

Université de Montréal

Rôle de l'axe CD40L/CD40 dans les cellules endothéliales progénitrices

Par:

Lara Bou Khzam

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**

Août 2012

©Lara Bou Khzam, 2012

**Université de Montréal
Faculté de médecine**

**Cette thèse intitulée :
Rôle de l'axe CD40L/CD40 dans les cellules endothéliales progénitrices**

**Présentée par :
Lara Bou Khzam**

a été évaluée par :

**Dre Lucie Parent.....Président rapporteur
Dr Yahye Merhi.....Directeur de recherche
Dr Éric Rhéaume.....Membre du Jury
Dr Jean Sévigny.....Examineur externe
Dr Bruce Allen.....Représentant du doyen**

Résumé

Les cellules endothéliales progénitrices («*Endothelial Progenitor Cells*», EPCs) sont des précurseurs endothéliaux qui possèdent un potentiel considérable dans la réparation et la régénération vasculaire. Dans le contexte des maladies cardiovasculaires, la compréhension du rôle des EPCs dans la régulation de la thrombogenèse et la réparation endothéliale est pertinente et nécessaire pour comprendre leur potentiel thérapeutique.

Nous avons rapporté que les EPCs interagissent avec les plaquettes via la P-sélectine et inhibent l'adhésion, l'activation et l'agrégation des plaquettes ainsi que la formation de thrombus. Plus récemment, nous avons démontré que les EPCs expriment le récepteur inflammatoire CD40 et il est bien connu que les plaquettes constituent la source principale de la forme soluble de son agoniste le CD40L («*soluble CD40 Ligand*», sCD40L). Ainsi, nous avons émis l'hypothèse principale que l'axe CD40L/CD40 dans les EPCs influence leurs fonctions anti-thrombotique et pro-angiogénique.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réussi à générer des «*early*» et «*late*» EPCs à partir de cellules mononucléaires du sang périphérique («*Peripheral Blood Mononuclear Cells*», PBMCs) en culture. Nous avons mis en évidence l'existence de l'axe CD40L/CD40 dans ces EPCs en démontrant l'expression des protéines adaptatrices, nommées les facteurs associés au récepteur du facteur de nécrose tumorale («*TNF Receptor Associated Factors*», TRAFs). Dans une première étude, nous avons investigué l'effet du sCD40L sur la fonction des «*early*» EPCs dans l'agrégation plaquettaire. En effet, nous avons démontré que le sCD40L renverse leur effet inhibiteur sur l'agrégation plaquettaire, et ce sans avoir un effet significatif sur la sécrétion de prostacycline (PGI₂) et d'oxyde nitrique («*Nitric Oxide*», NO) par ces cellules. De plus, aucun effet du sCD40L n'a été noté sur l'apoptose et la viabilité de ces cellules. Par contre, nous avons noté une augmentation importante du stress oxydatif dans les «*early*» EPCs suite à leur stimulation avec le sCD40L. L'inhibition du stress oxydatif renverse l'effet du sCD40L sur les «*early*» EPCs dans l'agrégation plaquettaire. Ces résultats pourraient expliquer, en partie, la fonction réduite des EPCs chez les individus présentant des niveaux élevés de sCD40L en circulation.

Dans une deuxième étude, nous avons étudié l'effet de sCD40L dans la fonction des «*early*» EPCs en relation avec l'angiogenèse. Nous avons identifié, dans un premier temps,

les métalloprotéinases de la matrice («*Matrix Metalloproteinases*», MMPs) qui sont sécrétées par ces cellules. Nous avons trouvé que les «*early*» EPCs relâchent principalement la MMP-9 et que cette relâche est augmentée par le sCD40L. Le sCD40L induit aussi la phosphorylation de la p38 MAPK qui contribue à augmenter la sécrétion de MMP-9. Des études fonctionnelles ont démontré que le prétraitement des «*early*» EPCs au sCD40L potentialise la réparation endothéliale des HUVECs.

En conclusion, l'ensemble de nos travaux, dans le cadre de ce projet de doctorat, nous a permis d'élucider les mécanismes responsables de l'action du sCD40L sur les effets inhibiteur et angiogénique des «*early*» EPCs dans l'agrégation plaquettaire et l'angiogenèse, respectivement. Ces résultats ajoutent de nouvelles connaissances sur le rôle des EPCs et pourront constituer la base pour des études futures permettant de corrélérer les niveaux élevés du sCD40L circulant et l'incidence des maladies cardiovasculaires, particulièrement l'athérombose.

Mots clés : Cellules endothéliales progénitrices, plaquettes, CD40L, TRAF, MMP, thrombose, angiogenèse

Abstract

Endothelial progenitor cells (EPCs) are endothelial precursors which possess a considerable therapeutic potential in vascular repair and regeneration. In the context of cardiovascular diseases, the understanding of the role of EPCs in the regulation of thrombogenesis and endothelial repair is relevant and necessary to the understanding of their therapeutic potential.

We have shown that EPCs interact with platelets via P-selectin and inhibit the adhesion, activation and aggregation of platelets as well as thrombus formation. Recently, we have shown that EPCs express the inflammatory receptor CD40 and it is well known that platelets are the main source of the soluble form of its agonist CD40L (*«soluble CD40 ligand»*, sCD40L). Hence, we have hypothesized that the CD40L/CD40 axis in EPCs influences the anti-thrombotic and pro-angiogenic functions of EPCs.

To verify this hypothesis, we have successfully generated early and late EPCs from peripheral blood mononuclear cells in culture. We have demonstrated the existence of the CD40L/CD40 axis in EPCs by showing the expression of adaptor proteins, named tumor necrosis factor associated factors (TRAFs). In our first study, we investigated the effect of sCD40L on the function of early EPCs in platelet aggregation. Indeed, we have shown that sCD40L reverses their inhibitory effect on platelet aggregation without having an effect on prostacyclin (PGI₂) and nitric oxide (NO) secretion by these cells. Moreover, no effect of sCD40L has been noted on the apoptosis and viability of these cells. However, we have shown a significant increase in oxidative stress in early EPCs following sCD40L stimulation. The inhibition of oxidative stress reverses the effect of sCD40L on early EPCs in platelet aggregation. These results could partially explain the decreased function of EPCs in individuals displaying higher levels of sCD40L in circulation.

In our second study, we have studied the effect of sCD40L on the function of early EPCs in relation to angiogenesis. First, we have identified the matrix metalloproteinases (MMPs) which are secreted by these cells. We have found that early EPCs mainly release MMP-9 and that this release is increased by sCD40L. The sCD40L also induces the phosphorylation of p38 MAPK which contributes to increase the secretion of MMP-9. In

functional studies, we have shown that pretreatment of early EPCs with sCD40L can potentialize HUVEC endothelial repair.

In conclusion, our work in the context of this doctoral research project has allowed us to study the mechanisms involved in the role of sCD40L in the inhibitory and angiogenic function of early EPCs in platelet aggregation and angiogenesis, respectively. These results add new insights to the role of EPCs and could constitute the basis for future studies allowing for the correlation between high levels of sCD40L and the incidence of cardiovascular disease, particularly atherothrombosis.

Key words: Endothelial progenitor cells, platelets, CD40L, TRAF, MMP, thrombosis, angiogenesis

Table des matières

Identification du Jury.....	ii
Résumé.....	iii-iv
Abstract.....	v-vi
Table des matières.....	vii-x
Liste des figures.....	xi-xiii
Liste des tableaux.....	xiv
Liste des abréviations.....	xv-xx
Remerciements.....	xi
Chapitre 1 : Les cellules endothéliales progénitrices.....	1-44
1.1 Introduction.....	2
1.2 La vasculogénèse et l'angiogénèse	2-3
1.3 L'hématopoïèse et la moelle osseuse.....	3-5
1.4 La vasculogénèse chez l'adulte : une nouvelle théorie.....	5-6
1.5 Les types de cellules souches et progénitrices.....	6-7
1.6 L'origine et la nature des EPCs.....	8-11
1.7 Les méthodes d'isolation et de culture des EPCs dérivées du sang périphérique humain.....	12-13
1.8 Les sous-types d'EPCs : précoces ou « <i>early</i> » et tardives ou « <i>late</i> »	14-16
1.9 La biologie des EPCs.....	17-23
1.9.1 La mobilisation et le recrutement.....	17-19
1.9.2 La domiciliation et l'adhésion.....	19-21
1.9.3 L'invasion et la migration.....	21
1.9.4 La différenciation et la prolifération.....	21-22
1.9.5 Régulation de la fonction des EPCs.....	22-23
1.10 Les EPCs : biomarqueurs des risques cardiovasculaires.....	23-28
1.10.1 Le diabète.....	24
1.10.2 L'hypertension	25
1.10.3 L'hyperlipidémie.....	25
1.10.4 Le tabagisme.....	26
1.10.5 La sédentarité.....	26
1.10.6 Le vieillissement.....	27

1.10.7 Le stress oxydatif.....	27-28
1.10.8 Autres facteurs.....	28
1.11 Le rôle des EPCs dans les maladies cardiovasculaires.....	28-37
1.11.1 La réparation endothéliale.....	29
1.11.2 La néovascularisation.....	29-30
1.11.3 L'inflammation.....	31-32
1.11.4 La thrombose.....	32
1.11.5 La resténose.....	32-33
1.11.6 L'athérosclérose	33-34
1.11.7 L'infarctus du myocarde.....	34-35
1.11.8 L'insuffisance cardiaque.....	35-36
1.12 Les effets des facteurs physiologiques et pathologiques sur les EPCs..	36-40
1.13 Les EPCs et la médecine régénérative.....	41-45
1.13.1 La thérapie cellulaire.....	41-42
1.13.2 Les études cliniques.....	42-43
1.13.3 Les limitations.....	44
Chapitre 2 : Les plaquettes.....	45-68
2.1 Introduction.....	46
2.2 L'origine des plaquettes et que sont-elles?.....	46-49
2.3 L'activité plaquettaire.....	49-63
2.3.1 L'adhésion plaquettaire.....	49-57
2.3.2 L'activation plaquettaire.....	57-58
2.3.3 La sécrétion plaquettaire.....	58-60
2.3.4 L'agrégation plaquettaire.....	60-63
2.4 L'implication des plaquettes dans la thrombose	65-70
2.4.1 Les interactions des plaquettes avec les cellules sanguines.....	63-66
2.4.2 La formation de thrombus.....	67-68
Chapitre 3 : Les interactions EPC-plaquettes.....	69-77
3.1 Le rôle des plaquettes dans la fonction des EPCs.....	70-74
3.2 Le rôle des interactions EPC-plaquettes dans les processus et les maladies vasculaires.....	74-77

Chapitre 4 : L'axe CD40L/CD40.....	78-104
4.1 Introduction.....	79-86
4.1.1 L'axe CD40L/CD40.....	79-80
4.1.2 La structure de CD40L.....	80-81
4.1.3 La structure du CD40.....	81-82
4.1.4 L'interaction du CD40L avec son récepteur CD40.....	82-84
4.1.5 Les récepteurs du CD40L.....	84-86
4.2 La voie de signalisation intracellulaire de l'axe CD40L/CD40.....	87-95
4.2.1 Le complexe CD40L/CD40/TRAF et les mécanismes intracellulaires.....	87
4.2.2 La structure des TRAFs.....	88-89
4.2.3 Les membres de la famille des TRAFs et leurs fonctions.....	89-95
4.2.3.1 TRAF1.....	90
4.2.3.2 TRAF2.....	90-92
4.2.3.3 TRAF3.....	92
4.2.3.4 TRAF4.....	92-93
4.2.3.5 TRAF5.....	93
4.2.3.6 TRAF6.....	93-94
4.2.3.7 JAK3.....	94-95
4.3 L'axe CD40L/CD40 dans les fonctions cellulaires.....	95-97
4.3.1 Les plaquettes.....	95-96
4.3.2 Les cellules endothéliales.....	96
4.3.3 Les EPCs.....	97
4.4 Le rôle physiologique de l'axe CD40L/CD40.....	97-98
4.5 L'axe CD40L/CD40 dans la formation pathophysiologique de la plaque athéromateuse.....	98-99
4.5.1 L'initiation, la progression, la stabilisation du thrombus et la thrombose.....	99-102
4.6 Le CD40L et son implication clinique.....	102-104
4.6.1 Le CD40L soluble : un indicateur de risque cardiovasculaire.....	102
4.6.2 Les études cliniques et la thérapie.....	102-104
Chapitre 5 : Projet de recherche.....	105-107
5.1 Problématique.....	106
5.2 Objectifs et hypothèses.....	106
5.3 Signification du projet.....	107

Chapitre 6 : Contribution scientifique.....	108-155
Article #1: Soluble CD40 ligand impairs the anti-platelet function of peripheral blood early outgrowth cells via increased production of reactive oxygen species.....	109-134
Article #2: Soluble CD40 Ligand stimulates the pro-angiogenic function of early outgrowth cells by increasing matrix metalloproteinase 9 release via the p38 mitogen activated protein kinase pathway...	135-155
Chapitre 7 : Résultats supplémentaires.....	156-160
Discussion.....	161-172
Conclusions et directions futures.....	173-176
Bibliographie.....	177-215
Publications et présentations.....	216-219
Liste des publications.....	217
Liste des présentations.....	218-219

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1.1 : Le développement vasculaire chez l'adulte.....	6
Figure 1.2 : Méthodes utilisées dans la culture cellulaire des EPCs.....	13
Figure 1.3 : La mobilisation et le recrutement des EPCs de la moelle osseuse.....	19
Figure 1.4: Modèle schématique de l'interaction entre les « <i>early</i> » et les « <i>late</i> » EPCs.....	30

Chapitre 2

Figure 2.1 : Les étapes de l'adhésion des plaquettes sur l'endothélium activé et les récepteurs impliqués.....	54
Figure 2.2 : Les étapes de l'adhésion des plaquettes sur la matrice sous-endothéliale exposée lors de la formation de thrombus au site de lésion vasculaire.....	56
Figure 2.3: Les récepteurs plaquettaires ciblés dans la thérapie.....	63
Figure 2.4 : Mécanisme de recrutement et de transmigration des leucocytes à travers une surface de plaquettes immobilisées aux sites de lésion vasculaire.....	64
Figure 2.5 : Les récepteurs impliqués dans l'adhésion des plaquettes aux leucocytes.....	65
Figure 2.6 : L'activation des cellules endothéliales par les plaquettes.....	66
Figure 2.7 : Les étapes de la formation d'un thrombus.....	68

Chapitre 3

Figure 3.1 : Rôle des plaquettes dans le recrutement des cellules progénitrices.....	72
Figure 3.2 : L'interaction des plaquettes avec les cellules progénitrices dans la régénération vasculaire.....	76

Figure 3.3 : L'interaction des plaquettes avec les cellules progénitrices dans l'endommagement vasculaire et le développement de la plaque athérosclérotique.....	77
---	----

Chapitre 4

Figure 4.1 : Structure des gènes et des protéines CD40 et CD40L (CD154) humains.....	82
Figure 4.2: Signalisation intracellulaire du récepteur CD40.....	83
Figure 4.3 : Rôle des TRAFs dans la signalisation de l'axe CD40L/CD40 et les mécanismes intracellulaires qui sont engendrés.....	87

Chapitre 6

Article # 1 Soluble CD40 ligand impairs the anti-platelet function of peripheral blood early outgrowth cells via increased production of reactive oxygen species

Figure 1: Caractérisation des EOCs dérivées des PBMCs.....	130
Figure 2 : Effet des EOCs sur l'agrégation plaquettaire.....	131
Figure 3 : Le sCD40L n'affecte pas la relâche de PGI ₂ et du NO ni l'apoptose des EOCs.....	132
Figure 4 : Effet du sCD40L sur les ROS intracellulaires dans les EOCs.....	133
Figure 5 : Effet des ROS sur l'agrégation plaquettaire dans les EOCs traitées avec le sCD40L.....	134

Article # 2 Soluble CD40 Ligand stimulates the pro-angiogenic function of early outgrowth cells by increasing matrix metalloproteinase 9 release via the p38 mitogen activated protein kinase pathway

Figure 1: L'effet du sCD40L sur la relâche de MMP-9 par les EOCs.....	152
Figure 2 : L'effet du sCD40L sur la phosphorylation de p38 MAPK dans les EOCs.....	153
Figure 3 : L'implication de la voie signalétique de la p38 MAPK dans la relâche de MMP-9 induite par le sCD40L dans les EOCs.....	154

Figure 4 : L'effet du sCD40L et de MMP-9 sur le rôle angiogénique des EOCs dans la réparation endothéliale.....	155
---	-----

Chapitre 7

Figure 7.1: Caractérisation comparative des « <i>early</i> » et « <i>late</i> » EPCs.....	157
Figure 7.2 : Expression de CD40 et des TRAFs dans les EPCs dérivées des PBMCs.....	158
Figure 7.3 : Effet du sCD40L sur les TRAFs dans les « <i>early</i> » EPCs.....	160

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1.1 : Marqueurs de surface cellulaire dans la caractérisation des EPCs.....	11
Tableau 1.2 : Caractéristiques cellulaires des « <i>early</i> » et « <i>late</i> » EPCs et ECs matures.....	16
Tableau 1.3 : Effets des facteurs physiologiques et pathologiques sur les EPCs.....	36-40

Chapitre 2

Tableau 2.1 : Médiateurs plaquettaires bioactifs dans l'athérombose....	59-60
---	-------

Chapitre 4

Tableau 4.1 : Expression de CD40 et CD40L dans les différents types cellulaires.....	80
Tableau 4.2 : Approches thérapeutiques utilisées pour cibler l'axe CD40L/CD40.....	104

Chapitre 7

Tableau 7.1 : Caractéristiques des « <i>early</i> » et des « <i>late</i> » EPCs.....	159
--	-----

Abréviations

ACE	Enzyme de Conversion de l'Angiotensine (« <i>Angiotensin-Converting Enzyme</i> »)
Ac-LDL	Lipoprotéines de faible densité Acétylées (« <i>Acetylated Low Density Lipoprotein</i> »)
Ang-1	Angiopoïétine-1 (« <i>Angiopoietin-1</i> »)
APC	Cellule Présentatrice d'Antigène (« <i>Antigen-Presenting Cell</i> »)
ARB	Bloqueur des Récepteurs de l'Angiotensine (« <i>Angiotensin Receptor Blocker</i> »)
ATRA	Antagonistes des Récepteurs de l'Angiotensine (« <i>Angiotensin Receptor Antagonists</i> »)
CAC	Cellule Angiogénique Circulante (« <i>Circulating Angiogenic Cell</i> »)
CEC	Cellule Endothéliale Circulante (« <i>Circulating Endothelial Cell</i> »)
CFU-EC	Unités de Formation de Colonies des Cellules Endothéliales (« <i>Colony-Forming Unit Endothelial Cell</i> »)
cIAP	Protéine Inhibitrice de l'Apoptose cellulaire (« <i>cellular Inhibitor of Apoptosis Protein</i> »)
CRP	Protéine Réactive C (« <i>C Reactive Protein</i> »)
DAG	DiAcylGlycérol (« <i>DiAcylGlycerol</i> »)
ECFC	Cellule de Formation de Colonies Endothéliales (« <i>Endothelial Colony Forming Cell</i> »)
EGF	Facteur de croissance Épithélial (« <i>Epithelial Growth Factor</i> »)
eNOS	Oxyde Nitrique Synthétase endothéliale (« <i>endothelial Nitric Oxide Synthase</i> »)

EOC	Cellule endothéliale progénitrice précoce (« <i>Early Outgrowth Cell</i> »)
EPC	Cellule Endothéliale Progénitrice (« <i>Endothelial Progenitor Cell</i> »)
ERK	Protéine kinase régulatrice extracellulaire (« <i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i> »)
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes (« <i>Fibroblast Growth Factor</i> »)
G-CSF	Facteur de Stimulation de Colonie de Granulocytes (« <i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i> »)
HGF	Facteur de croissance des hépatocytes (« <i>Hepatocyte Growth Factor</i> »)
HIF-1 α	Facteur-1 α induit par l'hypoxie (« <i>Hypoxia-inducible factor-1α</i> »)
HPC	Cellule Progénitrice Hématopoïétique (« <i>Hematopoeitic Progenitor Cell</i> »)
HSC	Cellule Souche Hématopoïétique (« <i>Hematopoeitic Stem Cell</i> »)
ICAM-1	Molécule-1 d'adhésion intercellulaire (« <i>InterCellular Adhesion Molecule-1</i> »)
ICAM-2	Molécule-2 d'adhésion intercellulaire (« <i>InterCellular Adhesion Molecule-2</i> »)
IL-1 β	Interleukine-1 β (« <i>Interleukin-1β</i> »)
IL-6	Interleukine-6 (« <i>Interleukin-6</i> »)
IL-10	Interleukine-10 (« <i>Interleukin-10</i> »)
IL-12	Interleukine-12 (« <i>Interleukin-12</i> »)

IL-8	Interleukine-8 (« <i>Interleukin-8</i> »)
iNOS	Oxyde Nitrique endothéliale inductible (« <i>inducible Nitric Oxide Synthase</i> »)
IP ₃	Inositol 1,4,5-triphosphate (« <i>Inositol 1,4,5-triphosphate</i> »)
JAM-3	Molécule-3 d'adhésion de jonction (« <i>Junctional Adhesion Molecule-3</i> »)
JAM-C	Molécule-C d'adhésion de jonction (« <i>Junctional Adhesion Molecule-C</i> »)
JNK	Protéine kinase N-terminal c-Jun (« <i>c-Jun N-terminal kinase</i> »)
LFA-1	Antigène associé à la fonction des lymphocytes (« <i>Lymphocyte Function-associated Antigen</i> »)
LTβ-R	Récepteur de la lymphotoxine-β (« <i>Lymphotoxin-β Receptor</i> »)
MAPK	Protéine kinase activatrice du mitogène (« <i>Mitogen Activating Protein Kinase</i> »)
MCP-1	Protéine-1 chimiotactique des monocytes (« <i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i> »)
MHC	Complexe majeur d'histocompatibilité (« <i>Major Histocompatibility Complex</i> »)
MIP-1α	Protéine-1α inflammatoire des macrophages (« <i>Macrophage Inflammatory Protein-1α</i> »)
MIP-1β	Protéine-1β inflammatoire des macrophages (« <i>Macrophage Inflammatory Protein-1β</i> »)
miR	Court acide ribonucléique (« <i>micro Ribonucleic Acid</i> »)
MMP	Métalloprotéinase dégradante de la matrice (« <i>Matrix MetalloProteinase</i> »)

MnSOD	Manganèse superoxyde dismutase (« <i>Manganese Superoxide Dismutase</i> »)
MSC	Cellule souche mésenchymateuse (« <i>Mesenchymal Stem Cell</i> »)
NIK	Protéine kinase inductrice de NF-κB (« <i>NF-κB Inducing Kinase</i> »)
NF-κB	Facteur nucléaire-κB (« <i>Nuclear Factor-κB</i> »)
NT-proBNP	Peptide natriurétique N-terminal de type B (« <i>N-Terminal pro-Brain-type Natriuretic Peptide</i> »)
OMS	Organisation Mondiale de la Santé (« <i>World Health Organization</i> »)
oxLDL	Lipoprotéines de faible densité oxydées (« <i>oxidized Low Density Lipoprotein</i> »)
PAF	Facteur activateur des plaquettes (« <i>Platelet Activating Factor</i> »)
PAR	Récepteur activé par les protéases (« <i>Protease-Activated Receptor</i> »)
PBMC	Cellules mononucléaires de sang périphérique humain (« <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> »)
PCI	Intervention coronarienne percutanée (« <i>Percutaneous Coronary Intervention</i> »)
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes (« <i>Platelet-Derived Growth Factor</i> »)
PF4	Facteur 4 des plaquettes (« <i>Platelet Factor 4</i> »)
PGI ₂	Prostacycline (« <i>Prostacyclin</i> »)
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase (« <i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i> »)

PLC	Phospholipase C (« <i>Phospholipase C</i> »)
PSGL-1	Ligand-1 glycoprotéique de la P-sélectine (« <i>P-Selectin Glycoprotein Ligand-1</i> »)
RANTES	Facteur régulé dans l'activation des cellules T normales exprimées et sécrétées (« <i>Regulated upon Activation and Normal T cell Expressed and Secreted</i> »)
RNS	Espèces réactives de l'azote (« <i>Reactive Nitrogen Species</i> »)
ROS	Espèces réactives de l'oxygène (« <i>Reactive Oxygen Species</i> »)
sCD40L	CD40L soluble (« <i>soluble CD40 Ligand</i> »)
SCF/c-kit	Facteur des cellules souches (« <i>Stem Cell Factor</i> »)
SDF-1 α	Facteur-1 α dérivé des cellules stromales (« <i>Stromal-Derived Factor-1α</i> »)
siRNA	Petit acide ribonucéique interférant (« <i>small interfering Ribonucleic Acid</i> »)
SMC	Cellule musculaire lisse (« <i>Smooth Muscle Cell</i> »)
SOD	Superoxyde dismutase (« <i>Superoxide Dismutase</i> »)
TF	Facteur tissulaire (« <i>Tissue Factor</i> »)
TGF- β	Facteur β de croissance de transformation (« <i>Transforming Growth Factor-β</i> »)
Tie-2	Tyrosine kinase-2 contenant les domaines des immunoglobulines et de facteur de croissance épidermique (« <i>Tyrosine Kinases that contain Ig and EGF domains-2</i> »)

TLR	Récepteur ressemblant aux Tolls (« <i>Toll-Like Receptor</i> »)
TNFR	Récepteur du TNF (« <i>TNF Receptor</i> »)
TNF- α	Facteur- α de nécrose tumorale (« <i>Tumor Necrosis Factor-α</i> »)
TRAF	Facteur associé aux récepteurs du TNF (« <i>TNF receptor-associated factor</i> »)
TXA ₂	Thromboxane A ₂ (« <i>Thromboxane A₂</i> »)
VCAM-1	Molécule-1 d'adhésion de cellule vasculaire (« <i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i> »)
VEGF	Facteur de croissance vasculaire endothélial (« <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> »)
VEGFR-1	Récepteur 1 du facteur de croissance vasculaire endothélial (« <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1</i> »)
VEGFR-2	Récepteur 2 du facteur de croissance vasculaire endothélial (« <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2</i> »)
vWF	Facteur von Willebrand (« <i>von Willebrand factor</i> »)

Remerciements

Je voudrais particulièrement remercier Dr Yahye Merhi, mon directeur de recherche, pour son support et son encadrement continu. Merci Dr Merhi pour tous les conseils, les remarques et les critiques scientifiques que tu m'as offert au cours de mes années de doctorat. J'ai beaucoup appris auprès de toi durant ma formation à ton laboratoire. Ton professionnalisme et ta passion pour la recherche seront toujours une inspiration pour moi dans ma carrière et ma vie future.

Mes remerciements vont également à mes collègues de laboratoire. Dr Haitham Abou-Saleh, Dr Daniel Yacoub, Dr Jean-François Théorêt, Dr Ahmed Hachem, M. Younes Zaïd, M. Firas Dandachi et Mme Rahma Boulahya Mrad, avec qui j'ai eu la chance de travailler et développer ma formation de chercheuse au laboratoire de thrombose et hémostase. Leur assistance et leurs conseils m'ont permis de mener à bout mes études de doctorat.

Je souhaite offrir un merci particulier à ma famille qui m'a supporté tout au long de ma formation de doctorat. Leur encouragement continu m'a permis de réussir mes projets et mes réalisations. Merci à vous tous!

Finalement, je voudrais remercier le personnel de recherche à 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'ils (elles) m'ont apporté dans la réalisation de ce projet.

À vous tous et toutes, un grand Merci!

Chapitre 1

Les cellules endothéliales progénitrices

1.1. Introduction

Les maladies cardiovasculaires constituent actuellement la première cause de décès dans le monde.¹ Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), plus de 17 millions de décès ont été rapportés dans le monde en 2008 dus aux maladies cardiovasculaires; et, ce nombre continue d'accroître. L'OMS estime qu'en 2030 ce nombre atteindra plus de 23 millions.¹ La mortalité due aux maladies cardiovasculaires est surtout notée chez les individus âgés de plus de 65 ans.^{2,3} Il semblerait que les femmes et les hommes sont également touchés; par contre, on observe plus de décès chez les femmes.⁴

Le système vasculaire est un système essentiel à l'organisme représentant le moyen fondamental nécessaire à la livraison des éléments nutritifs contenus dans le sang, principalement l'oxygène, aux cellules et permettant leur croissance, leur réparation et leur survie. De plus, celui-ci permet de livrer des éléments nutritifs aux organes distaux de l'organisme. Le développement du système vasculaire débute au stade embryonnaire et il est le premier système fonctionnel qui est développé chez l'embryon. Les maladies cardiovasculaires ont incité l'intérêt de la recherche scientifique dans le développement de moyens qui permettraient la réparation et la régénération vasculaire et cardiaque. La recherche sur les types de cellules progénitrices, qui seraient potentiellement impliqués dans la génération de nouvelles cellules du système vasculaire, ont fait le sujet de maintes études. Dans cette thèse, les maladies cardiovasculaires, particulièrement l'athérosclérose et les maladies coronariennes aiguës, et le rôle des cellules progénitrices endothéliales («*Endothelial Progenitor Cells*», EPCs) dans le système vasculaire seront discutés et étudiés. Ce chapitre discutera, plus spécifiquement, la source, la nature et les types d'EPCs ainsi que l'effet de l'incidence de maladies cardiovasculaires sur la fonction de ces cellules.

1.2. La vasculogénèse et l'angiogénèse

Le développement vasculaire embryonnaire est permis par un processus nommé la vasculogénèse, caractérisé par la différenciation *in situ* des cellules endothéliales vasculaires qui serviront comme «tapis» recouvrant la surface interne des vaisseaux sanguins de l'organisme.^{5,6} Tout d'abord, un processus de gastrulation est responsable de la formation du mésoderme, puis une sous-population de cellules mésodermiques primitives, nommées les angioblastes, sont engagées à la différenciation en cellules endothéliales qui elles-mêmes forment le système

vasculaire primordial chez l'embryon. La vasculogenèse est basée sur la formation d'îlots sanguins composés de cellules souches hématopoïétiques entourées par des cellules angioblastiques en périphérie.⁷ Par la suite, îlots sanguins fusionnent pour permettre la différenciation endothéliale et la formation du plexus capillaire primaire.⁸ Une fois que ce système primitif est établi, une étape de régression de certaines parties du système artériel et vénal du système vasculaire embryonnaire est requise pour assurer le développement fonctionnel du système vasculaire sanguin embryonnaire.⁵ Un processus alternatif, nommé l'angiogenèse, est alors responsable de l'expansion du système vasculaire chez l'adulte qui origine des veinules post-capillaires, par la prolifération de cellules préexistantes, permettant la formation d'un système vasculaire complexe.^{8,9}

1.3. L'hématopoïèse et la moelle osseuse

L'hématopoïèse est un processus qui se produit tant au stade embryonnaire qu'au stade adulte et par lequel des cellules précurseurs se développent en cellules sanguines matures. Dans la vasculogenèse embryonnaire, la différenciation d'un précurseur mésodermique en hémangioblaste est nécessaire et est régulée de façon spatiale et temporelle. L'hémangioblaste a la propriété de générer les cellules souches hématopoïétiques («*Hematopoietic Stem Cells*», HSCs) et les angioblastes, tous les deux impliqués dans la formation du plexus capillaire primitif requis pour la formation des cellules endothéliales.⁷

Au stade embryonnaire précoce, l'hématopoïèse est localisée au niveau du sac vitellin puis dans le foie. Entre le 3^e et le 7^e mois du développement embryonnaire, ce processus se produit au niveau de la rate et de la cavité médullaire. Chez l'adulte, la moelle osseuse devient le milieu principal de l'hématopoïèse. La théorie monophylétique de l'hématopoïèse suggère que les cellules souches hématopoïétiques pluripotentes se divisent pour permettre à la fois le renouvellement, afin de préserver la réserve de cellules souches, et la différenciation en cellules précurseurs qui, par la suite, servent à la différenciation de cellules sanguines matures. Plus particulièrement, les HSCs CD34⁺ ont la capacité de se différencier en cellules unipotentes de plusieurs lignées cellulaires, telles que les érythrocytes, les monocytes, les lymphocytes, les thrombocytes ou plaquettes, et les granulocytes.

