N, Flaumenhaft R. Protein kinase C mediates translocation of type II phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase required for platelet alpha-granule secretion. *J Biol Chem.* Mar 7 2003;278(10):8126-8134.
345. Chen M, Geng JG. Inhibition of protein tyrosine phosphatases suppresses P-selectin exocytosis in activated human platelets. *Biochem Biophys Res Commun.* Aug 31 2001;286(4):831-838.
346. Marcu MG, Zhang L, Nau-Staudt K, et al. Recombinant scinderin, an F-actin severing protein, increases calcium-induced release of serotonin from permeabilized platelets, an effect blocked by two scinderin-derived actin-binding peptides and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Blood.* Jan 1 1996;87(1):20-24.

347. Hashimoto I, Nakanishi H, Shono Y, et al. The features of thrombus in a microvessel injury model and the antithrombotic efficacy of heparin, urokinase, and prostaglandin E1. *Plast Reconstr Surg.* Jun 2003;111(7):2307-2314.
348. Levy-Toledano S. Platelet signal transduction pathways: could we organize them into a 'hierarchy'? *Haemostasis.* Sep 1999;29(1):4-15.
349. De Marco L, Mazzucato M, Masotti A, et al. Function of glycoprotein Ib alpha in platelet activation induced by alpha-thrombin. *J Biol Chem.* Dec 15 1991;266(35):23776-23783.
350. Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M, et al. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem.* Sep 15 1985;260(20):11107-11114.
351. Merten M, Thiagarajan P. P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates. *Circulation.* Oct 17 2000;102(16):1931-1936.
352. Merten M, Chow T, Hellums JD, et al. A new role for P-selectin in shear-induced platelet aggregation. *Circulation.* Oct 24 2000;102(17):2045-2050.
353. Merten M, Pakala R, Thiagarajan P, et al. Platelet microparticles promote platelet interaction with subendothelial matrix in a glycoprotein IIb/IIIa-dependent mechanism. *Circulation.* May 18 1999;99(19):2577-2582.
354. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol.* May 1967;13(3):269-288.
355. Pasquet JM, Toti F, Nurden AT, et al. Procoagulant activity and active calpain in platelet-derived microparticles. *Thromb Res.* Jun 15 1996;82(6):509-522.
356. Forlow SB, McEver RP, Nollert MU. Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow. *Blood.* Feb 15 2000;95(4):1317-1323.
357. Simon DI, Chen Z, Xu H, et al. Platelet glycoprotein Iba1 is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Exp Med.* Jul 17 2000;192(2):193-204.
358. Diacovo TG, Roth SJ, Buccola JM, et al. Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18. *Blood.* Jul 1 1996;88(1):146-157.
359. Weyrich AS, McIntyre TM, McEver RP, et al. Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor necrosis factor-alpha secretion. Signal integration and NF-kappa B translocation. *J Clin Invest.* May 1995;95(5):2297-2303.
360. Koike J, Nagata K, Kudo S, et al. Density-dependent induction of TNF-alpha release from human monocytes by immobilized P-selectin. *FEBS Lett.* Jul 14 2000;477(1-2):84-88.
361. Weyrich AS, Elstad MR, McEver RP, et al. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J Clin Invest.* Mar 15 1996;97(6):1525-1534.
362. Tsuji T, Nagata K, Koike J, et al. Induction of superoxide anion production from monocytes and neutrophils by activated platelets through the P-selectin-sialyl Lewis X interaction. *J Leukoc Biol.* Nov 1994;56(5):583-587.
363. Celi A, Pellegrini G, Lorenzet R, et al. P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 13 1994;91(19):8767-8771.
364. Lindmark E, Tenno T, Siegbahn A. Role of platelet P-selectin and CD40 ligand in the induction of monocytic tissue factor expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Oct 2000;20(10):2322-2328.