La moelle osseuse, aussi nommée le tissu myéloïde, est un tissu gélatineux constituant la cavité osseuse. Celui-ci est composé du tissu rouge hématopoïétique, qui sert à la formation de

cellules sanguines à partir de cellules souches et à la destruction de vieilles cellules sanguines rouges, et du tissu jaune, qui sert de réserve en gras et se trouve principalement au niveau des os longs.¹⁰ La moelle osseuse est l'organe principal de l'hématopoïèse, c'est-à-dire le processus permettant la génération des composantes cellulaires du sang, et est composée de deux systèmes : le tissu hématopoïétique et le stroma. De plus, la moelle osseuse est le seul organe où deux cellules souches peuvent non seulement coexister, mais également coopérer.¹¹ Les HSCs ont initialement été identifiées par Siminovitch *et al.* en 1963.¹² Ce groupe a démontré que ces cellules multipotentes, c'est-à-dire une cellule unique qui peut se différencier en plusieurs lignées de cellules matures, offrent une plasticité et ont la capacité de s'auto-renouveler et maintenir l'équilibre entre l'auto-renouvellement cellulaire et la différenciation. Initialement, le marqueur de surface CD34 a été associé à la caractérisation des HSCs; par contre, plus récemment, d'autres populations de la moelle osseuse ont été considérées comme étant des cellules souches qui permettraient la différenciation de plusieurs lignées cellulaires.¹¹ D'autre part, la moelle osseuse contient les cellules souches mésenchymateuses («*Mesenchymal Stem Cells*», MSCs), représentant des cellules non-hématopoïétiques du type de tissu connectif, qui constituent le stroma de la moelle osseuse.¹¹ Le stroma de la moelle osseuse contient des cellules, telles que les cellules endothéliales, les adipocytes, les cellules musculaires lisses («*Smooth Muscle Cells*», SMCs), les ostéoblastes et les fibroblastes stromales, offrant à la fois un support structurel et fonctionnel pour l'hématopoïèse par l'interaction des HSCs avec ce microenvironnement stromal.¹³ La plasticité des cellules souches de la moelle osseuse et leur propriété cardio-myogénique et vasculaire ont suscité l'intérêt de plusieurs études.^{11, 14}

La différenciation des cellules endothéliales est contrôlée par des signaux portés par des molécules de croissance. Un des plus importants facteurs de croissance impliqués dans la vasculogénèse est le facteur de croissance vasculaire endothélial («*Vascular Endothelial Growth Factor*», VEGF). La liaison de ce facteur à l'un de ces récepteurs, le récepteur 2 du VEGF (VEGFR-2), détermine la différenciation de l'hémangioblaste en cellules hématopoïétiques.¹⁵ Shalaby *et al.* ont mis en évidence l'importance du VEGF dans la formation de cellules sanguines et de vaisseaux sanguins au niveau de la vasculogénèse embryonnaire.¹⁶ Par la suite, il a été confirmé que le VEGF joue un rôle essentiel au niveau du recrutement des HSCs au microenvironnement permissif à l'hématopoïèse.^{15, 17} De plus, la liaison du VEGF au récepteur

1 du VEGF (VEGFR-1), permet la survie des HSCs chez l'adulte.¹⁸ D'ailleurs, le rôle essentiel du VEGF dans la vasculogénèse est une voie thérapeutique importante étudiée de nos jours.¹⁹

1.4. La vasculogénèse chez l'adulte : une nouvelle théorie

La formation postnatale de nouveaux vaisseaux sanguins a été postulée au début des années 1900. Entre autres, deux études ont démontré la formation des vaisseaux sanguins à partir de cultures cellulaires dérivées du sang²⁰ et de la moelle osseuse.²¹ Plus tard, l'intérêt fut porté sur la génération vasculaire postnatale dans l'utilisation des prothèses artérielles.²²⁻²⁴ Depuis la fin des années 1990, l'endothélialisation et la néovascularisation sont devenues des sujets de recherche dans la médecine régénérative. Chez l'adulte, il a longtemps été postulé que les processus permettant la revascularisation sont : l'angiogénèse, caractérisée par l'expansion vasculaire à partir des vaisseaux préexistants, et l'artériogénèse, caractérisée par une croissance collatérale des artères de grand calibre et la myogénèse vasculaire (Figure 1.1).⁹ Une étude publiée par Asahara *et al.* a démontré que l'administration du VEGF dans un modèle *in vivo* de lésion carotidienne peut promouvoir la réendothélialisation de carotides et alors atténuer l'épaississement néointimal causé par la prolifération des SMCs.²⁵ Suite à cette étude, des hypothèses ont été conçues mettant en relief l'idée de la présence des précurseurs endothéliaux en circulation suggérant donc la possibilité d'un processus de vasculogénèse chez l'adulte. Plus récemment, des études ont suggéré que la moelle osseuse adulte contient des cellules qui permettent la vasculogénèse postnatale. En 1997, Asahara *et al.* ont démontré qu'une population rare de cellules CD34⁺, circulant dans le sang périphérique, peut adhérer sur une matrice de fibronectine, se différencier en cellules endothéliales et former des nouveaux tubes vasculaires.²⁶ Ces cellules ont été caractérisées par des marqueurs de surface, CD34, VEGFR-2, CD31 et tyrosine kinase-2 contenant les domaines des immunoglobulines et de facteur de croissance épidermique («*Tyrosine kinases that contain Ig and EGF domains-2*», Tie-2). De plus, ces cellules expriment l'acide ribonucléique messager («*messenger Ribonucleic Acid*», mRNA) de l'oxyde nitrique synthétase endothéliale («*endothelial Nitric Oxide Synthase*», eNOS) et peuvent lier l'Ulex-lectine et assimiler des lipoprotéines de faible densité acétylées («*Acetylated Low Density Lipoprotein*», Ac-LDL).²⁶ Peu après, Shi *et al.* ont également démontré que des cellules souches dérivées de la moelle osseuse peuvent se différencier en cellules endothéliales *in vitro* et contribuer à la néovascularisation *in vivo* au niveau des tissus ischémiques.²⁷ C'est à partir de ces

études que le terme EPC fut utilisé pour décrire les cellules pouvant contribuer à la néovascularisation *de novo* et ainsi servir à des fins thérapeutiques dans la revascularisation adulte.^{26, 28-30} Il est maintenant bien établi que les EPCs contribuent à la néovascularisation physiologique, ainsi qu'au processus de régénération de tissus ischémiques, au remodelage vasculaire et à la croissance de tumeurs.³¹

Ces études ont mené à une panoplie de recherches qui ont pour but l'expansion *ex vivo* des cellules progénitrices en cellules endothéliales. Cette voie a largement été étudiée au cours des années 2000 à des fins thérapeutiques permettant l'exploration d'une possibilité de réendothélialisation et de néovascularisation chez l'adulte.^{29, 32-34}

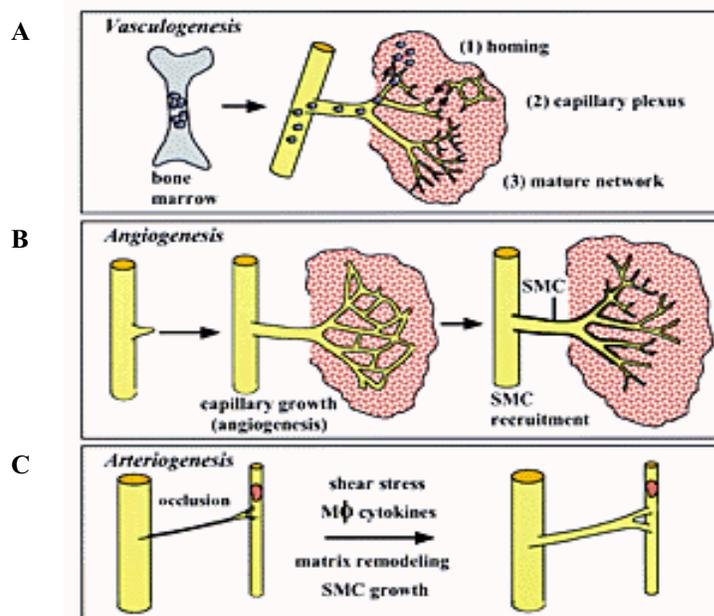


Figure 1.1 : Le développement vasculaire chez l'adulte peut se produire par trois processus : A) la vasculogénèse par la mobilisation des angioblastes à partir de la moelle osseuse; B) l'angiogénèse impliquant la formation de vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants; C) l'artériogénèse ou la croissance collatérale des artères. Légende : vasculogenesis (vasculogénèse), bone marrow (moelle osseuse), homing (domiciliation), capillary plexus (plexus capillaire), mature network (réseau mature), angiogenesis (angiogénèse), capillary growth (croissance des capillaires), SMC recruitment (recrutement des cellules musculaires lisses), occlusion (occlusion), shear stress (forces de cisaillement), matrix remodeling (remodelage de la matrice), SMC growth (croissance des cellules musculaires lisses). Carmeliet *et al.* Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 2000;6:389-395.

1.5. Les types de cellules souches et progénitrices

Au cours des plus récentes années, les avancements de la recherche vasculaire sur les cellules souches et progénitrices ayant un potentiel thérapeutique ont suscité l'intérêt de la communauté scientifique. Par contre, les controverses concernant l'identification et l'utilisation

de ces cellules demeurent un sujet de débat. Par définition, les cellules souches comportent deux caractéristiques principales : 1) l'auto-renouvellement par leur potentiel de division illimitée et 2) le potentiel de différenciation, de manière condition-dépendante, en plusieurs types cellulaires pouvant contribuer à la reconstitution *in vivo* des tissus, tels que le cœur, le foie, les reins, les neurones et les muscles.³⁵

La niche des cellules souches représente un microenvironnement qui détermine le sort de ces cellules.³⁶ Il existe quatre types de cellules souches: totipotentes, pluripotentes, multipotentes et unipotentes. Les cellules souches totipotentes, telles que les cellules de l'œuf fertilisé suite à la fécondation, sont capables de produire tous les tissus et les organes du corps. Les cellules pluripotentes, telles que les cellules souches pluripotentes induites («*induced Pluripotent Stem Cells*», iPSCs), sont des cellules capables de générer les trois feuillets embryonnaires, qui représentent la source de toutes les cellules de l'organisme : le mésoderme, l'endoderme et l'ectoderme. Les cellules spécialisées du corps dérivent de ces trois feuillets sauf les cellules souches embryonnaires. Les cellules souches multipotentes peuvent générer une lignée de cellules spécialisées à laquelle elles sont programmées, telles que les HSCs de la moelle osseuse, qui peuvent se différencier en cellules sanguines (érythrocytes, plaquettes, monocytes, granulocytes) et lymphoïdes (B, T, NK et cellules dendritiques), ou les MSCs, qui peuvent se différencier en d'autres types cellulaires, tels que le cartilage et les os.³⁷ Finalement, les cellules souches unipotentes, aussi nommées progénitrices ou précurseurs, qui se retrouvent chez l'adulte, sont capables de produire seulement un type cellulaire dont la fonction est prédéterminée, permettant la réparation d'un tissu donné, mais qui n'a pas de potentiel d'auto-renouvellement. Quelques exemples de ce type cellulaire sont les cellules souches endothéliales, neurales, hépatocytaires et pancréatiques. Il est suggéré qu'une réserve de cellules progénitrices existe au niveau du tissu.³⁸ Lorsque ces réserves quiescentes se trouvent réduites, un processus de mobilisation des cellules progénitrices à partir de la moelle osseuse se produit. Par contre, si plusieurs types cellulaires sont nécessaires à la régénération d'un tissu endommagé, ce sont les cellules souches pluripotentes qui entrent en jeu.

1.6. L'origine et la nature des EPCs

Étant donné que plusieurs maladies cardiovasculaires résultent en l'endommagement de l'endothélium et que les cellules endothéliales matures sont différenciées d'une façon terminale, l'intérêt de trouver une nouvelle source de cellules ayant un potentiel de différenciation est essentiel du point de vue thérapeutique. D'ailleurs, suite à l'étude publiée par Asahara *et al.* en 1997, des recherches extensives sur les EPCs et sur leurs fonctions ont débuté, suggérant que ces cellules peuvent être responsables de la vasculogenèse postnatale.^{29, 39, 40} Par contre, des controverses concernant l'origine, la source, l'isolation, la caractérisation et la fonction de ces cellules ont fait le sujet de plusieurs travaux dans ce domaine. Bien qu'on croyait que les EPCs dérivent seulement de l'hémangioblaste de la moelle osseuse, des études ont contredit cette théorie en mettant en évidence que les cellules mésenchymateuses non-hématopoïétiques⁴¹ ainsi que des lignées myéloïdes/monocytes⁴²⁻⁴⁷ possèdent également un potentiel de différenciation en EPCs. De plus, certains tissus contiennent des cellules souches qui peuvent se différencier en plusieurs types de cellules matures, dont les cellules souches du tissu myogénique qui ont un potentiel de différenciation endothéliale.⁴⁸

Le terme EPC a été désigné à une panoplie de sous-types cellulaires ayant un caractère progéniteur et thérapeutique. Entre autres, dans la littérature scientifique, on retrouve les termes suivants : les EPCs circulantes («*Circulating EPCs*», CEPCs),⁴⁹ les cellules ressemblant aux cellules endothéliales («*Endothelial-like cells*», EC-like cells).^{44, 50} les cellules endothéliales circulantes («*Circulating Endothelial Cells*», CECs),^{27, 51, 52} les cellules angiogéniques circulantes («*Circulating Angiogenic Cells*», CACs),^{53, 54} les angioblastes circulantes («*Circulating Angioblasts*»),⁵⁵ les unités de formation de colonies des cellules endothéliales («*Colony-Forming Unit Endothelial Cells*», CFU-ECs),⁵³ et les cellules de formation de colonies endothéliales («*Endothelial Colony Forming Cells*», ECFCs).⁵³ Les premiers critères de caractérisation des EPCs, qui étaient basés sur l'expression de marqueurs CD34, VEGFR-2 et CD133, ont porté confusion avec les cellules progénitrices hématopoïétiques («*Hematopoietic Progenitor Cells*», HPCs) qui partagent les mêmes marqueurs de surface.^{53, 56, 57} Or, de nouveaux moyens de caractérisation étaient nécessaires. De plus, les recherches dans ce domaine ont suggéré que les conditions d'isolation et de culture sont à la base de la différenciation de chaque sous-type d'EPCs déterminant ainsi leur morphologie, phénotype et fonction.

Il existe trois tissus contenant des cellules à partir desquelles les EPCs peuvent être générées : le cordon ombilical, la moelle osseuse et le sang périphérique. Il est postulé que les cellules souches ou progénitrices hématopoïétiques (HSCs/HPCs) dérivées du cordon ombilical sont les cellules progénitrices les plus potentes entre les trois sources de cellules existantes. En effet, puisqu'elles sont encore à un stade immature, elles offrent un potentiel prolifératif accru par rapport aux autres sources de cellules souches, et elles sont plus appropriées pour la transplantation à partir de donneurs inconnus.⁵⁸ Plus particulièrement, les cellules CD34⁺ dérivées du sang de cordon ombilical peuvent, sous des conditions favorisant la différenciation endothéliale, générer des EPCs, caractérisées par l'expression du facteur von Willebrand («*von Willebrand Factor*», vWF) et du VEGFR-2.^{59, 60} Cependant, des limitations d'ordre éthique ont été le sujet de débat dans la recherche sur les cellules souches provenant du cordon ombilical.

La moelle osseuse est la deuxième source la plus potente. Résidentes sous forme quiescente dans la niche stromale de la moelle osseuse, les cellules souches peuvent contribuer à la néovascularisation³⁹ suite à une mobilisation de la moelle osseuse aux sites de lésions vasculaires par des signaux impliquant des enzymes de dégradation, nommées les protéinases, telles que les métalloprotéinases dégradantes de la matrice («*Matrix Metalloproteinases*», MMPs), plus particulièrement la MMP-9,^{61, 62} des facteurs de croissance, tel que le VEGF,^{61, 63} des cytokines, telle que le facteur de stimulation de colonie de granulocytes («*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*», G-CSF),⁶¹⁻⁶³ des chimiokines, telles que le facteur-1 α dérivé des cellules stromales («*Stromal-Derived Factor-1 α* », SDF-1 α),^{62, 63} la protéine-1 chimiotactique des monocytes («*Monocyte Chemotactic Protein-1*», MCP-1)⁶⁴ et le facteur-1 α induit par l'hypoxie («*Hypoxia-Inducible Factor-1 α* », HIF-1 α),^{62, 65-67} et des récepteurs membranaires, tel que c-Kit.⁶¹

Le sang périphérique est le tissu le plus accessible chez l'adulte et donc le plus utilisé dans la différenciation des EPCs. Bien que ce tissu contienne une panoplie de types cellulaires à partir desquels les EPCs ont été dérivées, la caractérisation et la fonction progénitrice de chaque type demeurent un sujet de débat. Au cours des cinq dernières années, la communauté scientifique s'est mise d'accord sur l'existence de deux types de cellules circulantes dans le sang périphérique qui peuvent générer des EPCs : 1) les cellules provenant de la moelle osseuse et qui expriment des marqueurs de surface semblables aux HSCs,^{53, 68} tels que CD34, VEGFR-2 et CD133; et 2) des cellules myéloïdes/monocytaires qui possèdent un potentiel de différenciation en EPCs, caractérisées par l'expression de marqueurs de surface CD34, VEGFR-2 et vWF. Par

contre, ces deux types de cellules circulantes offrent également un potentiel thérapeutique différentiel.⁶⁹ Plus récemment, une distinction entre les cellules endothéliales circulantes («*Circulating Endothelial Cells*», CECs) et les EPCs a été noté, suggérant que les CECs, représentant 0.01% des cellules circulantes, sont caractérisées par l'expression CD34⁺CD133⁺VEGFR-2⁺CD144⁺, alors que les «vraies» EPCs, consistent en une population de moins de 0.0001% en circulation et caractérisée par l'expression CD34⁺CD133⁺VEGFR-2⁺CD45⁻.^{32, 53, 70-72} De plus, les CECs semblent être des cellules détachées de l'endothélium vasculaire qui exhibent une durée de survie limitée⁶⁸ alors que les EPCs sont plutôt dérivées de la moelle osseuse et impliquées dans la vasculogénèse postnatale.⁷³

La caractérisation non-conclusive des différents types d'EPCs par leurs marqueurs de surface a évoqué la nécessité de trouver de plus amples techniques de caractérisation afin de mieux distinguer ces types d'EPCs (Tableau 1.1). Avec les années et l'expertise accrue dans ce domaine, la communauté scientifique se penche plutôt vers une caractérisation combinatoire basée sur plusieurs aspects : la morphologie, le phénotype et la fonction, qui sont tous déterminés par la source, l'origine et les méthodes d'isolation et de culture des EPCs.

Tableau 1.1 : Marqueurs de surface cellulaire dans la caractérisation des EPCs

<i>Marqueur de surface</i>	<i>Nom alternatif</i>	<i>Fonction</i>	<i>Expression cellulaire</i>
CD14	-	Co-récepteur pour les lipopolysaccharides bactériens	Monocytes, Macrophages
CD31	PECAM-1	Adhésion intercellulaire	ECs, EPCs, plaquettes, monocytes, neutrophiles, lymphocytes T
CD34	-	Glycoprotéine importante pour l'adhésion intercellulaire, le maintien des cellules souches dans la moelle osseuse, et médie l'attachement des leucocytes aux veinules endothéliales	Hémangioblastes, HSCs, EPCs, ECs
VEGFR-1	Flt1	Récepteur tyrosine kinase pour VEGF-A et B, important pour l'assemblage des cellules endothéliales en vaisseaux	MAPCs, progéniteurs myéloïdes/monocytaires, ECs
VEGFR-2	KDR (humain) Flk1 (souris)	Récepteur tyrosine kinase pour VEGF-A, -C, -D et -E, essentiel pour le développement des cellules hématopoïétiques et endothéliales, médiateur principal de la capacité mitogénique et pro-migratoire de VEGF-A, régule la néovascularisation et la survie des cellules endothéliales	Hémangioblastes, EPCs, MAPCs, progéniteurs myéloïdes/monocytaires, ECs
CD133 (AC133)	Prominin 1	Glycoprotéine membranaire, fonction inconnue	HSCs, EPCs
CD117	c-Kit	Récepteur de SCF	HSCs
CD45	Antigène pan-leucocytaire	Protéine tyrosine phosphatase, importante pour l'activation des lymphocytes, rôle dans la transduction signalétique	Toutes les cellules hématopoïétiques différenciées à l'exception des érythrocytes
CD144	VE-Cadhérine	Glycoprotéine calcium-dépendante, protéine de jonction intercellulaire nécessaire au développement et au maintien de l'intégrité vasculaire	ECs
Tie-2	Tek	Récepteur des angiopoïétines (Agonistes : Ang1 et Ang4; antagonistes : Ang2 et Ang3)	ECs, HSCs, EPCs
vWF	Antigène relié au facteur VIII	Glycoprotéine sécrétée importante dans l'agrégation plaquettaire, rôle dans l'hémostase (stabilise le facteur VIII)	Produit par les ECs, megakaryocytes, stocké dans les plaquettes, sécrété dans le plasma

Légende: VEGF (facteur de croissance vasculaire endothélial), VEGFR-1 (récepteur 1 du VEGF), VEGFR-2 (récepteur 2 du VEGF), Tie-2 (tyrosine kinases-2 contenant les domaines des immunoglobulines et du facteur de croissance épidermique), vWF (facteur von Willebrand), PECAM-1 (molécule -1 d'adhésion cellulaire des plaquettes et de l'endothélium), SCF (facteur de cellules souches), Ang (angiopoïétines), ECs (cellules endothéliales matures), EPCs (cellules endothéliales progénitrices), HSCs (cellules souches hématopoïétiques), MAPCs (cellules progénitrices multipotentes adultes). Inspiré de George *et al.* Endothelial progenitor cell biology in disease and tissue regeneration. *Journal of hematology & oncology*. 2011;4:24 et de Marsboom *et al.* Endothelial progenitor cells: New perspectives and applications in cardiovascular therapies. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2008;6:687-701.

1.7. Les méthodes d'isolation et de culture des EPCs dérivées du sang périphérique humain

Plusieurs méthodes de culture ont été utilisées au cours des années 2000 pour générer des EPCs à partir des cellules mononucléaires du sang périphérique humain («*Peripheral Blood Mononuclear Cells*», PBMCs). Ces différentes méthodes influencent la morphologie, le phénotype et la fonction des cellules obtenues. Depuis l'étude d'Asahara *et al.* en 1997 jusqu'à l'année 2005, trois méthodes principales ont été employées pour générer, à partir des PBMCs, diverses populations initialement nommées des EPCs (Figure 1.2).⁵³

Dans un premier temps, la population obtenue par Asahara *et al.* provenait de la fraction non-adhérente des PBMCs cultivées dans l'Endocult, un milieu propice à la différenciation endothéliale, sur une matrice de fibronectine pour générer des CFU-ECs après 9 jours de culture, et caractérisées morphologiquement par un noyau de cellules rondes entourées de cellules fusiformes en périphérie.^{53, 74} Ces cellules expriment les marqueurs endothéliaux, CD34, VEGFR-2, Tie-2 et E-sélectine. D'ailleurs, ces cellules ont été administrées dans un modèle d'ischémie vasculaire *in vivo* afin de promouvoir l'angiogenèse.⁵³

La deuxième méthode implique la culture de PBMCs non-fractionnées dans un milieu permettant la différenciation endothéliale. Dans cette méthode, les cellules non-adhérentes sont éliminées après 4 jours de culture pour obtenir des CACs. Ces cellules ne forment pas de colonies, mais expriment les marqueurs endothéliaux, CD34, VEGFR-2, CD31 et CD144. Semblablement aux CFU-ECs, mais différent morphologiquement de ces dernières.⁵³ Ces deux types cellulaires sont nommés les EPCs précoces, «*early*» EPCs ou «*early outgrowth*» EPCs (EOCs), pour leur courte durée de différenciation.

Finalement, la troisième méthode d'isolation et de culture des PBMCs est utilisée pour générer des ECFCs.^{53, 74} La fraction adhérente des PBMCs est cultivée sur une matrice de collagène de type I dans un milieu favorisant la différenciation endothéliale pour une période de 10 à 21 jours résultant en une population indistincte de cellules endothéliales matures à la fois morphologiquement, par la formation d'une population homogène de cellules endothéliales, et fonctionnellement, par leur potentiel prolifératif et angiogénique. Ces cellules, nommées les EPCs tardives, ou «*late outgrowth EPCs*», pour leur longue durée de culture et de survie, sont impliquées dans la formation *de novo* des vaisseaux sanguins.⁵³

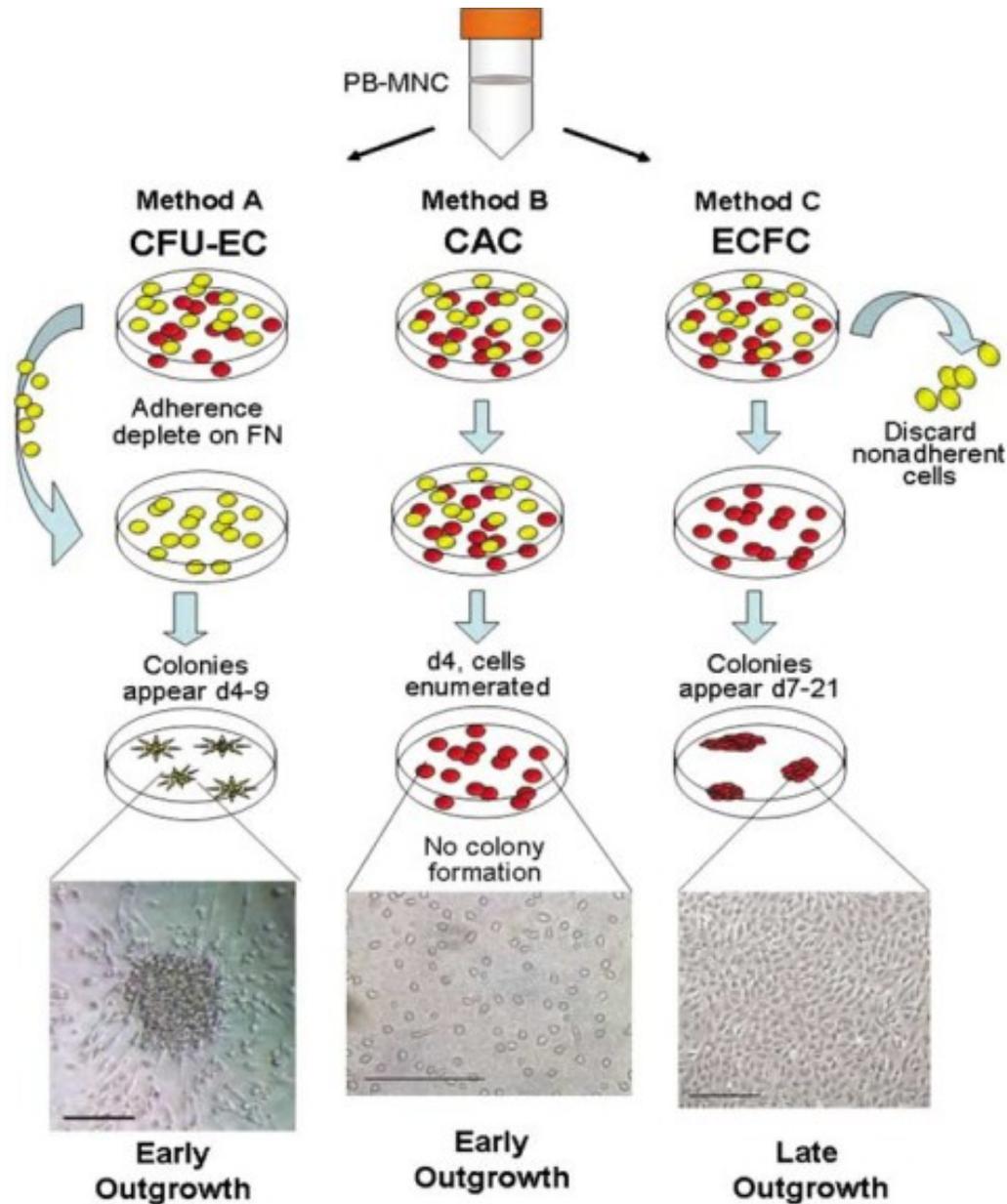


Figure 1.2 : Méthodes utilisées dans la culture cellulaire des EPCs. Méthode A : les cellules mononucléaires non-adhérentes sont cultivées sur la fibronectine pour 4 à 9 jours, dans un milieu favorisant la différenciation endothéliale, forment des CFU-ECs (les unités de formation de colonies des cellules endothéliales), caractérisées par un noyau de cellules rondes entourées par des cellules fusiformes en périphérie; Méthode B : les cellules mononucléaires adhérentes, cultivées pour 4 à 7 jours dans un milieu favorisant la différenciation endothéliale, génèrent des cellules angiogéniques circulantes (CACs) et ne forment pas de colonies; Méthode C : les cellules mononucléaires adhérentes, cultivées pour une période de 7 à 21 jours dans un milieu favorisant la différenciation endothéliale, forment des cellules de formation de colonies endothéliales (ECFCs), caractérisées par une population homogène de cellules. Prater *et al.* Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells. *Leukemia*. 2007;21:1141-1149

1.8. Les sous-types d'EPCs : précoces ou «*early*» et tardives ou «*late*»

Le sang périphérique humain contient plusieurs populations de cellules parmi les cellules mononucléaires circulantes qui ont des caractéristiques permettant leur différenciation *in vitro* en EPCs et qui peuvent acquérir un potentiel important dans la réparation et la régénération vasculaire.^{43, 45, 46, 49, 51, 69, 75-80} Depuis l'année 2008, plusieurs études démontrent que deux sous-types d'EPCs existent, les EPCs précoces, ou «*early*» EPCs, et les EPCs tardives, ou «*late*» EPCs. Chaque sous-type d'EPCs est dérivé d'une population distincte parmi les PBMCs et possède des fonctions différentes *in vitro* et *in vivo* (Tableau 1.2).^{70, 81, 82}

Il est postulé que les «*early*» EPCs, caractérisées par leur nature plutôt monocytaire, sont dérivées d'une population monocytaire CD14⁺ abondante. Suite à une culture de ces cellules sur une surface de fibronectine pour quelques jours, une population distincte d'EPCs est générée. Cette population exprime des marqueurs endothéliaux, tels que VEGFR-2^{81, 83} et Tie-2⁸⁰, mais continue à exprimer des marqueurs leucocytaires et monocytaires, CD45 et CD14, respectivement.^{80, 81, 83} Les «*early*» EPCs assimilent l'Ac-LDL et lient l'Ulex-lectine, tous les deux étant des caractéristiques endothéliales. Morphologiquement, les «*early*» EPCs forment une population hétérogène de cellules rondes et fusiformes ou allongées. De plus, ces cellules ne possèdent pas de potentiel prolifératif et ne peuvent pas former des nouveaux tubes vasculaires. Par contre, ces EPCs ont tout de même un potentiel angiogénique important et contribuent à la néovascularisation par un effet paracrine sur les cellules endothéliales, via la relâche de plusieurs cytokines et facteurs de croissance, dont l'interleukine-8 («*Interleukin-8*», IL-8), le G-CSF et le VEGF, ainsi que la prostacyclin (PGI₂) et pourraient donc influencer indirectement la réparation et la régénération vasculaire.^{43, 80, 83-86}

Les «*late*» EPCs sont générées à partir de PBMCs cultivées sur une matrice de collagène durant 21 jours. Morphologiquement, ces cellules forment une monocouche homogène qui ressemble aux cellules endothéliales matures. De plus, le phénotype de ces cellules se rapproche des cellules endothéliales par l'expression de marqueurs endothéliaux, tels que CD31, VEGFR-2 et CD144, mais expriment toujours le marqueur progéniteur CD34.^{75, 80} Les «*late*» EPCs assimilent également l'Ac-LDL et lient l'Ulex-lectine. Contrairement aux «*early*» EPCs, ce sous-type d'EPCs ne possède pas d'effet paracrine important. En revanche, les «*late*» EPCs peuvent former des nouveaux tubes vasculaires. D'ailleurs, les «*late*» EPCs sont elles-mêmes incorporées au cours du processus de néovascularisation.^{80, 85-87}

Les récentes études qui ont porté sur la comparaison de ces deux types d'EPCs suggèrent que chaque population possède ses propriétés spécifiques et qu'une synergie entre les «*early*» et «*late*» EPCs permettrait une efficacité accrue durant la néovascularisation.^{69, 80, 85}

Tableau 1.2 : Caractéristiques cellulaires des «early» et «late» EPCs et ECs matures

	<i>«Early» EPCs</i>	<i>«Late» EPCs</i>	<i>ECs matures</i>
Caractéristiques morphologiques			
Caractéristiques cellulaires	Adhérentes Cellules rondes et fusiformes Hétérogène	Adhérentes Cellules allongées Homogène («cobblestone-like»)	Adhérentes Cellules allongées
Culture des cellules	4-7 jours	>14 jours	Plusieurs passages
Potentiel prolifératif	Non	Oui	Oui
Expression de marqueurs de surface cellulaire	CD14 CD45 CD31 CD133 CD34 VEGFR-2 vWF Tie-2	CD31 CD34 CD144 VEGFR-2 vWF Tie-2	CD31 CD34 CD144 VEGFR-2 vWF
Caractéristiques fonctionnelles in vitro			
Assimilation de l'Ac-LDL	Oui	Oui	Oui
Formation de tubes	Non	Oui	Oui
Potentiel de migration	Oui	Oui	Oui
Caractéristiques fonctionnelles in vivo			
Sécrétion de cytokines	Oui (VEGF, IL-8, HGF, G-CSF)	Faible	Faible
Production de NO	Faible	Oui	Oui
Formation de nouveaux vaisseaux	Non	Oui	Non
Incorporation dans les vaisseaux préexistants	Oui	Oui	Non
Améliore la fonction des vaisseaux préexistants	Oui (effet paracrine)	Oui	Non

Légende : VEGFR-2 (récepteur 2 du facteur de croissance vasculaire endothélial), Tie-2 (tyrosine kinases-2 contenant les domaines des immunoglobulines et du facteur de croissance épidermique), vWF (facteur von Willebrand), VEGF (facteur de croissance vasculaire endothélial), IL-8 (interleukine-8), HGF (facteur de croissance hépatocytaire), G-CSF (facteur de stimulation de colonie de granulocytes) ECs matures (cellules endothéliales matures). Inspiré de Yoon *et al.* Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: The role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation*. 2005;112:1618-1627, Marsboom *et al.* Endothelial progenitor cells: New perspectives and applications in cardiovascular therapies. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2008;6:687-701, Shantsila *et al.* New insights on endothelial progenitor cell subpopulations and their angiogenic properties. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51:669-671, et Sen *et al.* Endothelial progenitor cells: Novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease. *Clin Sci* ⁸⁸. 2011; 120:263-283.

1.9. La biologie des EPCs

L'endothélium joue le rôle de protecteur du système vasculaire. Les cellules endothéliales sont responsables du maintien du tonus vasculaire et de la thromborésistance et offrent la perméabilité vasculaire permettant de préserver la circulation sanguine sous des conditions physiologiques.⁸⁹ Par contre, l'endommagement endothélial menant à la dysfonction endothéliale est à la base de plusieurs pathologies cardiovasculaires. Le processus par lequel les EPCs contribuent à la réparation endothéliale ou à la vasculogénèse postnatale se résume en quatre étapes qui seront reprises en détails dans cette section : 1) la mobilisation à partir de la moelle osseuse vers le sang périphérique par des signaux chimioattractants; 2) la domiciliation au site de lésion vasculaire ou de néoformation vasculaire; 3) l'invasion et la migration au site endommagé et 4) la différenciation en cellules endothéliales matures ou la régulation des processus angiogéniques par la relâche de facteurs paracrines.⁹⁰

1.9.1 La mobilisation et le recrutement

La mobilisation des EPCs est une étape essentielle dans leur recrutement aux sites de lésions vasculaires. Il est bien établi que la moelle osseuse constitue le réservoir principal des cellules souches et progénitrices hématopoïétiques et vasculaires. Les modifications protéolytiques de certaines cytokines et de leurs récepteurs sont à la base du processus de la mobilisation. En effet, trois interactions de molécules signalétiques avec leurs récepteurs ont été associées avec la mobilisation des EPCs : 1) le facteur des cellules souches («*Stem Cell Factor*», SCF)/c-kit); 2) le SDF-1 α /CXCR4; 3) VEGF/VEGFR-2 et 4) l'angiopoïétine-1 («*Angiopoietin-1*», Ang-1)/Tie2).⁹¹

Les protéinases sont largement impliquées dans la mobilisation des EPCs. Parmi ces protéinases, on retrouve les sérines protéases, les cathépsines cystéines, les MMPs et les MMPs de la famille ADAM. Le mécanisme d'action de celles-ci comprend l'activation de récepteurs, la génération de ligands de récepteurs, le clivage de molécules d'adhésion et des protéines de la matrice, et l'inactivation ou la modification de cytokines.⁹¹ Heisseg *et al.* ont mis en évidence le rôle de la MMP-9 dans la mobilisation des HSCs.⁹² Le stress cellulaire induit par l'ischémie ou le tissu tumoral promeut la relâche des facteurs chimiotactiques et angiogéniques, dont le SDF-1 α et le VEGF, respectivement. Ces facteurs stimulent les cellules stromales et induisent une augmentation de l'expression d'eNOS et de la production du NO. L'eNOS et le NO, qui est

produit comme cofacteur, jouent un rôle dans l'activation de la MMP-9 par le VEGF.⁹³ De plus, les niveaux plasmatiques élevés du SDF-1 α et du VEGF induisent la surexpression de la MMP-9 dans les HSCs et les cellules stromales. À son tour, la MMP-9 permet la libération du SCF (aussi nommé sKitL) de son précurseur membranaire KitL (mKitL) dans les cellules stromales de la moelle osseuse (Figure 1.3).^{31, 91, 94}

D'autre part, le G-CSF, un facteur utilisé dans les approches thérapeutiques afin de promouvoir la mobilisation des EPCs, induit la relâche des protéases, particulièrement l'élastase et la cathépsine G, à partir des neutrophiles, permettant ainsi de cliver les liens adhésifs entre les cellules stromales et les cellules souches de la moelle osseuse. Ces protéases peuvent cliver et inactiver le SDF-1 α relâché par les cellules stromales. Le mode d'action du G-CSF est lié à la surexpression du récepteur CD26 dans les cellules souches CXCR4⁺ permettant le clivage du terminal N du SDF-1 α et l'inactivation de CXCR4 résultant en l'inhibition de la rétention des cellules.^{95, 96} De plus, le G-CSF induit le clivage de l'uPAR, une molécule adhésive localisée au niveau des HSCs de la moelle osseuse. L'uPAR membranaire régule la mobilisation et la prolifération ainsi que les propriétés angiogéniques des HSCs.⁹⁷⁻⁹⁹

Le VEGF est également impliqué dans la mobilisation des EPCs en liant ses récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 au niveau des cellules souches endothéliales et hématopoïétiques, résultant en l'activation de la MMP-9, par l'entremise d'eNOS. À son tour, la MMP-9 peut cliver et activer cKitL permettant ainsi la mobilisation des EPCs à partir de la moelle osseuse.³¹ D'ailleurs, plusieurs approches considérées visent à augmenter les niveaux de VEGF circulant, tel que par le transfert génétique du VEGF, afin d'induire la mobilisation et un nombre accru d'EPCs.^{63, 100, 101}

Les angiopoïétines jouent un rôle dans le maintien de la niche des HSCs quiescentes dans la moelle osseuse.¹⁰² Plus particulièrement, l'interaction de l'Ang-1 avec son récepteur Tie-2 promeut la quiescence des HSCs.¹⁰³ Or, le blocage de cette interaction présente une cible thérapeutique pour induire la mobilisation des cellules progénitrices de la moelle osseuse.

D'autre part, les intégrines β_3 , qui sont exprimées sur les cellules endothéliales et hématopoïétiques, ont été associées avec la rétention des EPCs dans la moelle osseuse et sont impliquées dans la mobilisation de ces cellules.^{104, 105}

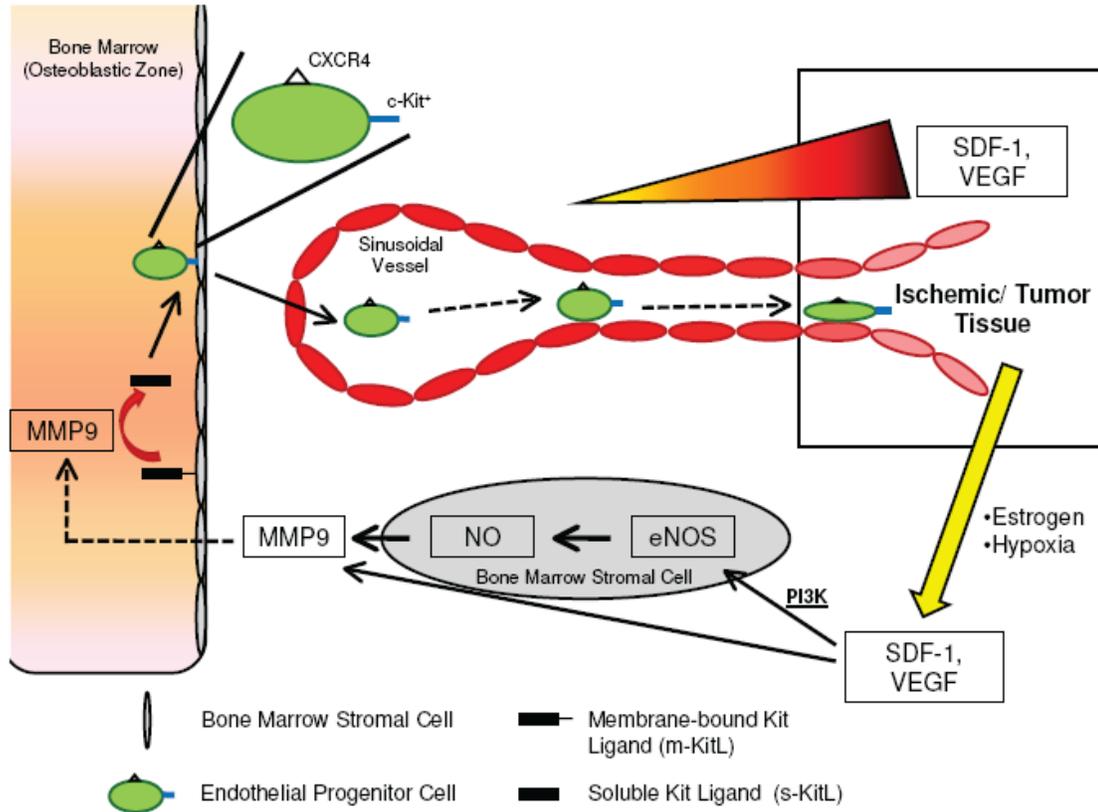


Figure 1.3 : La mobilisation et le recrutement des EPCs de la moelle osseuse sont contrôlés par l'expression de cytokines et de chimiokines. La mobilisation des EPCs à partir de la niche de la moelle osseuse aux sites de néovascularisation dépend d'un gradient de cytokines et de chimiokines. Le stress cellulaire induit par l'ischémie ou le tissu tumoral promeut la relâche des facteurs, dont le VEGF et le SDF-1, qui stimulent les cellules stromales et induisent une augmentation de l'expression d'eNOS et de la production du NO. Par la suite, ceci induit la sécrétion de la MMP-9 qui peut alors convertir le Kit-L membranaire (mKitL) en Kit-L soluble (sKitL) permettant la relâche des EPCs des cellules stromales de la moelle osseuse. Les EPCs peuvent alors migrer de manière gradient-dépendante vers les facteurs chimiotactiques et angiogéniques, tels que le SDF-1 et le VEGF, à l'aide de leurs récepteurs CXCR4 et VEGFR-2, respectivement. Légende : bone marrow (moelle osseuse), osteoblastic zone (zone ostéoblaste), sinusoidal vessel (vaisseau sinusoidal), ischemic/tumor tissue (tissu ischémique/tumoral), estrogen (estrogène), hypoxia (hypoxie), SDF-1 (facteur-1 dérivé des cellules stromales), VEGF (facteur de croissance vasculaire endothélial), PI3K (phosphoinositide-3 kinase), eNOS (synthétase endothéliale de l'oxyde nitrique), NO (oxyde nitrique), MMP-9 (métalloprotéinase 9 de la matrice), mKitL (KitL membranaire), sKitL (KitL soluble), bone marrow stromal cell (cellule stromale de la moelle osseuse), endothelial progenitor cell (cellule endothéliale progénitrice). George *et al.* Endothelial progenitor cell biology in disease and tissue regeneration. *Journal of hematology & oncology*. 2011;4:24.

1.9.2 La domiciliation et l'adhésion

Suite à la mobilisation des EPCs, des signaux spécifiques menant à la domiciliation de ces cellules aux sites de lésions vasculaires sont nécessaires. Le processus de domiciliation des EPCs à une lésion vasculaire est semblable à celui du recrutement des leucocytes à un

endothélium activé. Une panoplie de cytokines et de facteurs de croissance a été corrélée à la domiciliation des EPCs : SDF-1 α , VEGF, facteur 2 de croissance semblable à l'insuline («*Insulin-like Growth Factor-2*», IGF-2), MCP-1, IL-1 β ,¹⁰⁶ IL-8, CXCL1 et CXCL7, facteur inhibiteur de la migration des macrophages («*Macrophage migration Inhibitory Factor*», MIF) et bradykinin.⁹¹

En plus du rôle important que joue le SDF-1 α /CXCR4 dans la mobilisation des EPCs, cette interaction est aussi impliquée dans la domiciliation de ces cellules dans le microenvironnement de la lésion vasculaire. Le SDF-1 α induit l'expression des Rac GTPases, Rac1 et Rac2, au niveau des EPCs et offre une polarité et une spécificité de domiciliation.¹⁰⁷ Cependant, l'expression du récepteur CXCR2 dans les EPCs semble jouer un rôle plus important dans le processus de la domiciliation de ces cellules en liant ses ligands, CXCL1 et CXCL7.¹⁰⁸

Les sélectines, E- et P-sélectine, lient le ligand-1 glycoprotéique de la P-sélectine («*P-Selectin Glycoprotein Ligand-1*», PSGL-1) et permettent l'adhésion initiale des EPCs.^{109, 110} De plus, une des interactions qui sera discutée dans le chapitre 3 est le rôle des plaquettes dans leur interaction, via la P-sélectine, avec les EPCs favorisant ainsi le recrutement et l'adhésion de ces dernières à la lésion vasculaire.¹¹¹⁻¹¹⁸ Par ailleurs, ces interactions sélectine-dépendantes favorisent également la vascularisation et la métastase des tumeurs.¹¹⁹

Pour contribuer à la domiciliation cellulaire, la PGI₂ facilite le recrutement des EPCs¹²⁰ en modulant l'intégrine $\alpha_4\beta_1$, qui lie la fibronectine et le VCAM-1.^{90, 120, 121} L'intégrine $\alpha_5\beta_1$ exprimée sur les EPCs lie la région du motif RGD (arginine-glycine-aspartic acid) de la fibronectine et contribue à l'adhésion de ces cellules aux composantes de la matrice extracellulaire.^{90, 122, 123} D'ailleurs, l'administration des statines permet la surexpression de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ induisant davantage la domiciliation des EPCs.¹²⁴ La laminine présente également un rôle dans la domiciliation des EPCs en liant son récepteur $\alpha_6\beta_1$. Une étude récente a démontré que l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ est régulée par le VEGF et le facteur de croissance des fibroblastes («*Fibroblast Growth Factor*», FGF) et est nécessaire à la domiciliation des EPCs dans le muscle ischémique *in vivo* et à l'adhésion des EPCs aux composantes de la membrane basale *in vitro*.^{125, 126} De plus, les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ interagissent avec le motif RGD de leurs ligands, incluant la vitronectine, la fibronectine, le fibrinogène et le vWF, promouvant ainsi la domiciliation et l'adhésion des EPCs.^{104, 127} Plus particulièrement, l'intégrine $\alpha_v\beta_5$ est essentielle à l'adhésion des EPCs aux cellules endothéliales.¹²⁸

Les intégrines β_2 sont largement exprimées sur les cellules souches et progénitrices et jouent également un rôle principal dans la domiciliation, par l'entremise de l'ICAM-1,¹²⁹ et l'adhésion des EPCs sur l'endothélium et le fibrinogène.¹³⁰ Les EPCs de souris déficientes en intégrine β_2 sont incapables de domicilier aux sites ischémiques et de favoriser la néovascularisation.¹³⁰

Alors que la $\alpha_4\beta_1$ joue un rôle essentiel dans le maintien de l'équilibre entre la rétention et la domiciliation des EPCs de la moelle osseuse,³⁴ les intégrines $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_6\beta_1$ et $\alpha_V\beta_5$ jouent des rôles plus importants au niveau de l'invasion et de la différenciation des EPCs et la production de facteurs paracrines aux sites de vascularisation.⁹⁰

1.9.3 L'invasion et la migration

Une fois que les EPCs sont adhérentes aux sites d'endommagement vasculaire, ces cellules doivent migrer à travers l'endothélium vers les tissus sous-jacents. Le processus de chimiotactisme est responsable de l'invasion et de la migration des EPCs par la relâche de plusieurs facteurs aux sites de vascularisation. Le rôle de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ dans la migration des EPCs en réponse au VEGF a été mis en évidence.¹³¹ De plus, l'intégrine $\alpha_6\beta_1$ est impliquée *in vitro* et *in vivo* dans la migration VEGF-dépendante des EPCs via la voie signalétique PI3K/Akt.¹²⁵ Cette voie démontre des mécanismes favorisant la fonction des EPCs dans la néovascularisation.¹³² En plus du rôle essentiel des intégrines β_2 dans l'adhésion, celles-ci sont aussi impliquées dans la migration trans-endothéliale et dépendent principalement de la relâche de VEGF et de MCP-1.³⁴ Le VEGF induit l'expression des MMPs qui favorisent la migration des EPCs.¹³³ De plus, le SDF-1 α est un facteur qui induit la migration des EPCs.^{134, 135}

L'expression des cathépsines et des MMPs par les EPCs est aussi un facteur essentiel dans la migration des EPCs. Urbich *et al.* ont mis en évidence le rôle de la cathépsine L dans la néovascularisation induite par les EPCs.^{136, 137} D'autre part, la MT1-MMP est un régulateur de la migration des cellules CD34⁺ et les MMP-2 et MMP-9 secrétées par les cellules progénitrices contribuent davantage à leur migration.^{91, 138, 139}

1.9.4 La différenciation et la prolifération

La différenciation des EPC est contrôlée par des signaux et des interactions spécifiques aux sites de vascularisation. Entre autres, l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ et son ligand, la fibronectine, jouent un

rôle dans la différenciation des EPCs.¹³¹ Plusieurs facteurs paracrines, tels que le VEGF,¹³¹ les angiopoïétines,¹⁴⁰ le SDF-1 α ,^{113, 135, 141} l'IGF-1,¹⁴² le MCP-1,⁶⁴ la protéine-1 α inflammatoire des macrophages («*Macrophage Inflammatory Protein-1 α* », MIP-1 α),¹⁴³ le facteur de croissance dérivé des plaquettes («*Platelet-Derived Growth Factor*», PDGF)^{144, 145} et les interleukines¹⁴⁶ sont également impliqués dans la différenciation et la prolifération des EPCs.^{34, 69, 147, 148} De plus, la régulation des facteurs de transcription, principalement la famille des homéobox (Hox) régulés par les histones déacetylases, déterminent la différenciation et la prolifération des EPCs. Particulièrement, la régulation du facteur de transcription HoxA9, qui régule l'expression des gènes d'eNOS, de VEGFR-2 et de VE-Cadhérine (CD144), est nécessaire à la différenciation et à la prolifération des EPCs.^{125, 131, 149} Le gène Hex de la famille des gènes Hox est requis pour la différenciation de l'hémangioblaste en cellules progénitrices hématopoïétiques définies.¹⁵⁰

1.9.5 Régulation de la fonction des EPCs

La fonction des EPCs est influencée par plusieurs facteurs physiologiques et pharmacologiques et même pathologiques. L'érythropoïétine et l'estrogène sont impliqués dans la mobilisation des EPCs.^{151, 152} L'érythropoïétine agit via l'activation de la protéine kinase Akt et stimule la différenciation des EPCs.¹⁵³ L'estrogène, plus spécifiquement le 17 β -estradiol, inhibe la sénescence des EPCs^{154, 155} et promeut la réendothélialisation et la néovascularisation via une voie signalétique impliquant le NO¹⁵⁶ et l'augmentation de l'activité de la MMP-9, permettant ainsi la relâche des EPCs de la moelle osseuse.¹⁵⁷ Les niveaux élevés de leptine dans le tissu adipeux,¹⁵⁸ qui coïncident avec l'obésité, influencent négativement la migration des EPCs et leur potentiel à former des tubes.¹⁵⁹ De plus, la présence des concentrations élevées de la protéine réactive C («*C Reactive Protein*», CRP), corrélée avec l'incidence de maladies cardiovasculaires, diminue le nombre, la survie et le potentiel angiogénique des EPCs.¹⁶⁰ En effet, le CRP réduit la production de l'IL-8, un important médiateur paracrine dans la fonction des EPCs sur les cellules endothéliales matures, en inhibant la voie de la p38 MAPK.¹⁶¹ De même, le facteur- α de nécrose tumorale («*Tumor Necrosis Factor- α* », TNF- α) induit l'apoptose des EPCs, et réduit leur adhésion, migration, prolifération et leur potentiel de formation de nouveaux tubes vasculaires. Le TNF- α dérégule l'expression des gènes d'eNOS et d'oxyde nitrique synthétase inductible («*inducible Nitric Oxide Synthase*», iNOS) et, conséquemment, la production du NO, induisant la sénescence des EPCs prolifératives via un mécanisme impliquant

la p38 MAPK^{162, 163} L'administration de rosiglitazone, un médicament anti-diabétique agoniste du récepteur PPAR γ des cellules adipeuses, atténue l'apoptose des EPCs induite par le TNF- α via un mécanisme impliquant la voie signalétique ERK/MAPK et NF- κ B et inhibant l'activité de la caspase-3, un enzyme apoptotique.¹⁶⁴

Les agents pharmacologiques, tels que les statines et les agonistes du PPAR γ , contribuent également aux fonctions des EPCs. Plus particulièrement, les statines, telles que l'atorvastatin¹⁶⁵ et le rosuvastatin,¹⁶⁶ favorisent la mobilisation des EPCs.^{165, 167-171} Quant aux agonistes du PPAR γ , tel que le rosiglitazone, ceux-ci favorisent l'adhésion, la migration, la différenciation et la prolifération des EPCs et réduisent l'apoptose de ces cellules.^{132, 168, 169} L'administration des agents immunosuppresseurs, tels que la cyclosporine et le sirolimus (ou rapamycin), réduit l'adhésion, la migration et la prolifération des EPCs et peut même induire l'apoptose de ces dernières.^{132, 172} L'administration des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine («*Angiotensin-Converting Enzyme*», ACE) et les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine («*Angiotensin Receptor Antagonists*», ATRAs) ou les bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine («*Angiotensin Receptor Blockers*», ARBs) augmente le nombre d'EPCs en réduisant les niveaux de stress oxydatif et en induisant la relâche de VEGF.^{173, 174}

Les conditions présentes lors du développement et de la progression de certaines pathologies influencent le nombre et les fonctions des EPCs. Les maladies des artères coronaires, l'infarctus du myocarde aigue, et l'ischémie des membres périphériques présentent des conditions par lesquelles la relâche de facteurs est impliquée dans la mobilisation et la domiciliation des EPCs aux sites de vascularisation.¹⁶⁸ D'autre part, sous des conditions hypoxiques, telles que dans la progression des tumeurs, une surexpression du gène HIF-1 α induit la relâche de chimiokines et de facteurs de croissance, dont le SDF-1 α et le VEGF, et, en conséquence, contribue au recrutement et à la prolifération des EPCs menant à la vascularisation pathologique.¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ D'ailleurs, le gène HIF-1 α est une cible de la thérapie génétique dans la régulation de la vascularisation pathogénique.¹⁷⁸

1.10 Les EPCs : biomarqueurs des risques cardiovasculaires

Suite à la corrélation observée entre le nombre d'EPCs circulantes et les manifestations cliniques, les EPCs ont récemment été considérées comme des biomarqueurs de risques cardiovasculaires. Les individus souffrant de maladies cardiovasculaires présentent

considérablement moins d'EPCs circulantes ainsi qu'une fonction modifiée et réduite de ces cellules.^{70, 179} La fonctionnalité réduite des EPCs induit davantage l'endommagement vasculaire et, par conséquent, la dysfonction endothéliale.^{70, 180} Or, l'intérêt accru de la communauté scientifique vise à optimiser les approches thérapeutiques pour permettre de maintenir ou accroître le nombre et la fonction des EPCs.