365. Faraday N, Scharpf RB, Dodd-o JM, et al. Leukocytes can enhance platelet-mediated aggregation and thromboxane release via interaction of P-selectin glycoprotein ligand 1 with P-selectin. *Anesthesiology*. Jan 2001;94(1):145-151.
366. Nash GB. Adhesion between neutrophils and platelets: a modulator of thrombotic and inflammatory events? *Thromb Res*. 1994;74 Suppl 1:S3-11.
367. Faint RW. Platelet-neutrophil interactions: their significance. *Blood Rev*. Jun 1992;6(2):83-91.
368. Mach F, Schonbeck U, Bonnefoy JY, et al. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation*. Jul 15 1997;96(2):396-399.
369. Wada H, Wakita Y, Shiku H. Tissue factor expression in endothelial cells in health and disease. *Blood Coagul Fibrinolysis*. Jun 1995;6 Suppl 1:S26-31.
370. Andre P, Hartwell D, Hrachovinova I, et al. Pro-coagulant state resulting from high levels of soluble P-selectin in blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 5 2000;97(25):13835-13840.
371. Satta N, Toti F, Feugeas O, et al. Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J Immunol*. Oct 1 1994;153(7):3245-3255.
372. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, et al. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 2 1999;96(5):2311-2315.
373. Rauch U, Bonderman D, Bohrmann B, et al. Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. *Blood*. Jul 1 2000;96(1):170-175.
374. Osterud B, Rapaport SI. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 1977;74(12):5260-5264.
375. Monkovic DD, Tracy PB. Activation of human factor V by factor Xa and thrombin. *Biochemistry*. Feb 6 1990;29(5):1118-1128.
376. Gailani D, Broze GJ, Jr. Factor XI activation by thrombin and factor XIa. *Semin Thromb Hemost*. 1993;19(4):396-404.
377. Hoffman M, Monroe DM, 3rd. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*. Jun 2001;85(6):958-965.
378. Conde ID, Kleiman NS. Arterial thrombosis for the interventional cardiologist: from adhesion molecules and coagulation factors to clinical therapeutics. *Catheter Cardiovasc Interv*. Oct 2003;60(2):236-246.
379. Weitz JI. Low-molecular-weight heparins. *N Engl J Med*. Sep 4 1997;337(10):688-698.
380. Sandset PM, Bendz B, Hansen JB. Physiological function of tissue factor pathway inhibitor and interaction with heparins. *Haemostasis*. 2000;30 Suppl 2:48-56.
381. Camire RM, Kalafatis M, Cushman M, et al. The mechanism of inactivation of human platelet factor Va from normal and activated protein C-resistant individuals. *J Biol Chem*. Sep 1 1995;270(35):20794-20800.
382. Dercksen MW, Weimar IS, Richel DJ, et al. The value of flow cytometric analysis of platelet glycoprotein expression of CD34+ cells measured under conditions that prevent P-selectin-mediated binding of platelets. *Blood*. Nov 15 1995;86(10):3771-3782.
383. Frenette PS, Mayadas TN, Rayburn H, et al. Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins. *Cell*. Feb 23 1996;84(4):563-574.

384. Frenette PS, Subbarao S, Mazo IB, et al. Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 24 1998;95(24):14423-14428.
385. Greenberg AW, Kerr WG, Hammer DA. Relationship between selectin-mediated rolling of hematopoietic stem and progenitor cells and progression in hematopoietic development. *Blood*. Jan 15 2000;95(2):478-486.
386. Janowska-Wieczorek A, Majka M, Kijowski J, et al. Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood*. Nov 15 2001;98(10):3143-3149.
387. Langer HF, May AE, Vestweber D, et al. Platelet-induced differentiation of endothelial progenitor cells. *Semin Thromb Hemost*. Mar 2007;33(2):136-143.
388. Stellos K, Gawaz M. Platelet interaction with progenitor cells: potential implications for regenerative medicine. *Thromb Haemost*. Nov 2007;98(5):922-929.
389. Wagner DD, Burger PC. Platelets in inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Dec 2003;23(12):2131-2137.
390. Diacovo TG, Puri KD, Warnock RA, et al. Platelet-mediated lymphocyte delivery to high endothelial venules. *Science*. Jul 12 1996;273(5272):252-255.
391. Peled A, Grabovsky V, Habler L, et al. The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow. *J Clin Invest*. Nov 1999;104(9):1199-1211.
392. Schober A, Knarren S, Lietz M, et al. Crucial role of stromal cell-derived factor-1alpha in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. Nov 18 2003;108(20):2491-2497.
393. Zernecke A, Schober A, Bot I, et al. SDF-1alpha/CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells. *Circ Res*. Apr 15 2005;96(7):784-791.
394. Abi-Younes S, Sauty A, Mach F, et al. The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques. *Circ Res*. Feb 4 2000;86(2):131-138.
395. Nuhrenberg TG, Voisard R, Fahlisch F, et al. Rapamycin attenuates vascular wall inflammation and progenitor cell promoters after angioplasty. *Faseb J*. Feb 2005;19(2):246-248.
396. Schatteman GC, Awad O. Hemangioblasts, angioblasts, and adult endothelial cell progenitors. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. Jan 2004;276(1):13-21.
397. Balbarini A, Barsotti MC, Di Stefano R, et al. Circulating endothelial progenitor cells characterization, function and relationship with cardiovascular risk factors. *Curr Pharm Des*. 2007;13(16):1699-1713.
398. Guven H, Shepherd RM, Bach RG, et al. The number of endothelial progenitor cell colonies in the blood is increased in patients with angiographically significant coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. Oct 17 2006;48(8):1579-1587.
399. Zhang Y, Ingram DA, Murphy MP, et al. Release of Pro-Inflammatory Mediators and Expression of Pro-Inflammatory Adhesion Molecules by Endothelial Progenitor Cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Feb 27 2009.
400. Cho HJ, Lee N, Lee JY, et al. Role of host tissues for sustained humoral effects after endothelial progenitor cell transplantation into the ischemic heart. *J Exp Med*. Dec 24 2007;204(13):3257-3269.