1.10.1 Le diabète

La fonction des EPCs est altérée chez les patients qui souffrent de diabète de type 1 et 2.¹⁸¹⁻¹⁸³ Chez les diabétiques, chaque étape de la vie des EPCs est affectée, depuis la mobilisation jusqu'à la domiciliation et la différenciation.¹⁸⁴ Plus particulièrement, les propriétés prolifératives et adhésives sont compromises et une dysfonction au niveau du potentiel d'incorporation des EPCs dans la formation de tubes vasculaires est notée.¹⁸² Au niveau cellulaire, l'hyperglycémie induit le stress oxydatif, l'endommagement de l'ADN et l'apoptose des EPCs.¹⁸⁵ La sénescence des «*early*» et des «*late*» EPCs a été corrélée à une biodisponibilité réduite du NO.^{183, 186, 187} Les patients souffrant de diabète de type 1 et 2 exhibent également une migration réduite des «*early*» EPCs¹⁸⁸ liée à une lipotoxicité, par la présence des lipoprotéines de faibles densité oxydées («*oxidized LDL*», ox-LDL),¹⁸⁹ et à une altération de l'expression d'eNOS et de la biodisponibilité du NO,¹⁸⁷ affectant ainsi négativement le rôle important de ce dernier dans le recrutement des EPCs.¹⁹⁰ Cette dysfonction est associée à un profil pro-inflammatoire des «*early*» EPCs sous des conditions qui prédisposent à la dysfonction endothéliale, telles que le diabète et l'hyperglycémie.¹⁹¹ Reconnaisant que le diabète offre un environnement néfaste aux EPCs, quelques approches thérapeutiques ont été utilisées pour renverser ces effets. Entre autres, les antagonistes des ACEs, tels que l'olmesartan, l'ibesartan et le telmisartan, permettent d'augmenter le nombre des EPCs circulantes, plus particulièrement des «*early*» EPCs.^{174, 192} Des alternatives ont été suggérées afin d'améliorer la fonction des EPCs, dont l'administration de facteurs de croissance, tels que le VEGF, le SDF-1 α et l'IL-8, des antioxydants, tels que le benfotiamine, des hormones, tel que l'adiponectine, et des inhibiteurs des ACEs et des statines.¹⁸⁴

1.10.2 L'hypertension

L'hypertension ainsi que les facteurs qui prédisposent à cette condition sont parmi les causes du nombre réduit et de la fonction altérée des EPCs.^{193, 194} La dysfonction endothéliale induit un profil vasoconstricteur menant ainsi à l'oblitération de la lumière vasculaire et au développement de l'hypertension.¹⁹⁵ La biodisponibilité réduite du NO due à la fonction altérée des EPCs¹⁹⁶ et à la surproduction des espèces réactives de l'oxygène («*Reactive Oxygen Species*», ROS)¹⁹⁷ seraient impliquées dans l'hypertension. L'administration des antihypertenseurs et des inhibiteurs des ACEs a été associée à la réversibilité de la dysfonction des «*early*» EPCs.^{193, 198} Par contre, le nombre des «*early*» EPCs est significativement augmenté alors que les «*late*» EPCs demeurent inchangées chez les patients souffrant d'hypertension pulmonaire.¹⁹⁹

1.10.3 L'hyperlipidémie

L'hyperlipidémie, ou l'hypercholestérolémie, modifie la fonction et réduit le nombre des «*early*» EPCs, dû aux niveaux élevés d'ox-LDL.^{200, 201} L'ox-LDL inhibe la différenciation VEGF-dépendante des «*early*» EPCs par la désactivation de la voie signalétique de l'Akt.²⁰² De plus, l'ox-LDL induit la sénescence et altère la fonction proliférative et angiogénique des EPCs.²⁰³ En effet, la fonction angiogénique réduite des «*early*» EPCs due aux niveaux élevés de lipides est associée à une augmentation des niveaux des ROS²⁰⁴ et à une dérégulation d'eNOS.²⁰⁵ Les statines, qui inhibent la HMG-CoA réductase, un enzyme responsable de la production du cholestérol, ont été utilisées afin de limiter les effets néfastes des lipoprotéines sur les EPCs. Cette approche pharmacologique module la réparation vasculaire par l'augmentation du nombre des «*early*» EPCs et induit leur différenciation via l'activation de la voie signalétique PI3K et la stimulation de la production du NO.^{183, 206} Par contre, la présence de niveaux élevés des lipoprotéines de haute densité («*High-Density Lipoproteins*», HDL), aussi nommé le cholestérol bénéfique, régule positivement le nombre et la fonction des EPCs par une augmentation de l'expression d'eNOS et une inhibition de la caspase-3, un enzyme impliquée dans l'apoptose des «*early*» EPCs.²⁰⁷

1.10.4 Le tabagisme

Le tabagisme est la cause primaire évitable du développement des maladies cardiovasculaires, principalement l'athérosclérose. Le nombre et la fonction des «*early*» EPCs sont négativement affectés par le tabagisme²⁰⁸⁻²¹⁰ et la cessation de la consommation de la nicotine serait un moyen d'augmenter le nombre des EPCs chez les fumeurs chroniques.²¹¹ D'ailleurs, la nicotine, qui se lie à son récepteur nAChR («*neuronal nicotinic receptor*»), contribue à la dérégulation de plusieurs processus biologiques, tels que la prolifération, l'apoptose, la migration, l'invasion, l'angiogenèse et l'inflammation.²¹² Le tabagisme a plusieurs effets, dont la dilatation des artérioles de résistance,²¹³ l'inflammation, qui affecte les propriétés antioxydants des EPCs,²¹⁴ la perturbation de l'hémostase et de la coagulation systémique,²¹⁵ et l'augmentation du stress oxydatif, induisant la dysfonction endothéliale.²¹⁶ Les ROS intracellulaires des EPCs induits par le tabagisme contribuent à exacerber les propriétés adhésives des «*early*» EPCs qui seraient impliquées dans l'angiogenèse pathologique chez les fumeurs.²¹⁷

1.10.5 La sédentarité

De nos jours, la sédentarité et le manque d'activité physique augmentent notre susceptibilité de développer des maladies cardiovasculaires, telles que les maladies coronariennes, l'athérosclérose²¹⁸⁻²²⁰, et l'insuffisance cardiaque.²²¹ Alors que la sédentarité résulte aussi en une réduction du nombre des EPCs circulantes,²²² l'activité physique contribue à la mobilisation des EPCs, à partir de la moelle osseuse, et à la réparation et la régénération endothéliale.^{218, 219} Les individus souffrant d'obésité exhibent un nombre d'«*early*» EPCs circulantes et un potentiel de formation de colonies réduits dus aux niveaux plus élevés de tissus adipeux par rapport aux individus qui mènent une vie active et qui ne démontrent pas de surplus de poids.^{220, 223} Or, le maintien d'un mode de vie sain et actif contribuerait à moduler positivement la fonction des EPCs et à prévenir le développement des maladies cardiovasculaires.^{224, 225}

1.10.6 Le vieillissement

Le développement des maladies cardiovasculaires avec l'âge se doit, entre autres, à l'incidence de la dysfonction endothéliale et à la réduction du nombre d'EPCs.²²⁶ En vieillissant, la fonction des EPCs dans le maintien de l'hémostase vasculaire est atténuée et leur potentiel prolifératif et migratoire est réduit^{223, 227} dû à une diminution de la biodisponibilité du VEGF²²⁸ et du NO,²²⁹⁻²³¹ qui jouent également des rôles importants dans la mobilisation et la survie des EPCs.⁶³ Une étude portant sur un modèle animal de souris hyper-cholestérolemique ApoE^{-/-} a démontré que les EPCs de souris plus âgées sont moins efficaces que les EPCs de jeunes souris dans la prévention des lésions athérosclérotiques.²³² La déplétion des réserves d'EPCs due à l'avancement de l'âge est exacerbée chez les individus qui présentent d'autres facteurs de risques cardiovasculaires. L'augmentation du nombre d'EPCs circulantes et le «rajeunissement» de l'endothélium vasculaire semblent être une approche protectrice contre les maladies cardiovasculaires induites par la dysfonction endothéliale avec le vieillissement.²³³

1.10.7 Le stress oxydatif

L'effet marqué du stress oxydatif existe souvent simultanément avec les autres facteurs de risque, tels que le diabète, l'hypertension, le tabagisme et le vieillissement, qui prédisposent à la dysfonction endothéliale et à la pathogenèse des maladies cardiovasculaires. Cet effet est essentiellement exprimé par un déséquilibre entre la production et la biodisponibilité physiologique du NO et la production des ROS.²³⁴ Les EPCs ainsi que les cellules endothéliales sont très sensibles à ces déséquilibres. Il est bien établi que des niveaux faibles de stress oxydatif jouent un rôle dans la régulation des fonctions des EPCs, tels que la différenciation, la prolifération et la migration.²³⁵ Par contre, lorsque le stress oxydatif est augmenté, la fonction des EPCs est négativement régulée due à l'activité induite de la NADPH oxidase, une des sources majeures des ROS,²³⁵ et le découplage d'eNOS menant ainsi à la dérégulation de la réparation endothéliale et de l'angiogenèse induites par les EPCs.^{234, 236} Dans les EPCs, la surproduction des ROS induit la production des ox-LDL, qui ont des effets délétères sur leurs fonctions.²³⁴ Les niveaux élevés de stress oxydatif inhibent la prolifération et induisent l'apoptose et la sénescence de ces cellules,^{234, 237} et ce par la désactivation de la voie signalétique PI3K/Akt.²³⁸ D'autre part, une activité réduite et altérée d'eNOS, menant à une biodisponibilité réduite du NO, entraîne une réduction de la mobilisation et du recrutement des EPCs¹⁹⁰ et

promeut leur sénescence.^{183, 186, 187} De plus, le stress oxydatif semble réguler négativement les niveaux des nucléotides cycliques, plus particulièrement le cGMP dans les EPCs, limitant ainsi leur potentiel régénératif.²³⁹ Or, une approche thérapeutique serait d'augmenter le renouvellement de ces nucléotides.²³⁹ En effet, des études ont récemment postulé que la protéine kinase activée par l'AMP pourrait induire l'activité de la manganèse superoxide dismutase («*Manganese Superoxide Dismutase*», MnSOD), qui est un enzyme responsable de la réduction du stress oxydatif,²⁴⁰ et inhibe la dérégulation d'eNOS²⁴¹ résultant en l'inhibition de la dysfonction et de l'apoptose des «*early*» EPCs.

1.10.8 Autres facteurs

Plusieurs autres facteurs ont une influence considérable sur le nombre et la fonction des EPCs,⁷⁰ tels que la CRP²⁴², la troponine,²⁴³ le NT-proBNP («*N-terminal pro-brain-type natriuretic peptide*»),²⁴⁴⁻²⁴⁶ et l'homocystéine²⁴⁷. Le CRP bloque l'eNOS,^{160, 248} inhibe la sécrétion pro-angiogénique de l'IL-8,¹⁶¹ altère la fonction angiogénique des EPCs,²⁴⁹ induit l'apoptose de ces cellules²⁴⁸ et contribue à l'inflammation et à l'athérogenèse.^{250, 251} D'autre part, les niveaux élevés de NT-proBNP corrént avec les niveaux faibles des «*early*» EPCs,^{246, 252} possiblement reliés à l'exhaustion de la mobilisation de ces cellules à partir de la moelle osseuse.²⁴⁶ De plus, les niveaux élevés de l'homocystéine sont associés au nombre et à la différenciation réduites des EPCs chez les patients qui souffrent des maladies de l'artère coronaire.²⁵³ Le nombre réduit des «*early*» EPCs est dû à l'apoptose de ces cellules par un mécanisme impliquant la caspase-3^{254, 255} et une activité télomérique réduite.²⁵⁶

1.11 Le rôle des EPCs dans les maladies cardiovasculaires

Le rôle de l'endothélium dans le système cardiovasculaire est de maintenir l'intégrité des vaisseaux en leur offrant une protection au niveau du tonus et de la perméabilité vasculaire. De plus, l'endothélium joue le rôle de «tapis» cellulaire bloquant l'infiltration de cellules inflammatoires et la prolifération des SMCs sous-jacentes qui contribuent à la formation du néointima. Suite à l'endommagement endothélial, la fonction de ce système est affaiblie résultant en une diminution de la production de substances vasodilatatrices et anti-thrombotiques induisant ainsi l'inflammation et la thrombose. La capacité des cellules endothéliales matures dans la régénération vasculaire est limitée. Or, l'importance des cellules progénitrices ayant un potentiel

régénératif est plus marquée. Depuis l'étude pionnière d'Asahara *et al.* en 1997, l'emphase des recherches dans le domaine de la régénération vasculaire a été placée sur les EPCs. Bien que nous ayons discuté de la biologie des EPCs et des facteurs qui influencent leur fonction, la compréhension du rôle des EPCs, et, plus spécifiquement, de chaque sous-population d'EPCs, dans les processus menant aux maladies cardiovasculaires est essentielle au développement des approches thérapeutiques.

1.11.1 La réparation endothéliale

Le rôle des EPCs dans la réparation endothéliale est une des premières questions soulevées dans ce domaine. Des études ont rapporté que la sous-population des «*early*» EPCs contribue à la réparation endothéliale par la relâche des facteurs paracrines, permettant de maintenir l'intégrité des cellules endothéliales matures,²⁵⁷ alors que les «*late*» EPCs, ou ECFCs, sont les cellules prolifératives qui permettent la réendothélialisation et la formation de nouveaux tubes vasculaires (Figure 1.4).^{82, 258-260} Les «*late*» EPCs sont également plus appropriées comme cellules véhicules permettant le transfert des gènes et des facteurs angiogéniques.²⁶¹ Or, l'hétérogénéité des sous-populations d'EPCs pourrait contribuer de façon différentielle au potentiel régénératif de ces cellules.²⁶² De plus, une étude a démontré que les «*early*» EPCs dérivées de la rate améliorent la réendothélialisation et réduisent la formation du néointima dans un modèle d'endommagement endothélial de l'artère carotide.²⁶³ Dans un modèle d'endommagement endothélial par ballon, les EPCs circulantes accélèrent la réparation de l'endothélium et réduisent aussi l'activation des SMCs responsables de la formation du néointima.²⁶⁴ Le potentiel régénératif des EPCs se trouve aussi important au niveau des greffes vasculaires. La capacité de ces cellules progénitrices à domicilier aux greffes et aux stents et à induire la réendothélialisation est à la base de l'efficacité de ces approches thérapeutiques.²⁶⁵⁻²⁶⁸

Le potentiel des EPCs dans la réendothélialisation est important au niveau de plusieurs maladies cardiovasculaires et sera discuté plus en détail pour chaque condition pathophysiologique, telles que la thrombose, la resténose et l'athérosclérose.

1.11.2 La néovascularisation

La néovascularisation est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins aux sites de lésions vasculaires. Plusieurs études ont démontré que les EPCs ont un potentiel important dans

la régénération vasculaire.^{39, 40, 269} Depuis l'étude d'Asahara *et al.*, le potentiel de néovascularisation par les EPCs a premièrement été mis en évidence par Kalka *et al.* démontrant le potentiel important de la transplantation intraveineuse des EPCs chez les souris ischémiques immunodéficientes.³² D'ailleurs, cette étude a démontré 50% moins de nécrose chez les souris transplantées avec des EPCs. Par la suite, le potentiel régénératif des EPCs dans l'ischémie a été confirmé.²⁷⁰ La transplantation des EPCs contribue à la néovascularisation au niveau du myocarde ischémique et améliore la fonction réduite du ventricule gauche par l'inhibition de l'apoptose des cardiomyocytes.^{271, 272} Cependant, les EPCs sont impliqués dans les processus de néovascularisation physiologique et pathologique.^{195, 273}

Dans le domaine cardiovasculaire, les approches thérapeutiques visent à améliorer le potentiel de néovascularisation des EPCs.¹⁶⁸ Parmi ces approches, on note la modification génétique des EPCs. Entre autres, le transfert du gène VEGF permet d'améliorer le potentiel régénératif des EPCs et offre une plus grande efficacité thérapeutique.²⁶⁹ Des approches alternatives dans le domaine de la néovascularisation suggèrent qu'une co-culture de plusieurs types de cellules souches ou progénitrices serait plus efficace.^{80, 274}

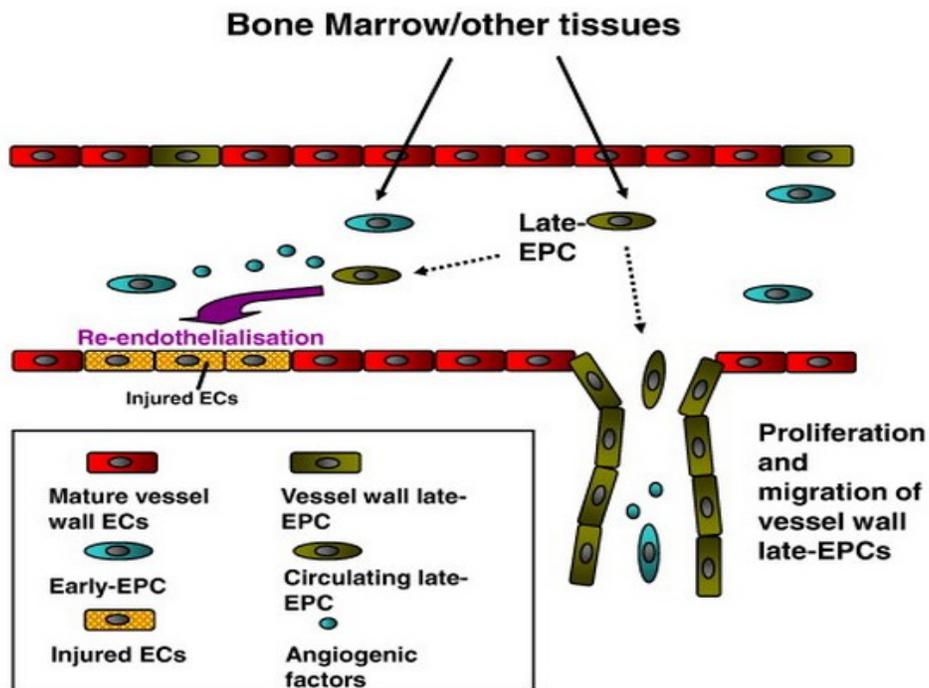


Figure 1.4: Modèle schématique de l'interaction entre les «early» et les «late» EPCs. «Early» et «late» EPCs sont relâchées de la moelle osseuse ou d'autres tissus pour initier la réparation vasculaire (réendothélialisation) ou la néovascularisation. Les «early» EPCs (en bleu), dérivées de cellules hématopoïétiques circulantes, présentent une capacité paracrine importante dans la modulation de la

réendothélialisation et de la formation de nouveaux vaisseaux par les «*late*» EPCs (en vert). Légende : Bone marrow/other tissues (moelles osseuse/autres tissus), injured ECs (cellules endothéliales endommagées), re-endothelialisation (réendothélialisation), proliferation and migration of vessel wall late-EPC (prolifération et migration des «*late*» EPCs dérivées de la paroi vasculaire), mature vessel wall ECs (cellules endothéliales matures de la paroi vasculaire), circulating late-EPCs («*late*» EPC circulantes), angiogenic factors (facteurs angiogéniques). Kirton et Xu. Endothelial precursors in vascular repair. *Microvasc Res.* 2010;79:193-199

1.11.3 L'inflammation

L'inflammation, caractérisée par une augmentation de facteurs inflammatoires, tels que le CRP^{160, 161, 242, 248-250, 275}, le TNF- α ^{163, 164}, l'ox-LDL^{200, 203}, l'angiotensine II^{155, 174, 192, 198}, l'homocystéine^{241, 247, 253-256} et le CD40L (qui sera discuté en détail dans le chapitre 4),²⁷⁶⁻²⁸⁵ est à la base de la dysfonction des EPCs menant à plusieurs maladies cardiovasculaires, dont l'athérosclérose, l'hypertension et le diabète.²⁸⁶ La fonction atténuée des EPCs sous des conditions inflammatoires est principalement dû à une augmentation du stress oxydatif. Les médiateurs pro-inflammatoires stimulent la production des protéines de phase aiguë et l'expression des molécules d'adhésion à la surface endothéliale menant ainsi à l'athérogenèse. Cependant, l'inflammation induit aussi la production de cytokines pro-angiogéniques, telles que le VEGF, G-CSF, IL-8 et SDF-1 α , impliquées dans le recrutement des EPCs. Par contre, leurs effets sont délétères en présence de niveaux élevés de médiateurs inflammatoires résultant ainsi en une déficience de la réparation endothéliale.²⁸⁷

Chez les individus sains, le CRP réduit la survie, la différenciation et le potentiel angiogénique des EPCs^{160, 249, 250, 275} par une dérégulation d'eNOS²⁴⁸ et de l'IL-8.¹⁶¹ De plus, le nombre et la fonction des «*early*» EPCs sont réduits en présence du TNF- α .^{162, 163} D'autre part, le stress oxydatif induit le recrutement des EPCs dont la fonction est altérée au niveau de leur mobilisation, migration, et différenciation.¹⁸² Le système rénine-angiotensine joue aussi un rôle dans le stress oxydatif et l'inflammation. En effet, l'angiotensine II dans accélère la sénescence des «*early*» EPCs en induisant un stress oxydatif via son récepteur angiotensine de type I.¹⁵⁵ Aussi, l'aldostérone atténue l'expression du récepteur VEGFR-2 et inhibe la génération des «*early*» EPCs par la voie signalétique de l'Akt.²⁸⁸

Une dérégulation de l'équilibre entre le NO et le stress oxydatif permet le développement de conditions pathophysiologiques. L'eNOS et la production de NO sont requises pour induire l'activité de la MMP-9, qui est responsable de la mobilisation des «*early*» EPCs.^{93, 236} Une

biodisponibilité réduite du NO résulte en des effets néfastes sur le nombre et la fonction des EPCs, particulièrement la fonction angiogénique des «*early*» EPCs.^{132, 196, 205, 229, 231, 234, 236, 289}

Une panoplie d'interventions a été considérée comme moyen thérapeutique permettant de réduire l'inflammation et le stress oxydatif résultant en une fonction accrue des EPCs. Parmi ces approches, on note l'utilisation des anti-inflammatoires et des antioxydants dont les ARBs, les β bloqueurs, les inhibiteurs de la CRP, les inhibiteurs du TNF, les inhibiteurs de la xanthine oxydase, les statines, les agonistes du PPAR γ et les estrogènes.^{124, 155, 164, 165, 167, 174, 206, 287}

1.11.4 La thrombose

La thrombose est caractérisée par la formation d'un caillot de sang qui résulte en l'obstruction d'un vaisseau sanguin (cette condition sera présentée plus en détails dans le chapitre 2 sur les plaquettes). Il a été démontré que la transplantation d'EPCs transfectées avec le gène VEGF-165 améliore leur potentiel de recanalisation du thrombus veineux.^{290, 291} De plus, la concentration de microparticules, relâchées par les cellules endothéliales apoptotiques induites par l'activation du plasminogène, est inversement proportionnelle au potentiel angiogénique des «*late*» EPCs.²⁹² Ces effets impliquent l'activation des MMPs, induisant ainsi la formation de nouveaux vaisseaux.²⁹² Ces cellules seraient une cible thérapeutique dans la réduction et l'inhibition de thrombus.^{117, 291, 293} Du point de vue thérapeutique, l'implantation de stents capteurs d'EPCs, plus particulièrement des «*late*» EPCs, est une approche importante qui vise à limiter la thrombogenicité et permettre la réendothélialisation.^{293, 294}

1.11.5 La resténose

La resténose est caractérisée par une réapparition d'une sténose, c'est-à-dire le rétrécissement des vaisseaux de grand calibre et des artères, suite à une intervention chirurgicale cardiaque, dont l'angioplastie et l'intervention coronarienne percutanée («*Percutaneous Coronary Intervention*», PCI), pour traiter les vaisseaux obstrués causés par la formation d'une plaque athéromateuse ou d'un thrombus. Ces approches sont couramment suivies par le placement d'un stent pour prévenir la rétraction du vaisseau. Cependant, on note un endommagement endothélial important suite à ces interventions et le placement de stents résulte en plusieurs complications post-chirurgicales, dont l'inflammation et la formation de néointima dues à la prolifération de SMCs résultant en l'hyperplasie. Les EPCs joueraient un rôle

protecteur suite à l'intervention chirurgicale permettant de régénérer un endothélium vasculaire fonctionnel.²⁶⁴ En effet, l'activation de la fonction des «*early*» EPCs par le cilostazol, un anti-plaquettaire, induit la réendothélialisation et inhibe la formation de néointima dans un modèle d'angioplastie par ballon chez les rats.²⁹⁵ C'est alors que l'intérêt de créer des stents capteurs ou enrobés d'EPCs est intéressant permettant de restaurer et de maintenir l'intégrité de la paroi vasculaire.^{267, 268, 294, 296-301} En effet, les stents recouverts d'anticorps contre VE-Cadhérine peuvent capter des EPCs et accélérer la réendothélialisation tout en inhibant la formation de néointima.²⁶⁷

Alors que les EPCs contribuent à la réendothélialisation et jouent un rôle protecteur contre la resténose, une récente étude suggère que les cellules CD34⁺ peuvent aussi se différencier en SMCs sous des conditions inflammatoires. Or, l'environnement ne permettrait pas à ces cellules de générer des cellules endothéliales et serait donc impliqué dans le développement de la resténose.^{302, 303} D'ailleurs, une étude a récemment démontré que chez les patients qui développent une resténose après une intervention coronarienne percutanée («*Percutaneous Coronary Intervention*», PCI) et suivant le placement d'un stent, le nombre d'EPCs est augmenté et contribue à l'artériogénèse.³⁰⁴ Il serait donc essentiel de bien étudier les conditions utilisées dans les approches thérapeutiques afin de favoriser la régénération de l'endothélium et restaurer son rôle protecteur. Des approches thérapeutiques de modification génétique des EPCs seraient un moyen important dans la réendothélialisation post-angioplastie et la prévention du développement d'une resténose. D'ailleurs, la surexpression d'eNOS améliore la fonction des «*early*» EPCs dans l'inhibition de l'hyperplasie néointimale en restaurant la fonction vasodilatatrice de l'endothélium.²⁸⁹

1.11.6 L'athérosclérose

L'athérosclérose est caractérisée par une infiltration de leucocytes, l'accumulation du cholestérol avec la formation de cellules spumeuses, la prolifération et l'accumulation des SMCs résultant en la formation du néointima.²⁶² L'activation et l'endommagement de l'endothélium induisent des lésions qui résultent en l'inflammation et la dysfonction endothéliale. Initialement, l'hypothèse était que les cellules endothéliales adjacentes prolifèrent pour réparer les lésions endothéliales. Par contre, des études plus récentes suggèrent que ce sont les cellules progénitrices qui sont recrutées aux sites de lésions vasculaires et s'incorporent pour réparer les lésions. Les

niveaux élevés de CRP, corrélés avec l'inflammation dans l'athérosclérose, dérèglent l'expression d'eNOS et promeuvent l'apoptose des «early» EPCs.²⁴⁸ Une étude a démontré que chez les souris athérosclérotiques ApoE^{-/-}, les EPCs s'incorporent directement au niveau de la lésion et contribuent à la régénération des cellules endothéliales au niveau des greffes vasculaires.^{232, 265} Un rôle important des EPCs est de limiter la progression de l'athérosclérose malgré la présence d'une lésion vasculaire. Par contre, plusieurs études ont réfuté ces résultats en suggérant que les EPCs ne contribuent pas à la réendothélialisation suite à la rupture d'une plaque athérosclérotique telle qu'observée chez des souris ApoE^{-/-}³⁰⁵ et que ces cellules pourraient même contribuer à induire davantage l'athérosclérose^{306, 307} ainsi que l'athérogenèse, par le recrutement des plaquettes^{113, 308} et des SMCs aux sites de lésions athérosclérotiques.³⁰⁹ Or, le rôle des EPCs dans l'athérosclérose demeure une question non résolue quant à l'effet bénéfique ou néfaste de ces cellules sous cette condition pathologique.²⁵⁸ Il a été suggéré que les EPCs protègent contre la formation des lésions dans les stades précoces du développement de l'athérosclérose mais que ces cellules peuvent aussi contribuer à l'exacerbation en étant impliquées dans l'athérogenèse aux stades avancés de cette maladie.²⁵⁸ Alors que les EPCs jouent un rôle athéro-protectif important par la régénération de l'endothélium, elles peuvent également participer à la progression de l'athérosclérose par leur potentiel angiogénique au niveau de la plaque. Nous allons discuter dans le chapitre 4 du rôle de la molécule inflammatoire CD40L au niveau du développement de l'athérosclérose et étudier dans ce projet de doctorat son rôle sur la fonction des EPCs.²⁷⁶⁻²⁸⁵

1.11.7 L'infarctus du myocarde

L'infarctus du myocarde est une des manifestations aiguës des maladies coronariennes caractérisé par la nécrose des cellules d'une partie du muscle cardiaque. Les événements post-infarctus peuvent générer une panoplie de complications, dont l'insuffisance cardiaque. Les effets induits par les EPCs seraient thérapeutiques et permettraient de régénérer un tissu endommagé. Une étude récente a démontré que les EPCs dérivées du cordon ombilical humain peuvent contribuer à sauver le cœur de rat suite à un infarctus du myocarde par l'amélioration de la fonction cardiaque et la réduction de la fibrose.³¹⁰ Plusieurs études ont démontré le rôle important des EPCs dans la néoangiogenèse et la perfusion du cœur post-infarctus.^{272, 311-313}

Les récentes approches thérapeutiques visent à utiliser des cellules souches ou progénitrices dérivées de la moelle osseuse afin de permettre la régénération du tissu et la néovascularisation. Entre autres, l'AVE9488, un amplificateur de la transcription d'eNOS, atténue le remodelage cardiaque et la dysfonction endothéliale chez les rats suite à l'infarctus du myocarde.³¹⁴ Plusieurs moyens de traitement ont également été envisagés afin de favoriser la fonction thérapeutique des EPCs. Une étude suggère que le blocage du CD18 au niveau des EPCs inhibe leur recrutement et leur fonction bénéfique chez des souris ayant subi un infarctus du myocarde. Le CD18 serait une cible thérapeutique permettant l'augmentation de la densité capillaire dans la zone infarctée et une réduction de la dilatation cardiaque et de la fibrose.¹²⁹ De plus, le «*priming*» des «*early*» EPCs avec des chimiokines, telle que le SDF-1 α , contribue à la néovascularogénèse et l'atténuation du remodelage ventriculaire, permettant ainsi de préserver la fonction ventriculaire dans un modèle de rat d'infarctus du myocarde.¹⁴¹ De plus, l'administration d'un peptide analogue de SDF-1 α a démontré des effets bénéfiques sur la migration des «*late*» EPCs et une fonction ventriculaire améliorée suite à l'infarctus du myocarde.¹³⁵ Alternativement, l'utilisation de l'estrogène, tel que l'estradiol, permettrait de préserver l'intégrité du tissu suite à l'ischémie telle qu'observée par l'augmentation de la mobilisation et de l'incorporation des «*early*» EPCs par une surexpression de la MMP-9 via la voie signalétique d'eNOS dans un modèle de souris post-infarctus.¹⁵⁷ Comme plusieurs maladies cardiovasculaires, la biodisponibilité du NO serait en cause de la progression de la maladie. Les statines seraient une approche importante qui permettrait d'améliorer la mobilisation des «*early*» EPCs et d'augmenter leur potentiel de néovascularisation myocardique résultant en la réduction de la dysfonction du ventricule gauche et de la fibrose.¹⁶⁷

1.11.8 L'insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque cause annuellement 10% des mortalités et est souvent manifestée suite à l'infarctus du myocarde.³¹⁴ La capacité à performer des activités quotidiennes est considérablement diminuée chez les patients souffrant de cette maladie.³¹⁴ La dysfonction endothéliale résulte en une perfusion myocardique réduite et une fonction ventriculaire altérée. Dans l'insuffisance cardiaque, cette dysfonction résulte d'un déséquilibre du NO et des ROS dû au stress oxydatif.³¹⁵ L'interaction des anions de superoxide avec le NO génère des radicaux libres, principalement le peroxynitrite (ONOO⁻), qui induisent davantage la dysfonction

endothéliale.³¹⁶ De plus, la biodisponibilité réduite du NO prédispose ces individus à l'activation et à l'agrégation plaquettaire impliquées dans les processus thromboemboliques de l'insuffisance cardiaque.³¹⁴ Dans les études cliniques, il a été rapporté que le nombre de «early» EPCs est réduit chez les patients souffrant de cette maladie, et ce possiblement dû à une augmentation des médiateurs pro-inflammatoires, tels que l'IL-1 β , l'IL-6, le TNF- α , le MCP-1, l'interféron- γ et le CRP, et à l'altération du recrutement, de la migration et du potentiel de néovascularisation de ces cellules.^{252, 316-318}

Les approches thérapeutiques utilisées chez les patients souffrant de l'insuffisance cardiaque visent à améliorer le nombre et la fonction des EPCs par plusieurs moyens, tels que l'exercice physique,^{54, 219, 223, 225, 319} le VEGF,¹⁰⁰ l'érythropoïétine,¹⁵³ les inhibiteurs de la xanthine oxydase, tel que l'allopurinol,³²⁰ et l'injection intra-coronaire d'EPCs.³²¹ D'autre part, l'administration des inhibiteurs des ACEs, des antagonistes de l'angiotensine et de l'aldostérone ainsi que des statines contribuent à réduire la dysfonction endothéliale par la restauration de la biodisponibilité du NO.^{124, 167, 206, 288}

1.12 Les effets des facteurs physiologiques et pathologiques sur les EPCs

Tableau 1.3 Effets des facteurs physiologiques et pathologiques sur les EPCs

<i>Facteurs</i>	<i>Effets sur les EPCs</i>	<i>Références</i>
Physiologiques :		
Exercice physique (ou mode de vie actif)	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Nombre des EPCs ↑ Mobilisation des EPCs ↑ Potentiel de formation de colonies des EPCs 	<ul style="list-style-type: none"> Rehman et al. (2004)³¹⁹ Tobler et al. (2010)²²² Witkowski et al. (2011)⁵⁴ Silva et al. (2012)²²⁵ Lenk et al. (2011)²¹⁸ Moebius-Winkler et al. (2011)²¹⁹ MacEaney et al. (2009)²²⁰
Vieillessement (> 60 ans)	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Nombre des EPCs ↓ Migration et prolifération des EPCs ↓ Production du VEGF et du NO ↑ Stress oxydatif ↓ Activité des télomérases 	<ul style="list-style-type: none"> Tao et al. (2006)²²⁶ Heiss et al. (2005)²²⁷ Hoetzer et al. (2007)²²³ Rauscher et al. (2003)²³² Cooke et al. (2002)²²⁹ Hoffmann et al. (2001)²³⁰ Mikirova et al. (2009)²³³ Qi et al. (2012)²³¹ Toda et al. (2012)³²² Thorin et al (2011)³²³ Kushner et al. (2011)³²⁴
Pathologiques :		
Diabète/hyperglycémie	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Mobilisation, domiciliation, migration 	<ul style="list-style-type: none"> Petrelli et al. (2012)¹⁸⁴ Kim et al. (2012)¹⁹⁰

	<p>et différenciation des EPCs ↓ Adhésion et prolifération des EPCs ↓ Potentiel d'incorporation des EPCs ↑ Stress oxydatif, endommagement de l'ADN, apoptose des EPCs ↑ Lipotoxicité</p>	<p>Tepper et al. (2002)¹⁸² Segal et al. (2006)¹⁸⁸ Loomans et al. (2004)¹⁸¹ Loomans et al. (2009)¹⁹¹ Chen et al. (2007)¹⁸⁶ Cubbon et al. (2009)¹⁸³ Hamed et al. (2011)¹⁸⁷</p>
Hypertension	<p>↓ Nombre des EPCs ↓ Production du NO ↑ Vasoconstriction ↑ Remodelage vasculaire</p>	<p>Van Zonneveld et al. (2006)¹⁹³ Giannotti et al. (2010)¹⁸⁰ Di Stefano et al. (2011)¹⁹⁴ Fadini et al. (2010)¹⁹⁵ Fadini et al. (2007)³²⁵</p>
Hyperlipidémie/ hypercholestérolémie	<p>↓ Fonction angiogénique des EPCs ↓ Différenciation, prolifération des EPCs ↑ ox-LDL et ROS ↓ eNOS ↑ Sénescence des EPCs</p>	<p>Imanishi et al. (2003)²⁰² Imanishi et al. (2004)²⁰³ Wang et al. (2004)²⁰⁰ Haddad et al. (2011)²⁰⁴ Ma et al. (2006)²⁰⁵ Chen et al. (2004)²⁰¹</p>
Tabagisme	<p>↓ Nombre et fonction des EPCs ↓ Propriétés antioxydants des EPCs ↑ ROS</p>	<p>Di Stefano et al. (2010)²⁰⁸ Ludwig et al. (2010)²⁰⁹ Michaud et al. (2006)²¹⁰ Kondo et al. (2004)²¹¹ Mayhan et al. (1996)²¹³ Neuntefl et al. (2002)²¹⁶ Mandraffino et al. (2010)²¹⁴ Puls et al. (2011)²¹⁷ Cardinale et al. (2012)²¹²</p>
Stress oxydatif	<p>↑ NADPH oxidase ↑ Apoptose des EPCs ↓ Mobilisation, recrutement et prolifération des EPCs ↓ eNOS</p>	<p>Thum et al. (2007)²³⁶ Chen et al. (2007)¹⁸⁶ Tousoulis et al. (2008)²⁸⁷ Cubbon et al. (2009)¹⁸³ Hamed et al. (2011)¹⁸⁷ Fleissner et al. (2011)²³⁴ Kim et al. (2012)¹⁹⁰ Tie et al.(2010)²³⁸</p>
Thrombose	<p>↑ Mobilisation des EPCs ↑ Vascularisation</p>	<p>Smadja et al. (2005)¹³⁴ Smadja et al. (2008)³²⁶ Lacroix et al. (2007)²⁹² Abou-Saleh et al. (2009)¹¹⁷ Jantzen et al. (2011)²⁹³ Yazdani et al. (2012)²⁹⁴</p>
Resténose	<p>↓ Nombre des EPCs ↓ Adhésion des EPCs ↓ Réendothélialisation</p>	<p>Zhao et al. (2008)³⁰² Inoue et al. (2011)³⁰³</p>
Inflammation	<p>↑ Nombre des EPCs</p>	<p>Tousoulis et al. (2008)²⁸⁷</p>

	↑ Recrutement des EPCs ↑ ROS	
Athérosclérose	↑ Inflammation ↑ Apoptose des EPCs ↓ Fonction des EPCs	Hu et al. (2003) ²⁶⁵ Rauscher et al. (2003) ²³² Hagensen et al. (2010) ³⁰⁵ Chen et al. (2012) ²⁴⁸
Infarctus du myocarde	↑ Nombre des EPCs	Kocher et al. (2001) ²⁷² Hu et al.(2009) ³¹⁰ Sekiguchi et al. (2009) ³¹¹
Insuffisance cardiaque	↓ Nombre des EPCs ↓ Recrutement, migration et potentiel angiogénique des EPCs ↑ Médiateurs inflammatoires	Valgimigli et al. (2004) ³¹⁸ Andreou et al. (2006) ³¹⁶ Michowitz et al. (2007) ²⁵²
Tumeurs	↑ Hypoxie, HIF-1 α , VEGF, SDF-1 α ↑ Recrutement et prolifération des EPCs	Chang et al. (2007) ¹⁷⁵ Kopp et al. (2006) ¹⁷⁶ Jiang et al. (2006) ¹⁷⁸ Li Calzi et al. (2010) ¹⁷⁷
Hormones :		
Estrogène	↓ Sénescence des EPCs ↑ Mobilisation des EPCs ↑ Réendothélialisation et néovascularisation	Imanishi et al. (2005) ^{154, 155} Iwakura et al. (2003) ¹⁵⁶ Iwakura et al. (2006) ¹⁵⁷ Aicher et al (2005) ⁶³
Érythropoïétine	↑ Différenciation des EPCs ↑ Mobilisation des EPCs	Bahlmann et al. (2004) ¹⁵³ Aicher et al. (2005) ⁶³
Angiotensine II	↓ Nombre des EPCs	Imanishi et al. (2005) ¹⁵⁵ Bahlmann et al. (2005) ¹⁷⁴ Endtmann et al. (2011) ¹⁹² Cacciatore et al. (2011) ¹⁹⁸
Aldostérone	↓ Différenciation des EPCs	Marumo et al. (2006) ²⁸⁸
Léptine	↓ Migration et potentiel angiogénique des EPCs	Wolk et al. (2005) ¹⁵⁹
Adiponectine	↑ Fonction des EPCs	Petrelli et al. (2012) ¹⁸⁴
Cytokines/chimiokines :		
G-CSF	↑ Mobilisation et différenciation des EPCs	Brugger et al. (1993) ³²⁷ Sato et al. (1993) ⁷⁸ Kong et al. (2004) ²⁶⁴ Jin et al. (2008) ⁶² Sovalat et al. (2011) ⁶⁷
SDF-1 α	↑ Mobilisation des EPCs ↑ Adhésion et différenciation des EPCs ↑ Fonction angiogénique des EPCs ↑ Fonction des EPCs	Heissig et al. (2002) ⁹² De Falco et al. (2004) ³²⁸ Jin et al. (2008) ⁶² Massberg et al. (2006) ¹¹² Stellos et al. (2008) ¹¹³ Stellos et al. (2009) ³²⁹ Zemani et al. (2008) ³³⁰ Frederick et al. (2010) ¹⁴¹

		Shen et al. (2011) ¹⁰⁷ Hiesinger et al. (2010) ¹³⁵ Petrelli et al. (2012) ¹⁸⁴
CRP	↓ Nombre, survie et potentiel angiogénique des EPCs ↓ eNOS ↓ Production de l'IL-8 ↑ Inflammation	Patel et al. (2001) ²⁷⁵ Verma et al. (2004) ¹⁶⁰ George et al. (2004) ²⁴² Suh et al. (2004) ²⁴⁹ Nan et al. (2009) ¹⁶¹ Chen et al. (2012) ²⁴⁸ Venugopal et al. (2005) ²⁵⁰ Devaraj et al. (2009) ²⁵¹
TNF- α	↓ Nombre des EPCs ↓ Adhésion, migration, prolifération et potentiel angiogénique des EPCs ↓ eNOS, iNOS, et la production du NO ↑ Sénescence des EPCs	Seeger et al. (2005) Chen et al. (2011) ¹⁶² Zhang et al. (2009) ¹⁶³ Xu et al. (2011) ¹⁶⁴
IL-8	↑ Fonction des EPCs	Petrelli et al. (2012) ¹⁸⁴
Facteurs de croissance :		
VEGF	↑ Mobilisation des EPCs ↑ Fonction des EPCs	Kalka et al. (2000) ¹⁰⁰ Aicher et al. (2005) ⁶³ Meng et al. (2010) ²⁹¹ Petrelli et al. (2012) ¹⁸⁴
Angiopoïétine-1 (Ang-1)	↑ Mobilisation des EPCs	Aicher et al. (2005) ⁶³
PDGF	↑ Différenciation des EPCs	Miyata et al. (2005) ¹⁴⁵
Médicaments :		
Statines (inhibiteurs de la HmG-CoA réductase) (e.g atorvastatin, rosuvastatin)	↑ Nombre des EPCs ↑ Mobilisation et différenciation des EPCs ↑ Production du NO ↓ Activité de caspase-3	Vasa et al. (2001) ¹⁶⁵ Dimmeler et al. (2001) ²⁰⁶ Walter et al. (2002) ¹²⁴ Landmesser et al. (2004) ¹⁶⁷ Urbich et al. (2005) ¹⁷¹ Spyridopoulos et al. (2004) ¹⁷⁰ Pirro et al. (2009) ¹⁶⁶ Cubbon et al. (2009) ¹⁸³ Wojakowski et al. (2012) ¹⁶⁹ Noor et al. (2007) ²⁰⁷
Inhibiteurs des ACEs (e.g. Ramipril)	↑ Nombre d'EPCs ↑ Relâche de VEGF ↓ Stress oxydatif	Werner et al. (2005) ¹⁷³ Bahlmann et al. (2005) ¹⁷⁴ van Zonneveld et al. (2006) ¹⁹³
Bloqueurs/antagonistes des récepteurs de l'angiotensine (e.g. olmesartan, ibesartan, telmisartan, valsartan)	↑ Nombre d'EPCs ↑ Relâche du VEGF ↓ Stress oxydatif	Werner et al. (2005) ¹⁷³ Bahlmann et al. (2005) ¹⁷⁴ Endtmann et al. (2011) ¹⁹²
Agonistes de PPAR γ (e.g. rosiglitazone)	↓ Activité de la caspase-3 et l'apoptose des EPCs ↑ Adhésion, migration, différenciation et	Xu et al. (2011) ¹⁶⁴ Dzau et al. (2005) ¹⁶⁸ Everaert et al. (2010) ¹³² Wojakowski et al. (2012) ¹⁶⁹

	prolifération des EPCs	
Anti-hypertenseurs	↑ Fonction des EPCs	Van Zonneveld et al. (2006) ¹⁹³ Cacciatore et al. (2011) ¹⁹⁸
Immunosuppresseurs (e.g. sirolimus (ou rapamycin) et cyclosporine)	↓ Adhésion, migration et prolifération des EPCs ↑ Apoptose des EPCs	Butzal et al. (2004) ¹⁷² Everaert et al. (2010) ¹³²
Inhibiteurs de xanthine oxydase (e.g. allopurinol)	↑ Nombre des EPCs ↑ Fonction des EPCs	Kelkar et al. (2011) ³²⁰
Anti-plaquettaires (e.g. cilostazol)	↑ Fonction des EPCs	Kawabe-Yoto et al. (2011) ²⁹⁵
Autres :		
NO	↑ Nombre des EPCs ↑ Mobilisation et prolifération des EPCs	Aicher et al. (2003) ⁹³ Aicher et al. (2005) ⁶³ Cooke et al. (2002) ²²⁹ Ozuyaman et al. (2005) ³³¹ Ma et al. (2006) ²⁰⁵ Watson et al. (2008) ¹⁹⁶ Thum et al. (2007) ²³⁶ Fleissner et al. (2011) ²³⁴ Cui et al. (2011) ²⁸⁹ Hoffmann et al. (2001) ²³⁰ Qi et al. (2012) ²³¹
PGI ₂ (Analogue : treprostinil)	↑ Nombre des EPCs ↑ Recrutement des EPCs ↑ Potentiel angiogénique des EPCs	Smadja et al. (2011) ³³² Kawabe et al. (2010) ¹²⁰
NT-pro-BNP	↓ Nombre des EPCs ↓ Mobilisation des EPCs	de Lemos et al. (2003) ²⁴⁴ Heeschen et al. (2004) ²⁴⁵ Michowitz et al. (2007) ²⁵² Surdacki et al. (2010) ²⁴⁶
Troponine	↓ Nombre des EPCs ↓ Mobilisation des EPCs	Apple et al. (1997) ²⁴³
Homocystéine	↓ Nombre des EPCs ↓ Prolifération et différenciation des EPCs ↑ Apoptose et sénescence des EPCs	Chen et al. (2004) ²⁴⁷ Zhu et al. (2006) ²⁵⁶ Alam et al. (2009) ²⁵⁴ Jia et al. (2011) ²⁴¹ Li et al. (2011) ²⁵⁵ Huang et al. (2011) ²⁵³
Antioxydants (e.g. benfotiamine)	↑ Fonction des EPCs	Petrelli et al. (2012) ¹⁸⁴

Légende : Nombre d'EPCs : compte d'EPCs en circulation; mobilisation des EPCs : augmentation des facteurs permettant la relâche des EPCs à partir de la moelle osseuse; prolifération des EPCs : nombre accru d'EPCs par une division cellulaire; recrutement des EPCs : EPCs ammenées au site d'endommagement ou de lésion en particulier; migration des EPCs : un mouvement d'EPCs à travers des cellules ou une matrice; réendothélialisation : réparation endothéliale; néovascularisation : formation de nouveaux vaisseaux; exercice physique : activité physique d'une durée déterminée ou comparaison entre un mode de vie actif versus sédentaire; vieillissement : individus âgés de plus de 60 ans. Inspiré de Everaert *et al.* (2010) Current perspective of pathophysiological and interventional effects on endothelial progenitor cell biology: Focus on PI3K/Akt/eNOS pathway. *Int J Cardiol.* 2010;144:350-366.

1.13 Les EPCs et la médecine régénérative

1.13.1 La thérapie cellulaire

Les recherches sur la biologie des EPCs suggèrent un potentiel intéressant de ces cellules dans la réparation endothéliale et la régénération vasculaire. Malgré les controverses sur la source, la nature et la fonction des EPCs, plusieurs études ont utilisé différentes sous-populations d'EPCs afin d'étudier leur potentiel thérapeutique. Dans l'ensemble des recherches, les EPCs présentent des résultats thérapeutiques considérables dans le domaine cardiovasculaire. La transplantation des EPCs et l'utilisation de ces cellules dans les greffes ont été les premières options thérapeutiques explorées. Par la suite, la thérapie génétique des EPCs a été une approche thérapeutique alternative.²⁶⁹ Malgré le but des études étant d'améliorer la fonction des EPCs *in vivo*, les approches utilisées ont généré des résultats qui présentent des limitations quant à leur application clinique.

Asahara *et al.* ont utilisé des cellules CD34⁺ dans des modèles d'ischémie périphérique de souris et de lapins afin de déterminer leurs propriétés angiogéniques *in vivo*. Cette étude a démontré que les cellules CD34⁺ injectées se localisent aux sites ischémiques et qu'après six semaines, elles s'incorporent dans les nouveaux capillaires formés.²⁶ Une étude par Kalka *et al.* a également démontré que les EPCs cultivées *in vitro* puis injectées chez les souris améliorent la néovascularisation.³² L'utilisation des EPCs *ex vivo*³³³ et *in vivo*²⁶⁶ dans les greffes prothétiques démontrent un potentiel d'endothélialisation important dans ces approches thérapeutiques. L'expansion *ex vivo* des EPCs en présence des facteurs induisant leur croissance, différenciation et prolifération est à la base de plusieurs études de transplantation et d'injection des EPCs.

De plus, le rôle de la composition des matrices extracellulaires sur la fonction des EPCs démontrent que ces cellules sont influencées par le support structurel qu'offrent ces matrices. En effet, des études ont démontré que les EPCs envahissent les matrices de collagène *in vivo* et que cette plateforme structurelle favorise la survie, l'adhésion et la différenciation des cellules progénitrices en cellules endothéliales matures.^{334, 335} D'autre part, une matrice de fibrine augmente la survie des «*early*» EPCs et la production de cytokines par ces cellules.³³⁶⁻³³⁸ Ces résultats ont suggéré une approche thérapeutique alternative permettant la transplantation des EPCs sur des matrices artificielles, qui portent des propriétés physiologiques de la matrice extracellulaire, et peuvent ainsi contribuer à la réparation endothéliale suite au placement de stents.⁹⁰ De plus, l'ingénierie des polymères artificiels, en incorporant des motifs RGD, est une

approche qui vise à améliorer le recrutement et l'adhésion des «late» EPCs, par l'association d'intégrines, et ainsi limiter la formation de néointima.^{297, 339} Ces approches offrent donc un environnement qui favorise les fonctions régénératives des EPCs.

Une alternative à la thérapie cellulaire utilisant les EPCs est l'approche génétique. La modification génétique des EPCs lors de leur expansion *ex vivo* serait un moyen d'offrir une fonctionnalité améliorée aux EPCs préalablement à leur infusion. Cette approche serait utile puisqu'elle limite la nécessité de sources tissulaires requises pour générer une quantité optimale d'EPCs *ex vivo*.²⁶⁹ Plus spécifiquement, la modification génétique permettrait de générer un nombre et un potentiel plus significatif des EPCs. Par exemple, le transfert du gène VEGF par adénovirus offrirait une capacité proliférative accrue des EPCs et une meilleure néovascularisation dans les tissus ischémiques.³⁴⁰ D'autre part, le transfert de gènes modifiés, tel que la télomérase humaine reverse transcriptase (hTERT), protège les EPCs de l'apoptose et favorise leur survie.³⁴¹ Alternativement, la protection des cellules du stress oxydatif présent dans plusieurs maladies cardiovasculaires, par la transfection du gène MnSOD, pourrait être une option thérapeutique qui vise à maintenir la survie et la fonction des cellules progénitrices.³⁴² Un domaine en expansion dans la recherche est l'utilisation de courts acides ribonucléiques («*micro RNA*», miRNA ou miR) comme cibles thérapeutiques dans la régulation de la fonction des EPCs.³⁴³ L'inhibition de certains miRs dé-régulateurs, tel que le miR-34 qui affecte négativement la fonction angiogénique et induit la sénescence des EPCs, serait une approche thérapeutique importante visant à préserver la survie et la fonctionnalité des EPCs.³⁴⁴ Alors que l'inhibition de certains miRs est bénéfique, la surexpression de d'autres miRs serait une autre approche qui vise à induire le potentiel angiogénique des cellules progénitrices. En effet, il a été démontré que le VEGF améliore la fonction angiogénique des cellules CD34⁺ en expansion *ex vivo* en augmentant l'expression de miR-210.³⁴⁵

1.13.2 Les études cliniques

L'application clinique des EPCs a pour but de permettre la réparation et la régénération vasculaire. Bien que les études cliniques aient été limitées dû aux controverses présentes dans le domaine de la recherche sur les cellules progénitrices quant à leur source, leur nature et leur fonction, on note trois approches cliniques impliquant les EPCs dans la thérapie des maladies cardiovasculaires: 1) l'intervention pharmacologique et l'altération du mode de vie; 2)

l'expansion des EPCs *ex vivo* et leur infusion dans les tissus ischémiques; et 3) la thérapie génétique des EPCs pour augmenter leur survie et leur production de cytokines.⁷⁰

Les interventions pharmacologiques et l'altération du mode de vie visent à améliorer le recrutement et la fonction des EPCs. L'administration d'hormones ou de facteurs, tels que l'érythropoïétine ou le G-CSF, résulte en la mobilisation endogène accrue des EPCs.^{70, 346} De même, l'administration à long terme d'agents pharmacologiques, tels que les statines, les agonistes de PPAR γ , les inhibiteurs des ACEs, et les ATRAs, contribuent également à la mobilisation des cellules progénitrices aux tissus ischémiques. D'autre part, des interventions impliquant des changements dans le mode de vie suggèrent une amélioration du nombre et de la fonction des EPCs. Entre autres, l'activité physique, une diète saine, le maintien d'un poids sain et la réduction du tabagisme sont des approches thérapeutiques qui ont fait le sujet de plusieurs études.⁷⁰

L'expansion des EPCs *ex vivo* et leur infusion en ciblant le tissu en question a aussi été une approche étudiée dans la thérapie cellulaire. Malgré les études animales extensives, l'optimisation de la culture des EPCs et les moyens de transplantation demeurent des limitations de cette approche dans le cadre clinique. Plus particulièrement, trois approches dans l'expansion des EPCs *ex vivo* ont été discutées : i) l'autogreffe, utilisant des cellules de la moelle osseuse ou du sang périphérique de l'individu en question. Cette approche peut aussi être combinée à un traitement pharmacologique; ii) l'allogreffe, par l'infusion de cellules provenant de la moelle osseuse, du sang périphérique ou du cordon ombilical d'un donneur à un récipient; et iii) le xenogreffe ou des cellules provenant d'une espèce autre que l'humain.⁷⁰ Des études ont démontré que l'infusion des EPCs suite à l'infarctus du myocarde améliore la fonction du ventricule gauche³⁴⁷ et offre une meilleure performance physique chez les patients souffrant de l'hypertension pulmonaire.³⁴⁸ La transplantation autologue des EPCs a également été bénéfique pour les patients souffrant de l'ischémie périphérique.^{349, 350} Cependant, Fadini *et al.* ont noté que les cellules dérivées de la moelle osseuse sont plus efficaces que les cellules circulantes en périphérie. De plus, l'injection intramusculaire est plus avantageuse que l'infusion intra-artérielle.^{68, 351}

Alternativement, la manipulation génétique des EPCs *ex vivo* offre un avantage dans le recrutement et la fonction des EPCs. La régulation des gènes responsables de la production de chimioattractants serait un moyen utile pour favoriser le recrutement des EPCs aux sites ciblés.⁷⁰

Kalka *et al.* ont démontré que le transfert du gène du VEGF augmente le nombre des EPCs circulantes chez les patients ischémiques.¹⁰⁰

1.12.3 Les limitations

Les avancements scientifiques dans le domaine de la recherche sur les EPCs et leur potentiel thérapeutique offrent des résultats encourageants et suggèrent une utilité intéressante de ces cellules dans le traitement de plusieurs maladies cardiovasculaires. Cependant, des questions importantes concernant la nature et la fonctionnalité des EPCs demeurent non résolues. Une meilleure compréhension de la biologie et de la fonction de ces cellules serait nécessaire avant d'élaborer davantage les applications cliniques. Étant des cellules souches ou progénitrices, les EPCs sont largement influencées par l'environnement dans lequel elles sont présentes. De plus, la fonction de ces cellules peut être altérée chez différents individus dépendamment de leur âge, de leur mode de vie et de leur état de santé. Ces facteurs doivent tous être considérés dans les études sur l'efficacité de la thérapie cellulaire utilisant des EPCs. L'environnement inflammatoire peut influencer les EPCs à plusieurs niveaux, tant dans leur différenciation que dans leur fonction. Jusqu'à présent, les études cliniques ne démontrent pas encore une efficacité considérable des EPCs comme thérapie puisque d'une part, les EPCs offrent une possibilité de régénérer des vaisseaux mais leurs fonctions peuvent également être entravées chez les patients présentant plusieurs facteurs de risque, particulièrement dans les maladies cardiovasculaires. Or, il serait nécessaire d'étudier davantage les EPCs quant au nombre, au type, au moyen et conditions d'administration, et à la transplantation de ces cellules afin d'optimiser les approches thérapeutiques utilisant les EPCs.

Chapitre 2

Les Plaquettes

2.1 Introduction

Le lien étroit qui existe entre l'inflammation et la coagulation est à la base de la progression des maladies cardiovasculaires, telle que l'athérosclérose.^{352,353} Les plaquettes sont des médiateurs primaires de l'athérogenèse puisque ces cellules interagissent avec les leucocytes, les cellules endothéliales et les cellules progénitrices dans la circulation, et stimulent leur activation. Ainsi, les plaquettes induisent la relâche de facteurs autocrines et paracrines contribuant aux processus de la coagulation et de la thrombose et à la progression d'événements inflammatoires, tel qu'observé dans l'athérosclérose et la resténose.³⁵⁴ Les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires contribuent à la déstabilisation et à la rupture ou à l'érosion des plaques athérosclérotiques résultant en une occlusion thrombotique vasculaire aux stades avancés de l'athérosclérose.^{352, 353} Le rôle des plaquettes a extensivement été étudié pour leur rôle physiologique et pathophysiologique dans divers processus et maladies : l'hémostase,³⁵⁵ la thrombose,³⁵⁶ l'inflammation,^{353, 354, 356, 357} l'immunologie,^{355, 358, 359} et plus récemment, leur rôle a également été décrit dans le domaine des maladies cardiovasculaires, tel que l'athérosclérose,^{353, 360, 361} et l'athérothrombose,³⁶²⁻³⁶⁴ et dans le domaine de l'oncologie.^{119, 365, 366} Dans ce chapitre, nous allons décrire l'origine, la biologie et l'activité des plaquettes afin de mieux cerner leur rôle dans la physiologie et la pathophysiologie vasculaire.

2.2 L'origine des plaquettes et que sont-elles?

Les plaquettes, aussi nommées les thrombocytes, ont initialement été caractérisées par Bizzozero en 1881 comme étant des cellules anucléées de petite taille (2-3 μm de diamètre) qui possèdent une forme irrégulière et circulent dans le sang. Les plaquettes sont des fragments cellulaires qui dérivent de précurseurs nommés les mégacaryocytes, qui sont des cellules générées à partir de lignées myéloïdes dérivées des HSCs, par un processus de thrombocytopoïèse dans la moelle osseuse. Les mégacaryocytes sont régénérés dans la moelle osseuse à un taux de 10^8 cellules par jour et chaque mégacaryocyte fragmenté peut produire 5 000 à 10 000 plaquettes. Ce processus est régulé par la thrombopoïétine, une hormone produite principalement par le foie, mais aussi par les reins, et qui est responsable de la différenciation et de la prolifération des mégacaryocytes, puis de la relâche des plaquettes.³⁶⁷ Chez les individus sains, on compte 150 à 400 $\times 10^9$ plaquettes par litre de sang. La survie des plaquettes est de cinq

à neuf jours en circulation. Après avoir joué leur rôle, les anciennes plaquettes sont détruites par les cellules Kupffer dans le foie et par phagocytose par les macrophages de la rate.

Les plaquettes sont des éléments cellulaires très spécialisés qui peuvent interagir avec d'autres cellules circulantes et vasculaires et sécréter plusieurs facteurs vasoactifs et de croissance. La fonction essentielle des plaquettes se doit principalement à leur anatomie. Ces cellules anucléées consistent en cinq compartiments principaux : la membrane cellulaire, les granules α , les granules denses, les granules lambda (aussi nommées les lysosomes) et le cytosquelette. La membrane plaquettaire permet les premiers contacts des plaquettes avec leur environnement par la présence de récepteurs et de molécules d'adhésion, plus particulièrement des glycoprotéines, qui régulent de manière importante l'activité plaquettaire déterminant ainsi leur rôle physiologique ou pathophysiologique. La membrane cellulaire et le cytosquelette des plaquettes sont principalement responsables du changement de forme plaquettaire suite à leur activation. La dynamique cellulaire et les signaux intracellulaires induits par l'activation des récepteurs transmembranaires, ancrés au cytosquelette, permettent la réorganisation du cytosquelette. Ceci résulte en un changement de forme des plaquettes par la formation d'une structure sphérique et l'extension des filopodes et lamellipodes, impliquées dans le processus d'étalement et d'adhésion plaquettaire.

Les plaquettes jouent un rôle essentiel dans l'hémostase vasculaire. En effet, celles-ci contribuent, par l'hémostase primaire, à limiter les saignements excessifs (hémorragies) lors de la rupture de vaisseaux sanguins. D'autre part, dans certaines conditions pathologiques, les plaquettes contribuent à la formation de caillots sanguins, par le processus de thrombose, qui est impliqué dans les maladies cardiovasculaires, telles que les accidents cérébro-vasculaires, l'infarctus du myocarde et l'embolisme pulmonaire, caractérisées par l'obstruction de vaisseaux sanguins.

Suite à une lésion vasculaire, un processus de déendothélialisation se produit, résultant en l'exposition de la matrice sous-endothéliale. L'adhésion et l'agrégation plaquettaire aux sites d'endommagement vasculaire constituent une étape importante dans le maintien de l'intégrité vasculaire et de l'hémostase. Particulièrement, l'interaction GPIb-vWF initie leur adhésion, suivi par des adhésions plus fermes engendrées par les intégrines β_1 ($\alpha_2\beta_1$ ou GPIa/IIa et $\alpha_5\beta_1$) et β_3 ($\alpha_{IIb}\beta_3$).³⁶⁸

Bien que les plaquettes soient physiologiquement très importantes, puisqu'elles permettent de maintenir l'hémostase vasculaire, celles-ci peuvent contribuer de façon pathophysiologique au développement de maladies vasculaires causées par la formation d'un thrombus, tel que l'athérombose et l'infarctus du myocarde.^{356, 369} Les plaquettes sont particulièrement impliquées dans ces maladies par leur potentiel occlusif suite à la formation d'un thrombus bloquant ainsi le flux sanguin requis pour maintenir l'intégrité vasculaire. L'embolisation des agrégats plaquettaires athérombotiques, la vasoconstriction vasculaire et l'exacerbation de l'environnement inflammatoire sont des conséquences du rôle pathophysiologique des plaquettes.^{363, 369}

Les plaquettes sont les médiateurs primaires de l'inflammation. Leur interaction avec les cellules inflammatoires, principalement avec les leucocytes par une interaction P-sélectine-dépendante, amplifie plusieurs réactions thrombo-inflammatoires. Suite à l'activation plaquettaire, une multitude d'événements intracellulaires contribuent à l'exocytose des granules et à la sécrétion de plusieurs médiateurs vasoactifs qui sont impliqués dans le développement d'un environnement pro-inflammatoire, tel qu'observé dans l'athérosclérose. Entre autres, on note la sérotonine, qui interagit avec la paroi vasculaire, permettant la prolifération des SMCs et affectant ainsi le caractère mitogénique des vaisseaux. De plus, la relâche de l'ADP et de l'ATP joue un rôle particulier dans le remodelage vasculaire favorisant le développement de l'athérosclérose et l'hypertension. D'autre part, la thromboxane A₂ (TXA₂), une molécule dérivée des phospholipides membranaires sous l'action des cyclooxygénases («*Cyclooxygenases*», COXs), est impliquée dans l'ischémie myocardique et induit la prolifération et la contraction des SMCs ainsi que la production des ROS résultant en l'exacerbation de l'environnement inflammatoire. Les chimiokines et les cytokines sécrétées par les plaquettes jouent un rôle essentiel dans le recrutement et l'interaction avec les leucocytes, les monocytes et les neutrophiles, permettant leur adhésion et leur accumulation aux sites inflammatoires.^{353, 354, 357,}

361

Les plaquettes sont impliquées dans l'exacerbation de l'inflammation dans l'athérosclérose par la formation d'un thrombus occlusif autour d'une plaque athéromotique.^{354, 361, 363, 369} En effet, les plaquettes jouent un rôle initial dans la progression de l'athérosclérose par les interactions que celles-ci portent avec les cellules endothéliales et les leucocytes.^{353, 357} L'interaction des plaquettes avec les monocytes transforme ces dernières en macrophages et

l'internalisation de phospholipides oxydées contribue à la formation des cellules spumeuses qui participent à l'environnement inflammatoire dans l'athérosclérose.³⁵³

Bien que le rôle des plaquettes ait été décrit principalement au niveau de l'hémostase et de la thrombose et, plus récemment, dans l'inflammation, des études ont exploré la fonction de ces cellules dans l'immunité par l'expression des molécules reliées à l'immunité, telles que le CD40L et les récepteurs ressemblant aux Tolls («*Toll-Like Receptors*», TLRs), dont TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR8 et TLR9, qui sont impliqués dans l'immunité innée.^{358, 359, 370} De plus, les plaquettes peuvent interagir avec les microorganismes, tels que les virus et les bactéries, par leurs antigènes.³⁵⁵ D'ailleurs, des études récentes suggèrent que les plaquettes lient l'immunité adaptative à l'immunité innée. En effet, l'expression de CD40L permet l'interaction des plaquettes avec les cellules T CD8⁺ stimulant ainsi l'immunité adaptative.³⁵⁸

Le rôle pathophysiologique des plaquettes dans plusieurs maladies se doit principalement à l'activité plaquettaire qui implique quatre processus: l'adhésion, l'activation, l'agrégation et la sécrétion plaquettaire.