401. Zou MH, Cohen R, Ullrich V. Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Endothelium*. Mar-Apr 2004;11(2):89-97.
402. Caughey GE, Cleland LG, Penglis PS, et al. Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2. *J Immunol*. Sep 1 2001;167(5):2831-2838.
403. Fish JE, Marsden PA. Endothelial nitric oxide synthase: insight into cell-specific gene regulation in the vascular endothelium. *Cell Mol Life Sci*. Jan 2006;63(2):144-162.
404. Armstrong RA. Platelet prostanoid receptors. *Pharmacol Ther*. 1996;72(3):171-191.
405. Muscari C, Gamberini C, Carboni M, et al. Different expression of NOS isoforms in early endothelial progenitor cells derived from peripheral and cord blood. *J Cell Biochem*. Nov 1 2007;102(4):992-1001.
406. Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med*. Dec 13 2007;357(24):2482-2494.
407. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest*. Dec 2005;115(12):3378-3384.
408. Caron A, Theoret JF, Mousa SA, et al. Anti-platelet effects of GPIIb/IIIa and P-selectin antagonism, platelet activation, and binding to neutrophils. *J Cardiovasc Pharmacol*. Aug 2002;40(2):296-306.
409. Theoret JF, Bienvenu JG, Kumar A, et al. P-selectin antagonism with recombinant p-selectin glycoprotein ligand-1 (rPSGL-Ig) inhibits circulating activated platelet binding to neutrophils induced by damaged arterial surfaces. *J Pharmacol Exp Ther*. Aug 2001;298(2):658-664.
410. Konstantinides S, Schafer K, Thinner T, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 and its cofactor vitronectin stabilize arterial thrombi after vascular injury in mice. *Circulation*. Jan 30 2001;103(4):576-583.
411. Jang Y, Lincoff AM, Plow EF, et al. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. Dec 1994;24(7):1591-1601.
412. Rinder CS, Bonan JL, Rinder HM, et al. Cardiopulmonary bypass induces leukocyte-platelet adhesion. *Blood*. Mar 1 1992;79(5):1201-1205.

Publications

Liste des publications 2005-2009

- 1- **H Abou-Saleh**, JF Théorêt, D Yacoub, Y Merhi. Neutrophil P-selectin-glycoprotein-ligand-1 binding to platelet P-selectin enhances metalloproteinase2 secretion and platelet-neutrophil aggregation. *Thromb Haemost.* 2005; 94 (6):1230-5.

- 2- D Yacoub, JF Théorêt, L Villeneuve, **H Abou-Saleh**, Mourad W, BG Allen, Y Merhi. Essential role of PKC delta in platelet signalling, $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation and thromboxane A2 release. *J Biol Chem.* 2006; 281 (40): 30024-25.

3. **H Abou-Saleh**, D Yacoub, JF Théorêt, PE Neagoe, B Labarthe, P Thérroux, MG Sirois, M Tabrizian, E Thorin, Y Merhi. Endothelial Progenitor Cells Bind and Inhibit Platelet Function and Thrombus Formation. *Submitted to Journal of Thrombosis and Haemostasis.*

4. **Haissam Abou-Saleh**, Daniel Yacoub, Jean-François Théorêt, Marc-Antoine Gillis, Maryam Tabrizian, Yahye Merhi. Essential role of P-selectin in Endothelial Progenitor Cells-Induced Inhibition of Platelet Aggregation and Thrombus Formation. *Under preparation for submission to Circulation Journal.*

5. Théorêt Jean-François, Yacoub Daniel, Hachem Ahmed, Gillis Marc-Antoine, **Abou-Saleh Haissam**, Merhi Yahye. P-selectin signalling accelerates thrombotic reactions via enhanced microaggregate formation. *Under preparation for submission to Cell Journal.*