2.3 L'activité plaquettaire

2.3.1 L'adhésion plaquettaire

L'activité plaquettaire est initiée par l'adhésion des plaquettes. Deux processus impliquent l'adhésion plaquettaire et sont engendrés par différents récepteurs : l'adhésion plaquettaire sur l'endothélium endommagé et l'adhésion sur la matrice sous-endothéliale exposée. L'adhésion plaquettaire se doit principalement à l'expression des récepteurs et des molécules d'adhésion membranaires qui permettent l'activation des plaquettes et leur interaction avec les autres plaquettes, les leucocytes, l'endothélium ou la matrice sous-endothéliale. On compte plusieurs types de récepteurs, dont les protéines à quatre domaines transmembranaires, les intégrines, les sélectines, les lectines, les immunoglobulines, les protéines riches en leucine, les sialomucines, les éphrines et les protéines de la famille du TNF et des récepteurs du TNF. Les sections qui suivent décrivent les molécules d'adhésion les plus importantes dans les réactions plaquettaires.

➤ GPIa/IIa

La GPIa/IIa, aussi nommée $\alpha_2\beta_1$, est le récepteur primaire de faible affinité dans l'adhésion des plaquettes aux fibres de collagène des vaisseaux endommagés. Ce récepteur est impliqué dans l'adhésion des plaquettes dans les conditions où les forces de cisaillements sont faibles et précède l'activation plaquettaire par les interactions du récepteur GPVI avec le collagène.³⁷¹ Les concentrations plasmatiques de vWF et des récepteurs GPIa/IIa exprimés sur les plaquettes sont corrélées avec l'adhésion des plaquettes aux collagènes de types I et III.³⁷² D'ailleurs, l'expression réduite de ce récepteur est associée à une adhésion plaquettaire réduite et une période de saignement prolongé.³⁷³ D'autre part, l'expression élevée de ce récepteur est associée au risque de l'infarctus du myocarde.³⁷⁴ L'activation de la GPIa/IIa induit l'activation de la phospholipase A_2 , responsable de la relâche de l'acide arachidonique qui est métabolisé par les enzymes COXs et la thromboxane synthétase pour générer la TxA_2 , un important activateur plaquettaire.³⁷²

➤ GPVI

Le récepteur GPVI, apparenté à la superfamille des immunoglobulines, est également une glycoprotéine et un récepteur spécifique du collagène.³⁷² Celui-ci contient deux domaines extracellulaires semblables à l'immunoglobuline, un domaine centrale semblable au mucin, un domaine transmembranaire et une petite queue cytoplasmique.^{372, 375} Ce récepteur est essentiel à l'adhésion et à l'activation plaquettaire. Une déficience de ce récepteur inhibe l'agrégation plaquettaire en présence de collagène de type I et III.³⁷⁶ Le récepteur GPVI forme un complexe avec la sous-unité $Fc\gamma$ de la membrane plaquettaire et induit l'activation plaquettaire par le collagène.^{371, 377}

➤ GPIV

La GPIV, aussi nommée CD36, est un récepteur plaquettaire du collagène moins important que les récepteurs GPIa/IIa et GPVI. La GPIV, qui lie la thrombospondine^{371, 378, 379} et les lipoprotéines oxydées,³⁷⁹⁻³⁸² est membre de la famille des protéines transmembranaires glycosylées et comporte structurellement deux domaines transmembranaires et une courte queue cytoplasmique.³⁸² Une étude récente a décrit le rôle important de ce récepteur dans les plaquettes servant comme récepteur détecteur du stress oxydatif et modulateur de la réactivité

plaquettaire induisant des signaux pro-thrombotiques dans l'hyperlipidémie.³⁸¹ D'ailleurs, ce récepteur a été considéré comme cible thérapeutique pour limiter l'hyperréactivité plaquettaire.³⁸¹

➤ GPIb/IX/V

Lors de l'exposition de la matrice sous-endothéliale, le collagène et le vWF aux sites de lésions vasculaires sont exposés au flux sanguin permettant l'adhésion initiale des plaquettes dans le processus de formation d'un thrombus. Les domaines A1 et A3 du vWF lient le collagène et interagissent avec les plaquettes par l'entremise du complexe GPIb/IX/V qui permet l'adhésion ferme des plaquettes à la matrice sous-endothéliale.^{371, 372} Ce récepteur est composé d'un complexe des glycoprotéines riches en leucine qui consiste en quatre sous-unités transmembranaires : GPIb α (CD42b), GPIb β (CD42c), GPIX (CD42a) et GPV (CD42d). Chaque sous-unité est composée de domaines extracellulaires riches en leucine, une région transmembranaire et une courte queue cytoplasmique.³⁷¹ Lorsque les forces de cisaillements sont élevées, le complexe GPIb/IX/V est responsable de l'adhésion plaquettaire au vWF exposé dans la matrice sous-endothéliale. D'ailleurs, il a été démontré que les interactions de ce récepteur avec le vWF sont nécessaires pour l'activation plaquettaire par le récepteur GPIIb/IIIa. Le complexe GPIb/IX/V est également impliqué dans le réarrangement du cytosquelette permettant l'étalement plaquettaire et la sécrétion résultant en leur agrégation. Le complexe GPIb/IX/V peut aussi lier la thrombine et contribuer à l'activation plaquettaire.³⁸³ De plus, ce complexe est impliqué dans le recrutement des leucocytes aux sites de lésions vasculaires, en liant le récepteur MAC-1 (CD11b/CD18) des leucocytes, et contribue à l'exacerbation de l'inflammation dans les maladies cardiovasculaires, telles que l'athérosclérose.³⁷¹ Par le même mécanisme que le récepteur GPVI, le complexe GPIb/IX/V induit des signalisations intracellulaires résultant en l'augmentation de la concentration de calcium entraînant ainsi l'activation plaquettaire suivi par la relâche de l'ADP par les granules denses. Par la suite, l'engagement de l'ADP à ses récepteurs P2Y₁ et P2Y₁₂ stimule l'activation de la GPIIb/IIIa et promeut l'agrégation plaquettaire.³⁸⁴ D'ailleurs, il est suggéré que l'inhibition de la GPIb des plaquettes est une approche thérapeutique anti-thrombotique importante permettant de limiter l'adhésion plaquettaire et la formation de thrombus.³⁸⁵

➤ GPIIb/IIIa

La GPIIb/IIIa, aussi nommée $\alpha_{IIb}\beta_3$, lie plusieurs ligands, dont le fibrinogène, la fibronectine, le vWF, la vitronectine, la thrombospondine, le collagène et la molécule-1 d'adhésion cellulaire des plaquettes et de l'endothélium («*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*», PECAM-1), et est principalement responsable des étapes de l'activation et de l'agrégation plaquettaire puisqu'elle est le récepteur le plus abondamment exprimé au niveau des plaquettes.³⁶⁸ La GPIIb/IIIa est particulièrement impliquée à l'étape de l'agrégation plaquettaire et permet des contacts intra-plaquettaires étroits. Ce récepteur est un complexe hétérodimérique composé de deux sous-unités, GPIIb (α_{IIb}) et GPIIIa (β_3). La sous-unité GPIIb est caractérisée par son domaine extracellulaire qui comprend quatre sites de liaisons pour les cations divalents, principalement le calcium. En état de repos, la GPIIb/IIIa joue le rôle de récepteur à faible affinité. Par contre, lors de l'exposition de la matrice sous-endothéliale suite à une lésion vasculaire, l'activation de ce récepteur est observée via l'activation initiale de récepteurs adhésifs et la relâche d'une multitude de facteurs activateurs et de seconds messagers intracellulaires plaquettaires. Ces messagers peuvent, à leur tour, induire des changements de conformation et l'association des deux domaines intracellulaires du récepteur GPIIb/IIIa. Les événements intracellulaires sont alors transmis à des changements résultant en l'augmentation de l'affinité extracellulaire de ce récepteur aux ligands, ainsi favorisant davantage l'adhésion. Les plaquettes sont caractérisées par leur signalisation bidirectionnelle.¹⁰⁴ En effet, suite à l'activation plaquettaire, l'ADP relâché stimule les plaquettes à proximité par les récepteurs purinergiques de celui-ci, P2Y₁ et P2Y₁₂. Ceci résulte en une signalisation transmise par ces récepteurs au domaine intracellulaire cytoplasmique du récepteur GPIIb/IIIa, c'est-à-dire une signalisation «*outside-in*», puis retransmise au domaine extracellulaire de ce même récepteur GPIIb/IIIa, induisant une signalisation «*inside-out*» résultant en un changement de conformation de ce domaine permettant ainsi de lier son ligand, le fibrinogène. Les récepteurs GPIIb/IIIa sur deux plaquettes forment des ponts disulfures liant spécifiquement le motif RGD du fibrinogène.

➤ P-sélectine

La P-sélectine, aussi nommée CD62P, est exprimée sur les cellules endothéliales, et les plaquettes activées. Cette molécule d'adhésion fait partie de la famille des sélectines, qui

comprend également la L-sélectine, exprimée sur les leucocytes, et l'E-sélectine, exprimée sur les cellules endothéliales activées et dérivées des corps Weibel-Palade.^{361, 369} Les sélectines partagent une structure semblable qui comprend, au terminal N, un domaine lectine calcium-dépendant, puis un domaine ressemblant au EGF, des régions consensus semblables au CRP («*Complement Regulator Protein*», CRP), ancrés à un domaine transmembranaire.³⁸⁶ La P-sélectine se retrouve dans les granules α des plaquettes puis elle est transloquée à la membrane cellulaire suite à l'activation plaquettaire par la fusion des membranes des granules avec la membrane plasmique. On compte environ 10 000 molécules de P-sélectine par plaquette activée.³⁸⁶ Pour interagir avec les leucocytes, la P-sélectine lie son ligand, une glycoprotéine de la famille des sialomucines, telle que le PSGL-1, exprimé au niveau des leucocytes et induit l'activation de ces dernières.^{369, 387, 388} Il a été suggéré que la P-sélectine est responsable de l'activation de l'endothélium qui, à son tour, induit le recrutement et l'adhésion des leucocytes par l'expression de molécules d'adhésion à leur membrane, telles que 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 l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.^{369, 386} D'ailleurs, les patients diabétiques de type I démontrent une hyperréactivité plaquettaire et une inflammation chronique importante dues à l'augmentation de l'expression de la P-sélectine.³⁸⁹ Or, la P-sélectine est considérée une cible thérapeutique importante.³⁸⁶

L'adhésion plaquettaire sur l'endothélium

L'adhésion des plaquettes sur l'endothélium endommagé est une étape nécessaire dans le processus physiologique de l'hémostase. Lorsque l'endothélium est sain et fonctionnel, les plaquettes n'adhèrent pas sur l'endothélium puisque ce dernier joue un rôle protecteur des vaisseaux par la relâche d'agents anti-agrégants, tels que la PGI₂, le NO, qui est aussi nommé le facteur relaxant dérivé de l'endothélium («*Endothelium-Derived Relaxing Factor*», EDRF), et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium («*Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*», EDHF). L'endothélium endommagé perd sa capacité thromborésistante et ne peut plus produire ni sécréter ces facteurs anti-thrombotiques. Or, les plaquettes peuvent s'attacher puis rouler sur l'endothélium endommagé et activé, exprimant alors le récepteur P-sélectine, par l'entremise du complexe GPIb/IX/V. Les premiers contacts des plaquettes avec l'endothélium

sont des adhésions souples impliquant principalement la P-sélectine endothéliale et son ligand, le PSGL-1, au niveau des plaquettes.³⁹⁰ Les plaquettes activées expriment alors le récepteur GPIIb/IIIa et promeuvent l'activation et l'agrégation plaquettaire par l'interaction de ce récepteur avec son ligand, le fibrinogène déposé et lié au récepteur ICAM-1 de l'endothélium activé.³⁹¹⁻³⁹³ La modulation de l'environnement inflammatoire est initiée par les plaquettes activées qui sont impliquées dans le recrutement et l'adhésion des leucocytes aux sites d'endommagement endothélial. Cette étape du processus inflammatoire implique une multitude d'interactions plaquettes-leucocytes, dont la GPIIb, la molécule-2 d'adhésion intercellulaire («*InterCellular Adhesion Molecule-2*», ICAM-2) et la molécule-3 d'adhésion de jonction («*Junctional Adhesion Molecule-3*», JAM-3) plaquettaire avec le MAC-1 (CD11b/CD18) leucocytaire, ainsi que l'ICAM-2 plaquettaire avec l'antigène associé à la fonction des lymphocytes («*Lymphocyte Function-associated Antigen*», LFA-1) leucocytaire et la P-sélectine plaquettaire avec son ligand PSGL-1 exprimé sur les leucocytes (Figure 2.1).^{361, 369} De plus, l'endothélium activé exprime le vWF, qui est transloqué depuis les corps Weibel-Palade. L'interaction du complexe GPIIb plaquettaire avec le vWF endothélial permet l'adhésion ferme des plaquettes.³⁹⁴ D'autre part, la P-sélectine plaquettaire peut lier le PSGL-1 endothélial.³⁹⁵

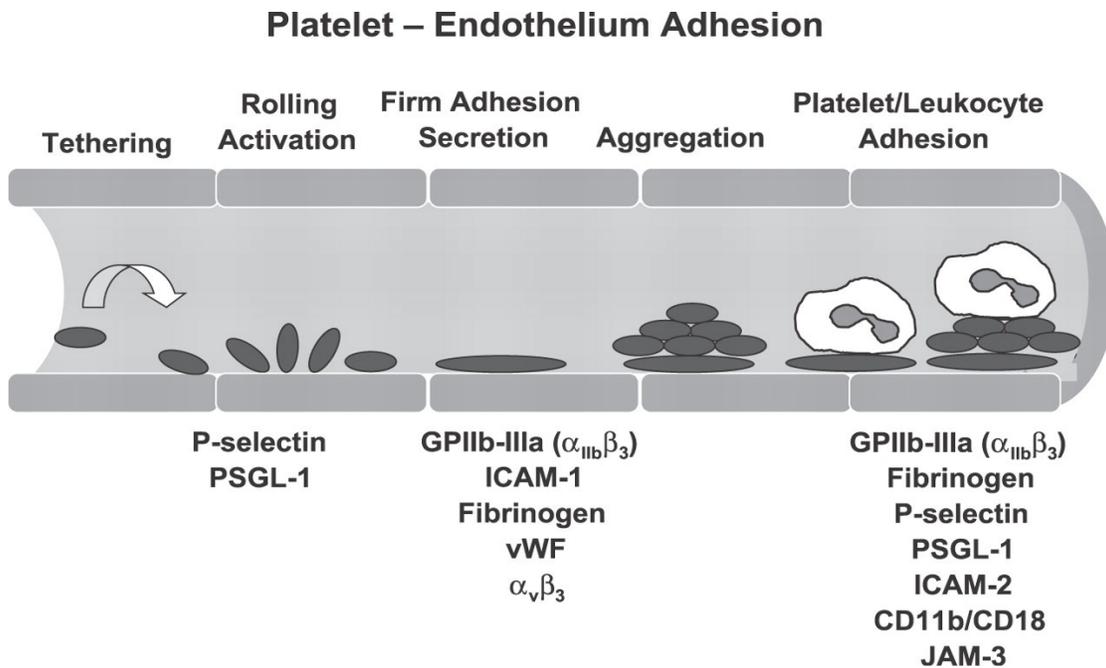


Figure 2.1 : Les étapes de l'adhésion des plaquettes sur l'endothélium activé et les récepteurs impliqués. Gawaz *et al.* Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res.* 2004;61:498-511

L'adhésion plaquettaire sur la matrice sous-endothéliale

Alors que les plaquettes peuvent interagir avec l'endothélium endommagé, ces cellules sont également impliquées au niveau des lésions vasculaires. Contrairement aux mécanismes décrits des interactions plaquettaires avec l'endothélium endommagé, les plaquettes jouent un rôle différentiel dans les lésions vasculaires par l'entremise de différents récepteurs qui se lient aux composantes de la matrice sous-endothéliale exposée. Tout d'abord, le vWF en circulation se lie au collagène exposé à la surface de la matrice sous-endothéliale. Le domaine A1 du vWF, alors immobilisé, permet l'association et l'interaction avec le récepteur GPIIb/IIIa des plaquettes.³⁷¹ D'autre part, le récepteur plaquettaire GPVI peut lier le collagène de la matrice sous-endothéliale. Malgré que ces interactions initiales soient essentielles au ralentissement des plaquettes en proximité des lésions vasculaires, elles demeurent souples et instables permettant encore la mobilité des plaquettes. La formation du complexe GPIIb/IX/V liant le vWF offre une résistance accrue aux grandes forces de cisaillement.³⁹⁶ De plus, la GPIIb/IIIa induit l'augmentation transitoire de calcium permettant l'activation de la GPIIb/IIIa, qui est requise pour stabiliser l'adhésion plaquettaire.³⁸⁴ Ces événements permettent davantage l'activation, la dégranulation et l'étalement des plaquettes induisant alors le recrutement d'autres plaquettes en circulation. Les interactions plaquette-plaquette sont engendrées par des ponts de fibrinogène suite à l'exposition de la GPIIb/IIIa à la surface des plaquettes ainsi que par la relâche de facteurs, tels que la TXA₂, l'ADP et la sérotonine, menant à l'agrégation plaquettaire.^{353, 354, 361} Ce sont les récepteurs plaquettaires GPIa/IIa, GPIV et GPVI, de haute affinité, qui sont alors responsables de l'adhésion ferme des plaquettes au collagène de la matrice sous-endothéliale exposée.³⁷¹ Ces adhésions fermes induisent l'activation plaquettaire et promeuvent le changement de conformation du récepteur GPIIb/IIIa plaquettaire, permettant le recrutement des plaquettes en proximité, par la formation de ponts de fibrinogène, et le changement de forme plaquettaire, par l'extension de filopodes et l'étalement des plaquettes au site de lésion vasculaire. La GPIIb/IIIa interagit avec la fibronectine, le collagène et le vWF alors que d'autres intégrines renforcent les interactions des plaquettes avec la matrice sous-endothéliale, telles que la GPIa/IIa ($\alpha_2\beta_1$), l' $\alpha_5\beta_1$, l' $\alpha_6\beta_1$ et l' $\alpha_v\beta_3$ qui lient le collagène, la fibronectine, la laminine et le vWF, respectivement.³⁹⁶ De plus, il est maintenant connu que des microparticules plaquettaires catalysent la formation de thrombine et de fibrine permettant de stabiliser davantage le thrombus (Figure 2.2).^{353, 369, 371}

Les mécanismes signalétiques de l'adhésion et de l'activation des plaquettes résultent en l'agrégation plaquettaire et la formation de thrombus. Semblablement à leur adhésion sur l'endothélium endommagé, les plaquettes peuvent interagir avec les leucocytes et développer un microenvironnement inflammatoire.

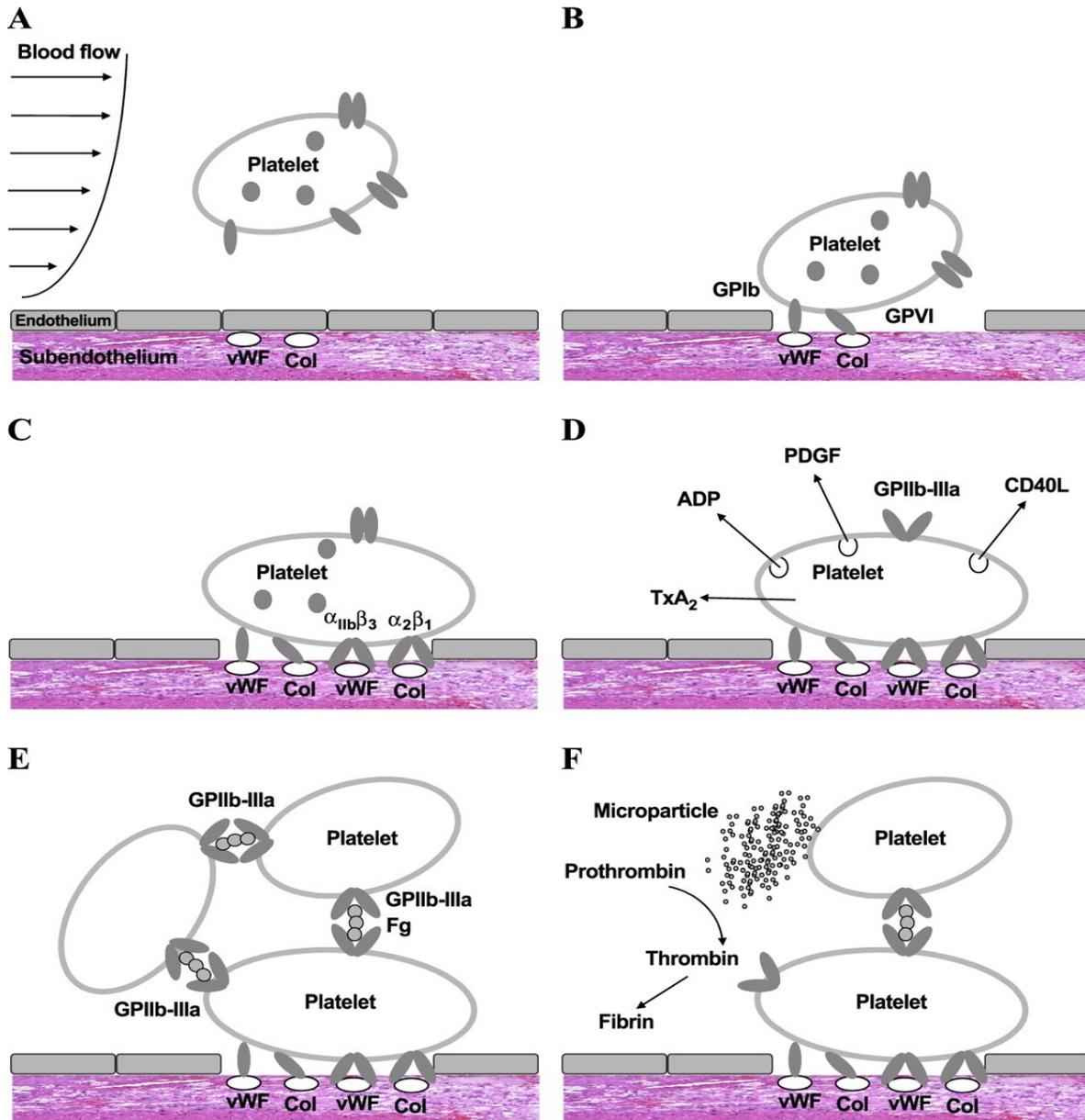


Figure 2.2 : Les étapes de l'adhésion des plaquettes sur la matrice sous-endothéliale exposée lors de la formation de thrombus au site de lésion vasculaire. A) En condition physiologique, les plaquettes n'interagissent pas avec l'endothélium. B) Aux sites de lésions vasculaires, les protéines de la matrice sous-endothéliale, telles que le vWF et le collagène, sont exposées au flux sanguin. Les plaquettes adhèrent de façon transitoire aux protéines sous-endothéliales via la GPIIb et la GPVI, respectivement. C) Ces adhésions souples induisent l'activation des plaquettes et des intégrines GPIIb/IIIa (récepteur de fibrinogène) et $\alpha_2\beta_1$ (récepteur de collagène) aux protéines de la matrice extracellulaire résultant en

l'adhésion ferme des plaquettes. D) Les plaquettes s'étalent sur la surface exposée et une dégranulation et une sécrétion de facteurs induisent le recrutement d'autres plaquettes en circulation. E) Les plaquettes forment des microagrégats par l'entremise de ponts de fibrinogène entre les récepteurs GPIIb/IIIa de deux plaquettes. F) La formation de microparticules aux sites d'agrégats plaquettaires stimule la génération de thrombine et de fibrine permettant la stabilisation du thrombus. Gawaz *et al.* Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res.* 2004;61:498-511

2.3.2 L'activation plaquettaire

Suite au processus de l'adhésion plaquettaire à l'endothélium endommagé ou à la matrice sous-endothéliale exposée en conséquence d'une lésion vasculaire, un processus d'activation plaquettaire est engendré induisant le changement de forme et l'étalement des plaquettes sur la surface endommagée. Dû aux réarrangements cytosquelettiques, les plaquettes discoïdes en circulation acquièrent une forme sphérique à partir de laquelle des filopodes sont saillants. L'activation plaquettaire induit des changements structurels, biologiques et fonctionnels importants au niveau des plaquettes par l'initiation et la progression de la réponse plaquettaire engendrée par le changement de forme, la sécrétion et l'agrégation plaquettaire qui contribuent à la formation d'un thrombus. Les plaquettes ont un système canaliculaire ouvert de la membrane plasmique, qui est une surface lisse constituée d'invaginations qui favorisent les échanges cellulaires, permettant l'incorporation de plusieurs facteurs impliqués dans l'activation et l'étalement plaquettaire.³⁹⁷ Les interactions des récepteurs plaquettaires avec leurs ligands se traduisent à des processus mécanistiques intracellulaires qui sont responsables de l'activation plaquettaire. Plus spécifiquement, les seconds messagers intracellulaires participent à plusieurs mécanismes permettant la propagation des signaux intracellulaires qui, par la suite, seront manifestés par des altérations de la forme et de la biologie des plaquettes. Entre autres, la génération de l'inositol 1,4,5-triphosphate («*Inositol 1,4,5-triphosphate*», IP₃) et du diacylglycérol («*Diacylglycerol*», DAG) par l'hydrolyse enzymatique phospholipase C (PLC)-dépendante des phospholipides transmembranaires. L'IP₃ induit la relâche et l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium qui, à son tour, active plusieurs enzymes qui régulent l'activité cellulaire. D'autre part, le DAG active la PKC, un enzyme largement impliquée dans l'activation, la sécrétion et l'agrégation plaquettaire.³⁶² L'hydrolyse enzymatique des phospholipides transmembranaires par la phospholipase A₂ (PLA₂) induit la synthèse de l'acide arachidonique, à partir duquel les prostaglandines sont générées grâce aux enzymes COXs. Par la suite, la thromboxane synthétase induit la transformation des prostaglandines en TXA₂, qui régule positivement le calcium intracellulaire induisant l'activation plaquettaire.³⁹⁸ L'activation

plaquettaire implique les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (G_q , G_{12}/G_{13} et G_i), tels que les récepteurs de la thrombine, PAR-1 et PAR-4, et les récepteurs de l'ADP, $P2Y_1$ et $P2Y_{12}$. L'activation des plaquettes via le récepteur $P2Y_1$ et $P2Y_{12}$ de l'ADP implique G_q et G_i , respectivement. L'activation des plaquettes via $P2Y_1$ induit initialement une augmentation des concentrations calciques intracellulaires et l'activation de $P2Y_{12}$ amplifie cette réponse en inhibant l'adénylate cyclase et en réduisant les niveaux de cAMP.^{362, 364}

2.3.3 La sécrétion plaquettaire

Suite aux signaux intracellulaires induits par l'activation plaquettaire, une augmentation des niveaux de plusieurs protéines, enzymes et seconds messagers intracellulaires entraîne la sécrétion d'une multitude de facteurs activateurs des plaquettes. Les granules cytoplasmiques fusionnent avec les membranes plasmiques pour relâcher ces facteurs, qui jouent un rôle autocrine et paracrine. Les granules plaquettaires sont impliquées à la fois dans les contacts plaquettaires et dans les contacts des plaquettes avec d'autres cellules par la relâche d'une multitude de facteurs dans leur environnement. Trois structures granulaires contenant ces facteurs se trouvent dans le cytoplasme des plaquettes : les granules α , les granules denses et les lysosomes (Tableau 2.1).

Les granules α sont les plus nombreuses, dix fois plus abondantes que les granules denses, et sont présentes à un taux de 50 à 80 par plaquette.³⁹⁹ Celles-ci contiennent les facteurs de croissance, tels que le VEGF, le PDGF, le FGF, l'IGF, le facteur de croissance des hépatocytes («*Hepatocyte Growth Factor*», HGF), le facteur de croissance épithélial («*Epithelial Growth Factor*», EGF), le facteur de croissance de transformation $\beta 1$ («*Transforming Growth Factor- $\beta 1$* », TGF- $\beta 1$), ainsi que la fibronectine, le fibrinogène et le vWF. Ces granules contiennent les facteurs de coagulation, dont les facteurs V et XI, le plasminogène et l'inhibiteur 1 de l'activateur du plasminogène («*Plasminogen Activator Inhibitor-1*», PAI-1). De plus, elles contiennent les facteurs semblables aux cytokines, tels que la thromboglobuline β , l'IL-1 β et le CD40L, et les chimiokines, telles que le facteur 4 des plaquettes («*Platelet Factor 4*», PF4), le facteur régulé dans l'activation des cellules T normales exprimées et sécrétées («*Regulated upon Activation and Normal T cell Expressed and Secreted*», RANTES), l'IL-8, le SDF-1 α , le MCP-1 et le MIP-1 α .^{354, 357, 361, 400-405}

Les granules denses sont impliqués dans l'activation plaquettaire par la relâche de petites molécules, telles que l'ADP, l'ATP, la sérotonine et le calcium, qui agissent comme activateurs des plaquettes en proximité.^{357, 361, 362} Ces facteurs et médiateurs secondaires servent davantage à l'activation et à l'amplification des réactions plaquettaires.

D'autre part, les granules lambda sont principalement des structures lysosomales contenant des enzymes hydrolytiques impliqués dans la dégradation protéique des plaquettes.⁴⁰⁶

Tableau 2.1 : Médiateurs plaquettaires bioactifs dans l'athéromatose

Localisation	Molécule relâchée	Cible	Fonction
Granules denses			
	ADP	Récepteur P2Y ₁ et P2Y ₁₂ (plaquettes)	Activation plaquettaire
	ATP	Récepteur P2X ₁ (plaquettes)	Activation plaquettaire
	5-HT (sérotonine)	Plaquettes Cellules endothéliales Monocytes SMCs	Faible agoniste plaquettaire, Induit la synthèse de NO par les cellules endothéliales, Vasoconstriction des SMCs
Granules α			
Récepteur d'adhésion	GPIIb/IIIa	Plaquettes	Agrégation plaquettaire Adhésion plaquette-leucocyte et plaquette-cellules endothéliales
Facteur de coagulation	Facteur V	Plaquettes	Facteur pro-coagulant
Ligands d'adhésion	vWF	Plaquettes	Agrégation plaquettaire Attachement des plaquettes à l'endothélium et à la paroi vasculaire
	Fibrinogène	Plaquettes	Agrégation plaquettaire, formation de caillot de fibrine, adhésion plaquette-leucocyte
	Fibronectine	Plaquettes	Adhésion plaquette-leucocyte et plaquette-endothélium
	P-sélectine	Récepteur PSGL-1 (Plaquettes, leucocytes, cellules endothéliales)	Adhésion plaquette-leucocyte, plaquette-cellule endothéliale, leucocyte-cellule endothéliale
Chimiokines	CXCL-4 (PF4)	Leucocytes	Synergie avec d'autres cytokines, promeut l'adhésion des leucocytes et la différenciation des monocytes

	CXCL7	Leucocytes	Adhésion des neutrophiles et des monocytes et transmigration endothéliale des neutrophiles
	RANTES (CCL5)	Cellules endothéliales, leucocytes	Adhésion des monocytes à l'endothélium et synthèse de chimiokines
Facteurs de croissance	PDGF	SMCs	Prolifération et migration des SMCs (hyperplasie)
Cytokine synthétisée	IL-1 β	Cellules endothéliales	Induit l'expression des molécules d'adhésion leucocytaires et la relâche de cytokines pro-inflammatoires par les cellules endothéliales
Granules α et membrane plaquettaire			
	CD40 Ligand (CD40L)	Récepteur CD40 (cellules endothéliales)	Induit l'expression des molécules d'adhésion leucocytaires et la relâche de cytokines pro-inflammatoires par les cellules endothéliales
Lipides pro-inflammatoires	TXA ₂	Plaquettes	Activation plaquettaire
	Leukotriene B ₄	Leucocytes	Chimioattractant, promeut la différenciation des monocytes en cellules spumeuses, activation des neutrophiles
	PAF	Plaquettes/leucocytes	Agoniste plaquettaire, promeut l'adhésion des neutrophiles

Inspiré de Kaplan *et al.* The role of platelets in atherothrombosis. *Hematology / American Society of Hematology. Education Program.* 2011;2011:51-61

2.2.4 L'agrégation plaquettaire

L'agrégation plaquettaire est un processus important dans la régulation physiologique de l'hémostase. D'autre part, les plaquettes contribuent à la formation d'un thrombus aux sites de lésions vasculaires. D'ailleurs, la thrombose a été corrélée avec l'incidence de l'athérosclérose, de la resténose, et de l'infarctus du myocarde. L'adhésion plaquettaire aux sites thrombogéniques induit leur activation suivie de la relâche de facteurs résultant en l'agrégation plaquettaire. Le récepteur principal de l'agrégation plaquettaire est le GPIIb/IIIa, exprimé suite à l'activation d'une plaquette, qui démontre une haute affinité pour le fibrinogène et le vWF soluble. Ce récepteur, caractérisé par sa signalisation «*inside-out*» impliquant des changements de conformation des sous-unités cytoplasmiques, permet la formation de ponts de fibrinogène inter-plaquettaires, une étape essentielle dans la formation d'agrégats plaquettaires. Les mécanismes

signalétiques intracellulaires induisant le changement de conformation du récepteur GPIIb/IIIa dépendent largement de l'agoniste utilisé. Par exemple, la thrombine et l'ADP impliquent l'activation des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques et, par la suite, de la PKC, qui phosphoryle les résidus sérines et thréonines de la sous-unité β des récepteurs.^{398, 407, 408} L'association des sous-unités cytoplasmiques du récepteur GPIIb/IIIa induit une signalisation «*inside-out*» qui est suivie par une signalisation «*outside-in*», suite à la formation de ponts de fibrinogène, induisant la sécrétion granulaire et le réarrangement cytosquelettique.

Les mécanismes signalétiques intracellulaires engendrent l'activation plaquettaire. Les agonistes des récepteurs plaquettaires tels que la TXA₂, l'ADP, la thrombine et le collagène induisent l'agrégation plaquettaire par une cascade signalétique qui augmente les niveaux de calcium intracellulaires. Ces molécules vasoactives contribuent à l'activation plaquettaire en liant des récepteurs spécifiques à la surface des plaquettes. Il est suggéré que les récepteurs qui sont caractérisés par leur motif tyrosine, contenu dans leur séquence ITAM («*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*»), tels que la GPVI, un récepteur du collagène requis pour induire les fonctions plaquettaires, et la GPIIb/IIIa, sont phosphorylés par des membres de la famille des Src kinase, tels que Fyn et Lyn, à la région β_3 du récepteur.³⁸⁴ La chaîne FcR γ est essentielle à l'activation du récepteur GPVI, qui contient des séquences ou des motifs pour lier la calmoduline et un domaine SH3 de la famille des kinases Src. Chaque domaine FcR γ contient une copie du motif ITAM qui est phosphorylé sur deux tyrosines conservées lorsque l'agoniste lie son récepteur, initiant alors l'association et la phosphorylation de la tyrosine kinase Syk qui induit, à son tour, des mécanismes signalétiques en aval. Deux kinases de la famille des Src kinases, Fyn et Lyn, jouent des rôles fondamentaux dans cette signalisation. L'activation de l'intégrine GPIIb/IIIa active les kinases Src induisant la phosphorylation de tyrosine sur PLC γ 2. Cette activation est impliquée dans la formation de lamellipodes plaquettaires. Or, ces deux classes de récepteurs membranaires signalisent via l'activation des Src et Syk tyrosines kinases.³⁷⁵ Les tyrosines kinases, qui sont des molécules adaptatrices, permettent la liaison et l'activation de molécules signalétiques intracellulaires, dont la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) puis la PLC menant à un influx de calcium et l'activation de la PKC. Une étude a démontré que la stimulation de PAR-1 par la thrombine active également la Src dans les plaquettes humaines via l'activation de la PLC et de la PKC.⁴⁰⁹ De plus, les microparticules plaquettaires peuvent

induire la formation de thrombine et de fibrine permettant d'augmenter l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettaire et de stabiliser le thrombus.^{353, 369, 371}

Au cours des dernières années, plusieurs mécanismes signalétiques plaquettaires ont été ciblés afin d'altérer ou d'inhiber la fonction plaquettaire (Figure 2.3). Entre autres, on note l'aspirine, qui inhibe la synthèse de la TXA₂ en induisant une acétylation irréversible des enzymes COXs. De plus, les thienopyridines, tels que le clopidogrel, la ticlopidine, et le prasugrel, inhibent la voie signalétique de l'ADP bloquant ainsi la réponse agrégante des plaquettes et sont maintenant largement utilisés pour prévenir la thrombose. Le cilostazol est un inhibiteur des phosphodiésterases jouant un rôle dans l'inhibition de l'agrégation plaquettaire et promouvant la vasodilatation, alors que les dipyridamoles sont des agents vasodilatateurs qui inhibent l'activité de la cGMP phosphodiésterase ainsi que l'accumulation de l'adénosine, ce qui résulte en l'inhibition de la fonction plaquettaire.^{363, 410, 411} D'autre part, le récepteur GPIIb/IIIa a été étudié comme cible thérapeutique afin de limiter la réactivité thrombotique des plaquettes. Une approche thérapeutique entamée était de bloquer les liens formés entre le fibrinogène et le récepteur GPIIb/IIIa à l'aide d'un anticorps monoclonal murin, nommé Abciximab, afin d'inhiber l'agrégation plaquettaire. Alternativement, des peptides, tels que l'éptifibatide et le tirofiban, semblables à la séquence RGD, présents sur le fibrinogène et reconnus par le récepteur GPIIb/IIIa, ont également été considérés et démontrés efficaces comme approche pour inhiber la liaison de ce récepteur à son ligand naturel et réduire l'incidence d'agrégation plaquettaire.³⁶³

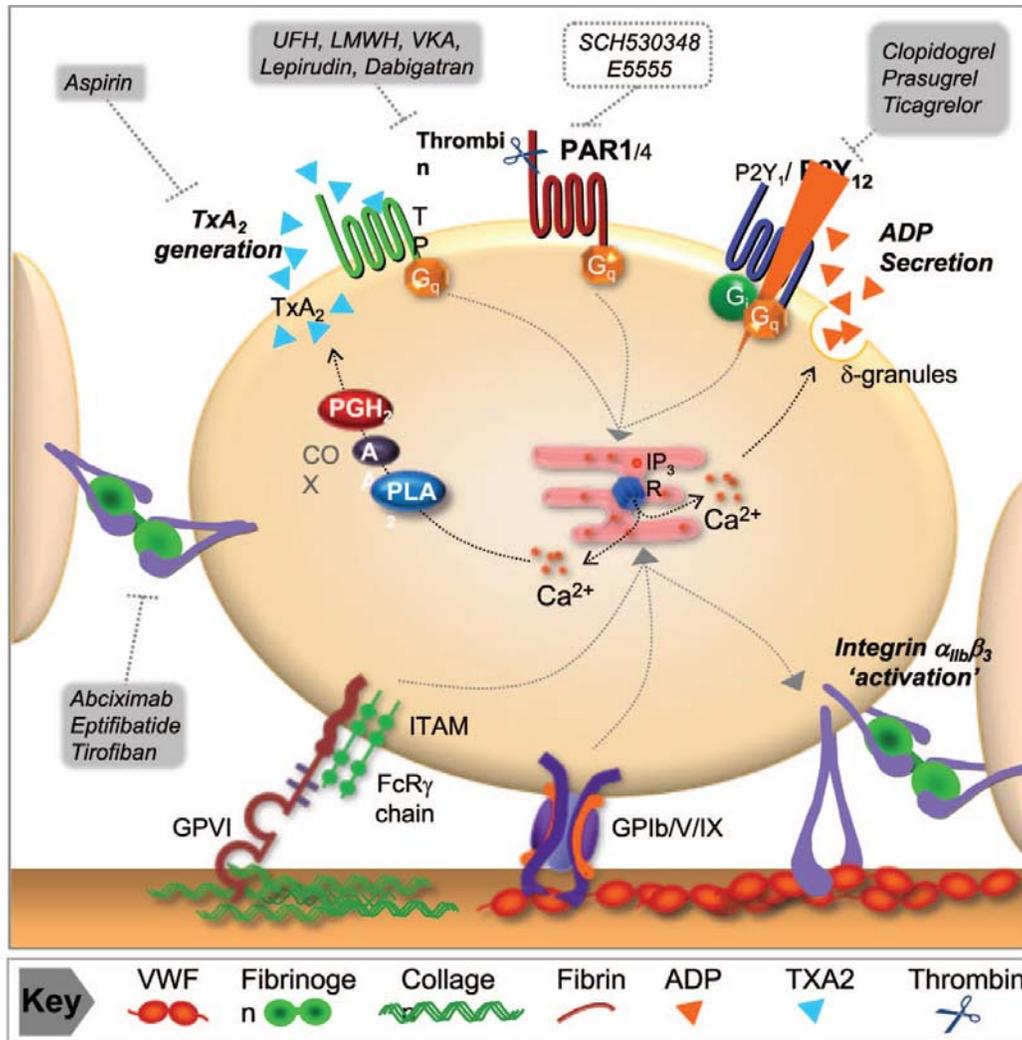


Figure 2.3: Les récepteurs plaquettaires ciblés dans la thérapie. Kaplan *et al.* The role of platelets in atherothrombosis. *Hematology / American Society of Hematology. Education Program.* 2011;2011:51-61

2.4 L'implication des plaquettes dans la thrombose

2.4.1 Les interactions des plaquettes avec les cellules sanguines

Les interactions des plaquettes avec les autres cellules sanguines, particulièrement les leucocytes, offrent un microenvironnement inflammatoire qui contribue à l'athérogenèse dans plusieurs maladies cardiovasculaires, telles que l'athérosclérose, l'athérombose, l'infarctus du myocarde et la resténose.

Les plaquettes adhérentes et activées sur la surface de l'endothélium endommagé ou sur la matrice sous-endothéliale exposée lors des lésions vasculaires peuvent participer au recrutement

des leucocytes et ainsi exacerber les processus inflammatoires impliqués dans le développement de plusieurs manifestations cardiovasculaires.³⁶⁹ Suite à l'activation plaquettaire, la P-sélectine est transloquée des granules α à la membrane plasmique des plaquettes permettant leur interaction avec les leucocytes circulants dans le sang. Elle est exprimée à la surface des plaquettes activées suite à une stimulation par les produits générés en conséquence de lésions vasculaires, tel que le vWF, les composantes de la matrice sous-endothéliale exposée, telle que le collagène, ainsi que la thrombine, l'ADP, la TXA_2 , le PAF et les chimiokines et médiateurs inflammatoires. La P-sélectine peut alors interagir avec son ligand, le PSGL-1 exprimé constitutivement chez les leucocytes, contribuant significativement à la stabilisation de l'agrégation plaquettaire (Figure 2.4).^{303, 412, 413} D'autre part, la P-sélectine peut interagir avec les intégrines β_2 ($\alpha_M\beta_2$ ou MAC-1 ou CD11b/CD18) des leucocytes, qui sont, à l'état de repos, des récepteurs de faible affinité. Par contre, l'activation des leucocytes résulte en une affinité et une avidité accrue de ces intégrines permettant l'adhésion ferme des leucocytes.⁴¹³

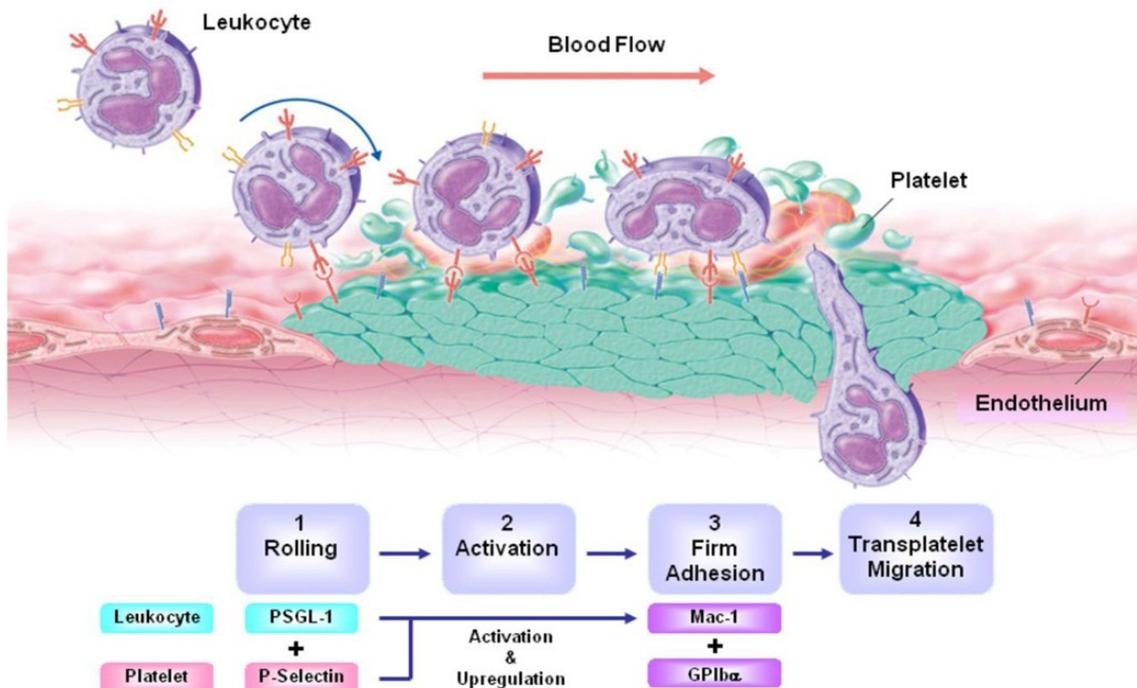


Figure 2.4 : Mécanisme de recrutement et de transmigration des leucocytes à travers une surface de plaquettes immobilisées aux sites de lésion vasculaire. Le recrutement et le roulement des leucocytes sont engendrés par des interactions impliquant la P-sélectine plaquettaire et le PSGL-1 leucocytaire. L'adhésion ferme des leucocytes est engendrée par la GPIIb α plaquettaire et le MAC-1 leucocytaire. La relâche de chimiokines induit la transmigration des leucocytes. Inoue *et al.* Vascular inflammation and repair: Implications for re-endothelialization, restenosis, and stent thrombosis. *JACC Cardiovascular interventions*. 2011;4:1057-1066

Étant des cellules inflammatoires, les leucocytes activés produisent et relâchent une panoplie de médiateurs inflammatoires, tels que des chimiokines (RANTES, PF4), des cytokines et des radicaux libres ainsi que le TF, impliqués dans le recrutement leucocytaire, la réactivité inflammatoire de ces cellules, l'initiation de la voie extrinsèque de la coagulation, et l'accélération du développement de l'athérosclérose.^{405, 414, 415}

Le dépôt de fibrinogène par les plaquettes activées, impliquant le récepteur GPIIb/IIIa plaquettaire, sert de moyen d'ancrage et d'adhésion des monocytes par l'entremise de leur récepteur MAC-1, ayant une affinité accrue lors du roulement et de l'adhésion des leucocytes à une surface de plaquettes adhérentes.^{361, 369, 371} De plus, le récepteur MAC-1 leucocytaire peut interagir avec le complexe GPIb/IX/V, ICAM-2 et JAM-3 plaquettaire permettant davantage les liens intercellulaires étroits (Figure 2.5).^{361, 363, 369, 385, 416, 417}

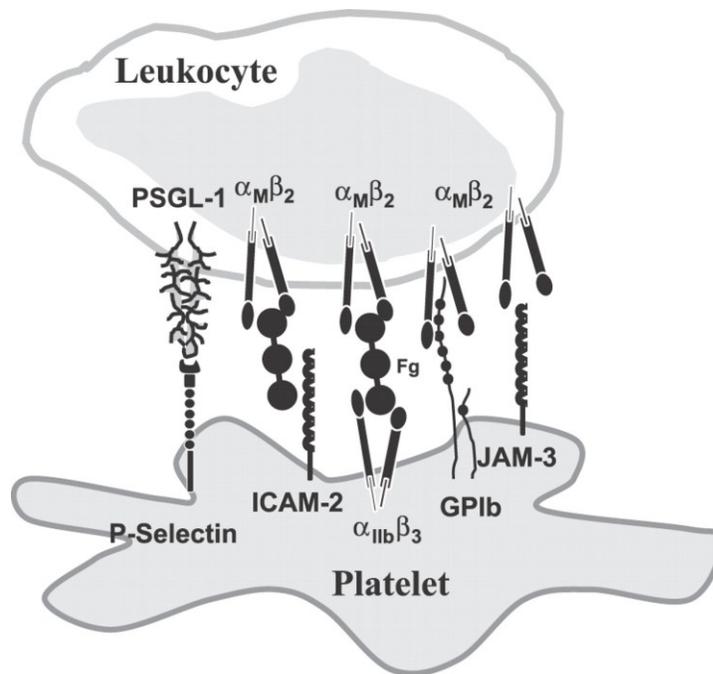


Figure 2.5 : Les récepteurs impliqués dans l'adhésion des plaquettes aux leucocytes. Gawaz *et al.* Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res.* 2004;61:498-511

Des études récentes ont décrit le rôle de l'axe CD40L/CD40 dans l'interaction plaquette-leucocyte et plaquette-cellule endothéliale suggérant que le CD40 ligand («*CD40 Ligand*», CD40L) membranaire (mCD40L), exprimé suite à l'activation plaquettaire, et le CD40L soluble («*soluble CD40 Ligand*», sCD40L), une forme tronquée et relâchée du CD40L membranaire des plaquettes, interagissent avec leur récepteur CD40 au niveau des cellules endothéliales et des leucocytes, particulièrement des monocytes et macrophages, promouvant l'adhésion cellule-cellule et la régulation de la fonction cellulaire. De plus, l'interaction CD40L-CD40 stimule l'expression leucocytaire de MAC-1, impliqué dans le recrutement des leucocytes, et de TF, impliqué dans la cascade de coagulation. Cette interaction stimule aussi la sécrétion de cytokines et de chimiokines inflammatoires et induit l'expression de molécules d'adhésion, telles que le VCAM-1, l'ICAM-1, la P-sélectine, et l'E-sélectine, par les cellules endothéliales (Figure 2.6).^{283, 284, 362, 404, 413, 415, 418} L'axe CD40L/CD40 et son implication physiopathologique sera le sujet du chapitre 4.

En somme, l'interaction des leucocytes avec les plaquettes module la fonction des deux types cellulaires et contribue au développement et à la propagation de la réaction thrombo-inflammatoire manifestée dans plusieurs maladies cardiovasculaires.

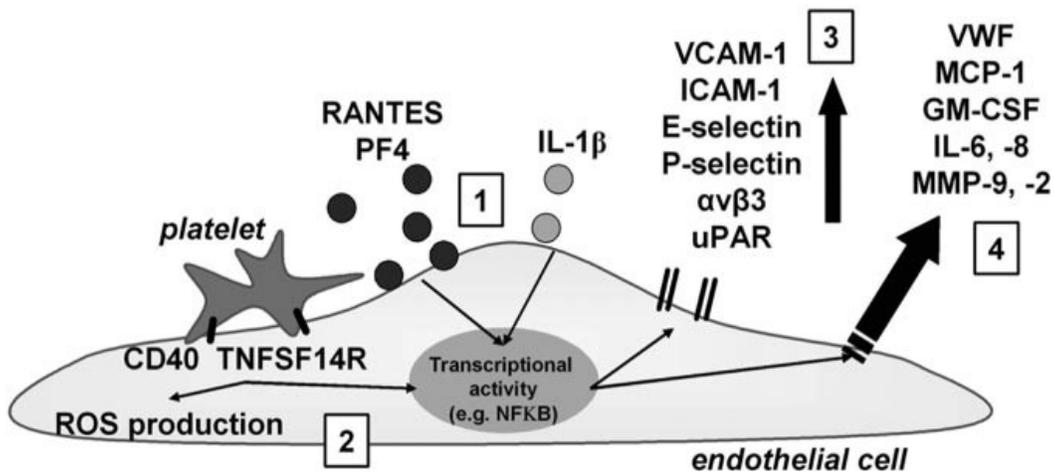


Figure 2.6 : L'activation des cellules endothéliales par les plaquettes. L'interaction des plaquettes avec les cellules endothéliales induit dépôt de chimiokines dérivées des plaquettes, telles que RANTES et PF4 (1). Des cascades signalétiques intracellulaires impliquant le NF-κB sont initiées suite à l'interaction des cellules endothéliales avec les plaquettes et résultent en la production des ROS (2). De plus, l'expression de molécules d'adhésion est accrue (3) et la sécrétion de cytokines, telles que MCP-1, GM-CSF, IL-6, IL-8, de MMPs et du vWF, est favorisée (4). van Gils *et al.* Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *J Leukoc Biol.* 2009;85:195-204

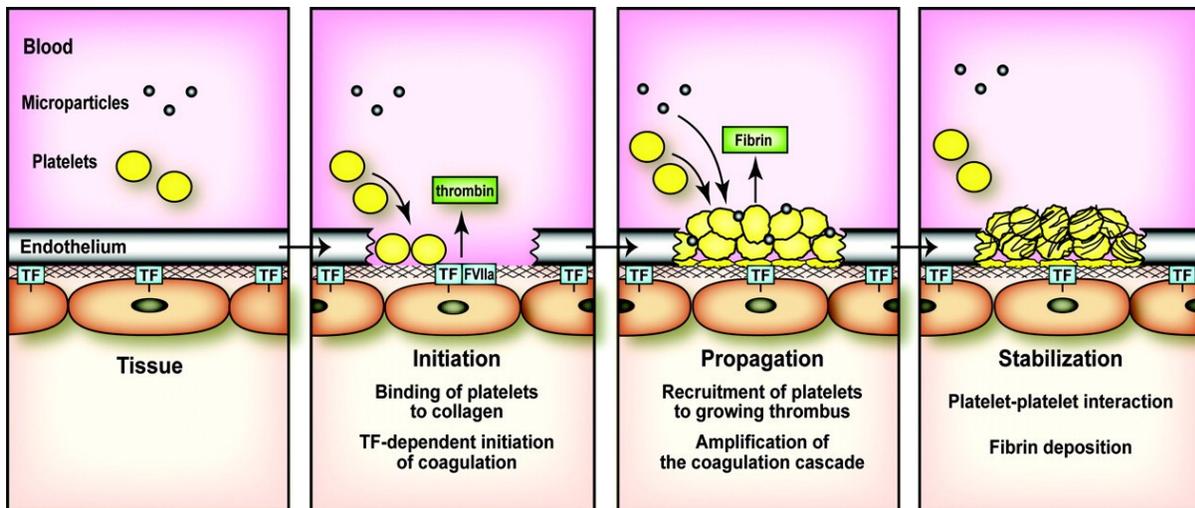
2.4.2 La formation de thrombus

La formation d'un thrombus est un processus dynamique qui implique trois étapes : l'initiation, la propagation et la stabilisation (Figure 2.7).⁴¹⁹ Ce processus est initié par l'accumulation des plaquettes aux sites de lésions vasculaires et résulte en la formation d'un agrégat ou d'un amas plaquettaire qui engendre souvent une résistance vasculaire et une embolisation, ou une occlusion des vaisseaux sanguins. Les conditions physiologiques et pathophysiologiques dictent l'état de la formation et de la propagation d'un thrombus. Parmi les facteurs qui influencent ce processus, on retrouve : le flux sanguin, les forces de cisaillements et le nombre de plaquettes circulantes.⁴²⁰ Lors des faibles forces de cisaillements, le fibrinogène est impliqué dans l'activation plaquettaire alors que, lorsque les forces de cisaillement sont élevées, le vWF est le ligand prédominant de l'activité plaquettaire.⁴²¹ L'accumulation de TF aux parois vasculaires et le dépôt de fibrine aux sites de lésions vasculaires induisent une thrombogenicité vasculaire accrue et, conséquemment, la propagation d'un thrombus.⁴²²

Afin de permettre le maintien de la coagulation et d'assurer l'hémostasie vasculaire, la formation de thrombine doit être maintenue et propagée au cours de ce processus. La propagation est principalement engendrée par la fibrine, présente dans le caillot sanguin, et les plaquettes, suite à leur activation via le récepteur GPVI, induisant ainsi la sécrétion granulaire. L'exposition du facteur V et de la phosphatidylsérine («*Phosphatidylserine*», PS) à la surface des plaquettes offre une surface optimale pour l'assemblage de complexes enzymatiques, tel que la tenase et la prothrombinase, induisant davantage la génération de thrombine.⁴²³ Une fois formée dans la phase initiale de la coagulation, la thrombine, générée en petites quantités par les plaquettes à la surface de l'endothélium endommagé, active le facteur VIII et V ainsi que la formation des complexes enzymatiques de la tenase et prothrombinase générant une deuxième vague encore plus importante de production de la thrombine, où les quantités de thrombine sont beaucoup plus considérables, alors que le TF est alors négativement régulé et inactivé à ce stade avancé de la coagulation.⁴²⁰ De plus, la thrombine active le facteur XIII qui lie les mèches de fibrine afin de stabiliser la formation du thrombus.⁴²⁴ Il a récemment été démontré que les interactions plaquette-leucocyte sont non seulement impliquées dans les phases initiales de la coagulation, mais contribuent également à la propagation de la formation d'un thrombus.⁴¹⁴

La propagation du thrombus est limitée par le dépôt de fibrine lors de la formation du thrombus et des facteurs anticoagulants qui inhibent le recrutement et l'activité plaquettaire.

Entre autres, l'antithrombine («*Antithrombin*», AT), qui est un inhibiteur de la famille des sérines protéases, inhibe la thrombine et inactive les facteurs IXa et Xa. De plus, la protéine C activée («*Activated Protein C*», APC), également une sérine protéase, inhibe l'assemblage des complexes enzymatiques de la tenase et de la prothrombinase à la surface des plaquettes par l'inactivation des facteurs VIIIa et Va. Contrairement à l'AT, le cofacteur II de l'héparine («*Heparin Cofactor II*», HC-II) inhibe spécifiquement la thrombine et n'affecte pas les sérines protéases du système de coagulation. De plus, l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire («*Tissue Factor Inhibitor Pathway*», TFIP) est un inhibiteur de la tenase, impliquée dans la formation du complexe TF-facteur VII dans le mécanisme de la voie extrinsèque.⁴²⁴ Les eicosanoïdes et les ligands synthétiques PPAR γ ont également été considérés comme approche thérapeutique pour diminuer la sécrétion plaquettaire de médiateurs bioactifs, tels que la TXA₂ et le CD40L, permettant ainsi de limiter l'activité plaquettaire et l'inflammation.⁴²⁵ D'autre part, l'endothélium sain en proximité relâche des facteurs anti-thrombotiques, tels que le NO et la PGI₂, contribuant davantage à l'inhibition de l'adhésion et de l'activité plaquettaire pathophysiologique.



Fig

ure 2.7 : Les étapes de la formation d'un thrombus. Légende : Blood (sang); microparticles (microparticules); platelets (plaquettes); tissue (tissu); thrombin (thrombine); binding of platelets to collagen (liaison des plaquettes au collagène); TF-dependent initiation of coagulation (initiation de la coagulation dépendante du facteur tissulaire (TF)); recruitment of platelets to growing thrombus (recrutement des plaquettes au thrombus en développement); amplification of coagulation cascade (amplification de la cascade de coagulation); platelet-platelet interaction (interaction plaquette-plaquette); fibrin deposition (dépôt de fibrine). Mackman *et al.* Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1687-1693

Chapitre 3

Les interactions EPC-Plaquettes

3.1 Le rôle des plaquettes dans la fonction des EPCs

Depuis la découverte des EPCs, suggérant leur rôle dans la réparation et la régénération vasculaire, plusieurs études ont analysé le rôle des plaquettes dans la fonction des EPCs. Maintes études ont montré que les plaquettes jouent le rôle de modulateur positif de la régulation des fonctions biologiques des EPCs par leur interaction avec ces dernières. En effet, une augmentation du recrutement, de la différenciation, et de la migration des EPCs est observée suite à leur interaction avec les plaquettes.^{116, 118, 308, 426-429} Bien que l'effet des interactions des plaquettes avec les cellules endothéliales matures fût étudié, démontrant un rôle pro-inflammatoire et pro-athérogénique des plaquettes,^{415, 430} le rôle de ces interactions avec les EPCs demeure un domaine de recherche pertinent qui permettrait de comprendre les interactions intercellulaires dans les processus et les maladies cardiovasculaires, entre autres, l'athérosclérose et la thrombose.

En conditions physiologiques normales, les EPCs se retrouvent en circulation où elles interagissent peu, de manière transitoire, ou pas avec l'endothélium. Par contre, lors d'un endommagement vasculaire, les plaquettes sont les premières cellules qui adhèrent sur l'endothélium endommagé ou à la matrice sous-endothéliale exposée, forment une monocouche et initient le remodelage vasculaire par le recrutement et la domiciliation de plusieurs types cellulaires, tels que les leucocytes et les cellules progénitrices. L'adhésion des plaquettes est suivie par leur activation induisant la relâche de médiateurs inflammatoires et des chimiokines dans le microenvironnement vasculaire endommagé permettant ainsi le recrutement et l'adhésion des EPCs.³⁶⁰

L'implication des plaquettes au niveau de la fonction cellulaire des EPCs a été mieux décrite au cours des dernières années. Une étude a démontré que les plaquettes stimulent le recrutement des EPCs par le chimiotactisme ainsi que la différenciation et la migration des EPCs dérivées d'embryons murins. Ces EPCs peuvent à leur tour adhérer sur une surface de plaquettes immobilisées par l'entremise de deux récepteurs : le PSGL-1, qui lie la P-sélectine et est responsable du roulement des EPCs sur la surface de plaquettes immobilisées; et le VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$ ou CD49d/CD29), qui lie le VCAM-1 et est requise pour l'adhésion ferme des EPCs.^{426, 428} Un groupe de chercheurs a également mis en évidence le rôle des plaquettes dans le recrutement des cellules CD34⁺ dans un modèle de lésion vasculaire *ex vivo*. Cette étude a révélée le potentiel des agrégats plaquettaires à initier l'attachement et le roulement des cellules CD34⁺ par l'interaction

entre le récepteur PSGL-1 de ces dernières et la P-sélectine plaquettaire induisant ainsi l'adhésion ferme des cellules CD34⁺ sur le thrombus, composé de fibrine, et sur les cellules endothéliales qui expriment le TF. D'ailleurs, le thrombus riche en fibrine peut même contribuer à la migration des cellules CD34⁺ aux sites de lésions vasculaires et leur différenciation en cellules endothéliales matures.⁴²⁹ De plus, ce même groupe a récemment démontré que des cellules CD34⁺/KDR⁺, une population de cellules qui contribue à la réparation vasculaire, peuvent être générées à partir de cellules CD34⁺ en circulation suite à leur adhésion et immobilisation sur les plaquettes activées. En effet, les plaquettes activées induisent la domiciliation des cellules CD34⁺ aux sites de lésions vasculaires et la translocation du récepteur KDR à la surface membranaire des cellules CD34⁺ une fois immobilisées.¹¹⁶ Cependant, les plaquettes stimulent le recrutement des cellules progénitrices CD34⁺, par un processus impliquant les récepteurs P-sélectine-PSGL-1 et les intégrines β_1 et β_2 , et promeut leur différenciation en cellules endothéliales, mais également en cellules spumeuses qui jouent un rôle important dans l'initiation de l'athérogenèse.^{111, 308} D'autre part, des interactions EPC-plaquettes ont été notées dans la formation d'un thrombus impliquant les récepteurs P-sélectine et GPIIb/IIIa plaquettaires.^{112, 360} L'activation plaquettaire par la GPIIb/IIIa induit l'adhésion des EPCs au thrombus. Plus récemment, l'implication de la molécule-C d'adhésion de jonction («*Junctional Adhesion Molecule-C*», JAM-C) plaquettaire dans la fonction des cellules CD34⁺ a été démontré. En effet, l'activation plaquettaire via PAR-1 induit une augmentation de l'expression de JAM-C au niveau des plaquettes, semblablement à l'expression accrue de la P-sélectine, chez les patients souffrant de maladies des artères coronaires. L'association de JAM-C, des plaquettes immobilisées, à son récepteur MAC-1, des cellules CD34⁺, induit le recrutement et l'adhésion de ces dernières en conditions de faibles et de grandes forces de cisaillement, mais n'affecte pas leur différenciation.⁴³¹ D'autre part, l'expression de la molécule-A d'adhésion de jonction («*Junctional Adhesion Molecule-A*», JAM-A) au niveau des plaquettes contribue à promouvoir l'adhésion des cellules CD34⁺, par l'entremise de leur récepteur LFA-1, sur une surface de plaquettes immobilisées et à induire la différenciation de ces cellules en EPCs.⁴³²

Les plaquettes représentent une source importante de facteurs de croissance, tels que le PDGF, le TGF β et l'IGF, et de chimiokines, telle que le SDF-1 α , qui peuvent ainsi contribuer au recrutement de cellules progénitrices.^{401, 402, 427, 433} Récemment, une étude a mis en évidence le rôle des facteurs de croissance dérivés des plaquettes dans la génération de cellules progénitrices

pour des fins thérapeutiques. En effet, ces facteurs induisent l'expansion des cellules progénitrices $CD34^+$ et $CD133^+$ et pourraient être utilisés comme approche thérapeutique dans la transplantation autologue de cellules progénitrices.⁴³⁴ D'ailleurs, il semble que la synergie des facteurs, tels que le FGF et le PDGF, contribue à améliorer davantage la prolifération et la migration des EPCs.⁴³⁵ Le rôle de SDF-1 α , dérivé des plaquettes, dans la biologie des EPCs a été le sujet de plusieurs études (Figure 3.1).⁴²⁷ Le SDF-1 α lie son récepteur CXCR4 et régule l'adhésion *in vitro* et *in vivo* des cellules progénitrices $CD34^+$ et stimule leur différenciation en EPCs. D'ailleurs, le SDF-1 α est considéré comme une chimiokine importante dans la thérapie cellulaire puisque celui-ci augmente le nombre d'EPCs aux sites d'endommagement vasculaire en augmentant l'expression des intégrines α_2 , α_4 , et α_5 responsables de l'adhésion des EPCs à la fibronectine et au collagène.^{328, 329} Le prétraitement des EPCs en expansion *ex vivo* avec le SDF-1 α promeut leur adhésion aux cellules endothéliales matures, par une interaction intégrine-dépendante induisant l'expression des intégrines α_4 et α_M , démontrant ainsi un potentiel accru de la réparation vasculaire.³³⁰ Dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le rat, un peptide analogue de SDF-1 α se trouve à induire la migration des EPCs au site en question et à améliorer la fonction cardiaque.¹³⁵

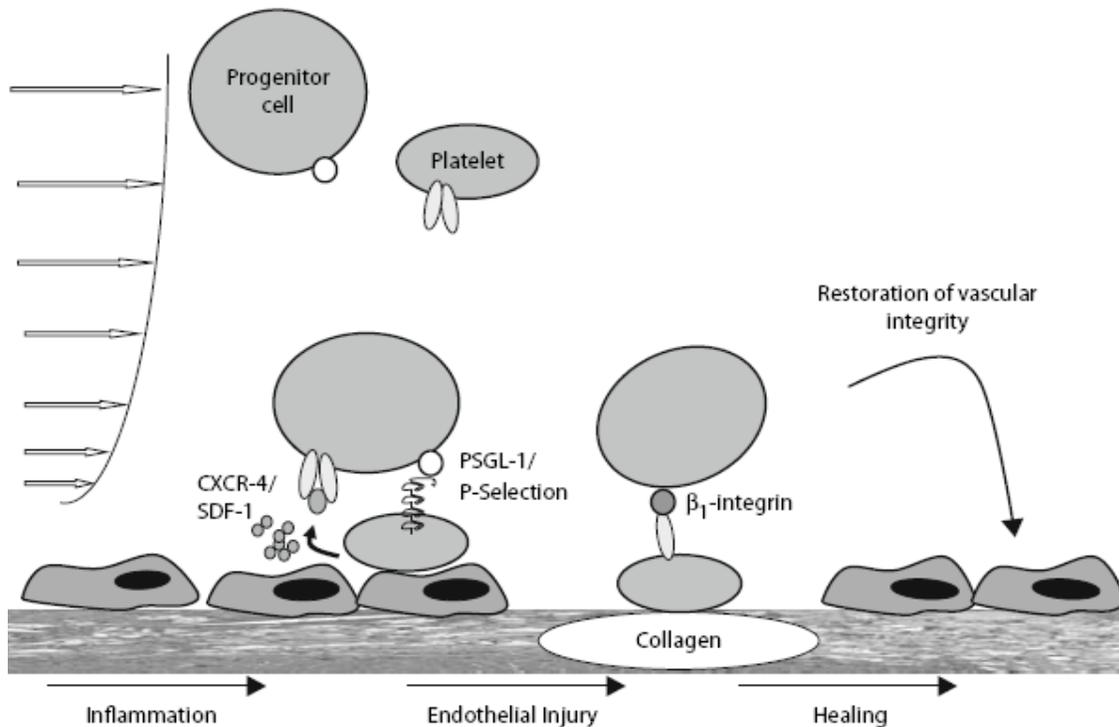


Figure 3.1 : Rôle des plaquettes dans le recrutement des cellules progénitrices. Les plaquettes jouent le rôle de cellules «pont» entre la paroi vasculaire et les cellules progénitrices. Les plaquettes s'accumulent

aux sites de lésions vasculaires. La relâche de SDF-1 par les plaquettes induit le recrutement des EPCs, qui expriment son récepteur, le CXCR4, induisant alors la migration et la différenciation des EPCs en cellules endothéliales matures permettant la réendothélialisation. L'interaction de la P-sélectine plaquettaire avec le PSGL-1 des EPCs est un autre moyen de recrutement des EPCs. Par la suite, des interactions impliquant les intégrines β_1 sont responsables des adhésions fermes de ces cellules aux sites d'endommagement vasculaire permettant la restauration de l'intégrité vasculaire. Langer *et al.* Platelets in regenerative medicine. *Basic Res Cardiol.* 2008;103:299-307

Malgré que les facteurs dérivés des plaquettes aient démontré un potentiel d'amélioration de la fonction des EPCs, des études ont révélé le rôle pathophysiologique de ces médiateurs dans les processus vasculaires. Le PDGF, un facteur de croissance dérivé des plaquettes, induit la différenciation des EPCs dérivées de la moelle osseuse en cellules exprimant des marqueurs semblables aux SMCs, suggérant que la différenciation des EPCs stimulées par les facteurs plaquettaires contribuent à la structuration de la paroi vasculaire plutôt que de contribuer au revêtement de la paroi vasculaire par l'acquisition d'un caractère endothélial.¹⁴⁵ Alors que le SDF-1 α a un effet stimulateur dans la prolifération des ces cellules progénitrices, il peut aussi contribuer à réduire la fonction bénéfique des EPCs en présence d'un thrombus vasculaire en induisant la phagocytose des plaquettes par les cellules progénitrices CD34⁺ et en favorisant la différenciation des cellules CD34⁺ en macrophages et en cellules spumeuses, ce qui contribue à l'athérogenèse.⁴³⁶ De plus, les EPCs expriment le récepteur de l'activateur plaquettaire («Platelet Activating Factor-Receptor», PAF-R) et peuvent répondre à une stimulation par le facteur activateur des plaquettes («Platelet Activating Factor», PAF), un facteur inflammatoire important relâché par les plaquettes. Le PAF réduit le nombre d'EPCs et induit leur profil inflammatoire ce qui pourrait diminuer l'effet thérapeutique des EPCs en présence de médiateurs inflammatoires plaquettaires.⁴³⁷ Or, bien que les plaquettes induisent la réparation et la régénération vasculaire, ces cellules peuvent également initier et contribuer aux pathologies vasculaires, dont l'athérosclérose, par l'entremise de leur fonction pro-coagulante et pro-inflammatoire, exacerbant ainsi l'athérogenèse.^{360, 427}

Mis à part les études au cours des dernières années sur les interactions entre les plaquettes et les EPCs, un nouveau domaine de recherche se développe visant le rôle des microparticules plaquettaires dans les fonctions des EPCs. D'ailleurs, la présence de microparticules plaquettaires, dérivées d'une désintégration des plaquettes, dans les cultures de cellules mononucléaires sont assimilées par ces dernières et induisent leur différenciation en EPCs.⁴³⁸

Les microparticules plaquettaires activées par la thrombine et le collagène lient les EPCs et sont assimilées et incorporées par ces dernières.⁴³⁹ Les interactions microparticules-EPC induisent l'expression de marqueurs endothéliaux et le transfert du récepteur CXCR4, induisant une réponse accrue au SDF-1 α .⁴³⁹ De plus, les microparticules plaquettaires induisent l'adhésion des EPCs aux composantes de la matrice sous-endothéliale exposée et promeuvent le réarrangement cytosquelettique responsable de la fonction migratoire des EPCs; or, le potentiel angiogénique des EPCs est augmenté par les microparticules plaquettaires.⁴³⁹ Ces résultats suggèrent l'importance des microparticules dans la réparation vasculaire et la restauration de l'intégrité vasculaire.⁴³⁹ Les microparticules plaquettaires sont maintenant considérées des médiateurs importants dans la régulation des fonctions cellulaires, particulièrement l'angiogenèse. D'ailleurs, l'administration locale des microparticules plaquettaires aux sites de lésions vasculaires pourrait être une approche thérapeutique permettant la réparation et la régénération vasculaire.³⁶⁶

Dans des études antérieures, le laboratoire de Dr Merhi a mis en évidence l'interaction EPC-plaquette en décrivant le rôle des EPCs dans la fonction plaquettaire. En effet, le groupe a démontré que les EPCs lient les plaquettes de manière P-sélectine-dépendante et inhibent l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettaire ainsi que la formation de thrombus par un mécanisme signalétique impliquant l'expression de COX-2 et induisant la sécrétion de PGI₂.¹¹⁷

On croit que chez les individus qui présentent des risques cardiovasculaires la fonction des EPCs et les interactions EPC-plaquettes sont altérées.¹¹⁵ En effet, les plaquettes des individus diabétiques n'induisent pas la prolifération et la différenciation des EPCs particulièrement dû au stress oxydatif, à l'inflammation et à la dysfonction endothéliale.⁴⁴⁰

3.2 Le rôle des interactions EPC - plaquettes dans les processus et les maladies vasculaires

Le rôle des interactions EPC-plaquettes a particulièrement été le sujet des études dans plusieurs domaines, dont l'hémostase, l'inflammation, la thrombose, et l'athérosclérose ainsi que dans l'angiogenèse et la médecine régénérative.

Les interactions EPC-plaquettes se trouvent impliquées dans la domiciliation des EPCs aux sites vasculaires endommagés ou lésés, un processus qui requière le recrutement initial des EPCs à l'endothélium activé ou à la matrice sous-endothéliale exposée, respectivement, suivi de la transmigration de ces cellules progénitrices. Les plaquettes induisent des signaux

chimiotactiques favorisant le recrutement des EPCs. Lors des lésions vasculaires, caractérisées par les grandes forces de cisaillement, les EPCs ne peuvent adhérer directement à la matrice sous-endothéliale. Sous ces conditions, les plaquettes, possédant les récepteurs GPIb/IX/V, GPVI et GPIIb/IIIa, peuvent lier directement le collagène et le fibrinogène, respectivement.¹¹⁴ Or, les plaquettes jouent le rôle de cellules «pont» entre les EPCs et le site vasculaire endommagé (Figure 3.2).¹¹⁴ Les interactions P-sélectine-PSGL-1 sont à la base des premiers contacts entre les plaquettes et les EPCs responsables du recrutement de ces dernières.^{111, 114, 427} D'autre part, les intégrines β_1 et β_2 exprimées au niveau des EPCs permettent l'adhésion des EPCs aux plaquettes immobilisées.¹¹⁴ Plusieurs événements sont observés suite au recrutement des EPCs de manière plaquette-dépendante, dont la mobilisation, le chimiotactisme, l'adhésion et la différenciation des autres cellules vasculaires.⁴⁴¹ Ainsi, les interactions EPC-plaquettes sont impliquées dans l'hémostase vasculaire par la réparation des lésions vasculaires.

Les interactions EPC-plaquettes ont fait le sujet de plusieurs études dans la médecine régénérative. Les plaquettes induisent un profil pro-angiogénique des EPCs, en stimulant la fonction régénérative des EPCs par la sécrétion de facteurs, qui induisent la mobilisation, la domiciliation et le recrutement des EPCs aux sites vasculaires en question, et promouvant la migration et la différenciation de ces dernières, permettant ainsi la formation de nouveaux vaisseaux (Figure 3.2).^{114,402, 442} Particulièrement, le rôle de l'interaction de SDF-1 α plaquettaire avec son récepteur CXCR4, au niveau des EPCs, a été décrit pour son effet stimulateur de multiples fonctions cellulaires des EPCs.^{92, 112, 113, 134, 135, 328-330, 436, 442-444}

Les microparticules plaquettaires ont également démontré un rôle thérapeutique et régénératif important dans leur interaction avec les EPCs.^{366, 439} Bien que le rôle bénéfique des plaquettes et de leurs microparticules soit noté au niveau de la régénération vasculaire, par les processus de l'angiogenèse et de la vasculogenèse, des études ont rapporté le rôle pathophysiologique des plaquettes dans l'angiogenèse tumorale.³⁶⁵

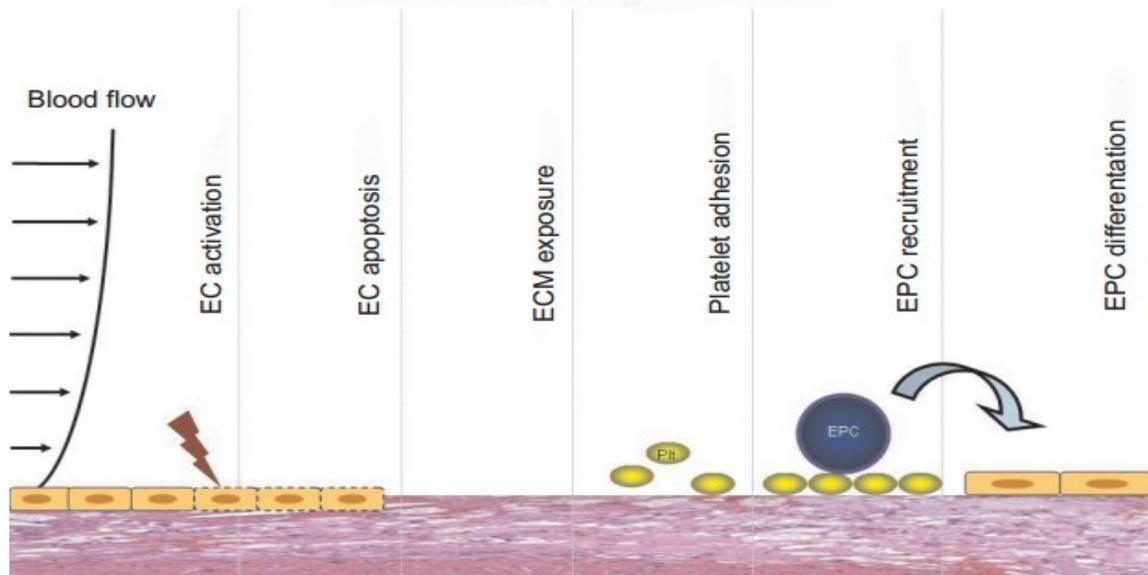


Figure 3.2 : L'interaction des plaquettes avec les cellules progénitrices dans la régénération vasculaire. Dans les maladies cardiovasculaires, une multitude de facteurs induisent l'activation et l'apoptose de cellules endothéliales de la paroi vasculaire. L'exposition de la matrice sous-endothéliale, composée principalement de collagène, induit l'adhésion des plaquettes via leur récepteur GPVI. Ceci promeut l'activation des plaquettes induisant l'expression de récepteurs d'adhésion à leur surface, incluant la P-sélectine, le SDF-1 α et la GPIIb/IIIa, qui favorisent le recrutement des EPCs aux sites de lésions vasculaires. Les plaquettes peuvent alors induire la différenciation des EPCs en cellules endothéliales matures. Stellos *et al.* Platelet interaction with progenitor cells: Vascular regeneration or inquiry? *Pharmacol Rep.* 2008;60:101-108

Le rôle des interactions EPC-plaquettes a été souligné dans la réparation et la régénération vasculaire. Par contre, l'effet de ces interactions sur les pathophysiologies vasculaires, telle que l'athérosclérose, a également été noté, principalement dû aux réponses autocrines et paracrines inflammatoires qui sont engendrées par ces interactions et qui contribuent à l'athérogenèse.³⁵⁴ Les plaquettes activées peuvent lier les EPCs et induire non seulement la relâche de facteurs de croissance et de chimiokines, mais également des médiateurs inflammatoires. Ces médiateurs contribuent à la différenciation des cellules progénitrices en macrophages et en cellules spumeuses induisant davantage le développement d'un microenvironnement inflammatoire (Figure 3.3).^{114, 360, 436, 437, 441}

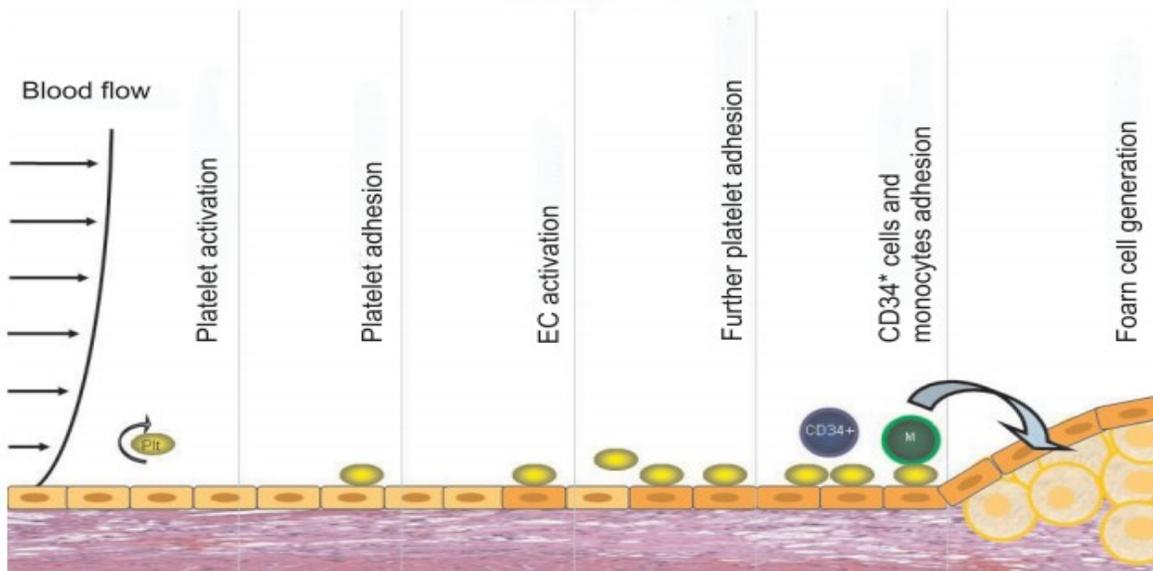


Figure 3.3 : L'interaction des plaquettes avec les cellules progénitrices dans l'endommagement vasculaire et le développement de la plaque athérosclérotique. Dans l'athérosclérose, l'activation plaquettaire induit le roulement des plaquettes puis leur adhésion ferme aux cellules endothéliales. Les plaquettes sécrètent des médiateurs pro-inflammatoires, tels que le CD40L et l'IL-1 β , ce qui entraîne l'activation de l'endothélium et davantage l'activation et la sécrétion plaquettaire. Ceci induit le recrutement des leucocytes et des cellules progénitrices. La phagocytose des plaquettes par ces cellules favorise leur différenciation en cellules spumeuses et donc le développement de la plaque athérosclérotique. Stellos *et al.* Platelet interaction with progenitor cells: Vascular regeneration or inquiry? *Pharmacol Rep.* 2008;60:101-108

Les plaquettes sont les principales sources cellulaires impliquées dans la formation d'un thrombus. Cependant, la propagation d'un thrombus menant à l'occlusion de vaisseaux sanguins implique d'autres cellules sanguines qui contribuent aux manifestations vasculaires, telle que l'athérombose.⁴⁴⁵ Un rôle bénéfique des interactions EPC-plaquettes a été démontré suggérant que les EPCs contribuent à inhiber la fonction plaquettaire et à réduire la formation d'un thrombus par un processus de réendothélialisation.^{117, 118, 429} En effet, le laboratoire de Dr Merhi a démontré que l'injection des EPCs dans un modèle murin de thrombus réduit la formation du thrombus et retarde l'occlusion artérielle.¹¹⁷ Par contre, d'autres études ont rapporté le rôle néfaste des cellules progénitrices dans l'exacerbation des événements thrombotiques d'une plaque athérosclérotique.^{114, 360} Or, il serait nécessaire de tenir compte de ces résultats dans le développement des approches thérapeutiques utilisant les EPCs.

Chapitre 4

L'axe CD40L/CD40

4.1 Introduction

4.1.1 L'axe CD40L/CD40

Les niveaux de médiateurs inflammatoires déterminent le risque et la manifestation de plusieurs maladies cardiovasculaires, dont l'athérosclérose, l'hypertension et le diabète. Parmi ces médiateurs inflammatoires, on compte le CRP, l'IL-1 β , l'IL-6, le TNF- α , et plus récemment, le CD40L.^{446, 447} D'ailleurs, le niveau de CD40L soluble circulant a été associé à plusieurs maladies cardiovasculaires, tel que l'athérosclérose, et est maintenant considéré par plusieurs chercheurs comme un biomarqueur clinique de risque cardiovasculaire.⁴⁴⁸ Depuis cette association, le complexe CD40L/CD40, qui était initialement étudié pour son rôle dans l'immunité et les maladies auto-immunes, a fait le sujet de maintes études dans le domaine cardiovasculaire. Dans ce chapitre, les interactions du CD40L avec son récepteur le CD40 et ses trois autres récepteurs, les intégrines $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_M\beta_2$ (MAC-1) et $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa), seront discutées. Les mécanismes signalétiques intracellulaires du CD40L/CD40 seront décrits ainsi que l'implication de cet axe dans la fonction des cellules vasculaires. De plus, le rôle de l'axe CD40L/CD40 dans le contexte clinique, particulièrement au niveau de l'athéromatose, sera abordé.

L'axe CD40L/CD40 a premièrement été mis en évidence par Clark *et al.* ainsi que par Paulie *et al.* en 1985, suggérant que le récepteur CD40 (initialement nommé Bp50) exprimé chez les lymphocytes B est impliqué dans la production d'anticorps et dans l'immunité humorale.⁴⁴⁹ ⁴⁵⁰ Après quelques années, une étude a incité la recherche fondamentale dans l'étude de l'axe CD40L/CD40. En effet, Hill *et al.* ont associé une mutation génétique du CD40L avec les patients qui souffrent du syndrome hyper-IgM couplé au chromosome X («*X-linked immunodeficiency hyper IgM-syndrome*», HIGM), résultant en une anomalie dans la production des anticorps IgG, IgA et IgE ainsi que dans la réponse immune humorale.⁴⁵¹ Depuis ce temps, plusieurs études ont démontré le rôle de cet axe dans l'immunité et l'inflammation au niveau d'une multitude de types cellulaires, dont les lymphocytes B et T, les cellules dendritiques, les neutrophiles, les monocytes/macrophages, les plaquettes, les cellules endothéliales, les SMCs et les mastocytes (Tableau 4.1).^{284, 446, 452} L'implication de l'axe CD40L/CD40 dans la régulation de l'immunité et la production d'anticorps a suscité l'intérêt des études dans le domaine des maladies auto-immunes, telles que le lupus érythémateux disséminé, la sclérose en plaques, et l'arthrite rhumatoïde, ainsi que dans les maladies inflammatoires de l'intestin, le diabète,

l'hypercholestérolémie, et l'anémie à cellules falciformes. Étant un médiateur inflammatoire important, l'axe CD40L/CD40 a plus récemment été associé avec l'inflammation vasculaire, particulièrement dans l'athérosclérose. Plusieurs études ont démontré que cet axe est à la base de l'augmentation des médiateurs inflammatoires, des substances pro-coagulantes et pro-thrombotiques, des facteurs de croissance, des molécules d'adhésion cellulaire et des enzymes de dégradation de la matrice (les MMPs),⁴⁵³ qui résultent en l'exacerbation des conditions inflammatoires observées dans l'athérosclérose.

Tableau 4.1 : Expression de CD40 et CD40L dans les différents types cellulaires

Type cellulaire	CD40	CD40L
Plaquettes	+	+
Monocytes/Macrophages	+	+
Cellules endothéliales	+	+
Neutrophiles	+	-
SMCs	+	-
Mastocytes	+	+
Fibroblastes	+	-
Cellules T	+	+
Cellules B	+	-
Cellules dendritiques	+	-

Inspiré de Rizvi *et al.* CD40-CD40 ligand interactions in oxidative stress, inflammation and vascular disease. *Trends Mol Med.* 2008;14:530-538

4.1.2 La structure du CD40L

Le CD40L est exprimé au niveau de plusieurs cellules, telles que les leucocytes, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les SMCs et les plaquettes.^{452, 453} Le CD40L est une protéine transmembranaire de type II, de 39 kDa, et fait partie de la superfamille du facteur de nécrose tumorale («*Tumor Necrosis Factor*», TNF). Le gène du CD40L est localisé au chromosome X dans la région q26.3-q27.1 et est un fragment d'ADN de 13-kb de longueur.⁴⁴⁶ Cette protéine de 261 acides aminés est composée d'un grand domaine extracellulaire au terminus C (exons II à V) ainsi qu'un petit domaine transmembranaire et un terminus N intracellulaire, encodés par l'exon I (Figure 4.1). La structure du CD40L détermine son rôle biologique.⁴⁵⁴ Une forme tronquée soluble de 18 kDa du CD40L membranaire (mCD40L), nommée le sCD40L, est relâchée suite à un clivage MMP-dépendant au résidu Met113, et manque la queue cytoplasmique, le domaine membranaire et une partie du domaine

extracellulaire. Le sCD40L, relâché suite à l'activation des cellules T et des plaquettes, joue le rôle de cytokine inflammatoire.⁴⁴⁶ Il est maintenant connu que la forme trimérique du CD40L, où les monomères sont liés par des ponts disulfures, est la forme active capable d'induire des effets biologiques suite à la trimérisation du récepteur CD40 et de ses autres récepteurs identifiés : $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_M\beta_2$ (MAC-1), et $\alpha_{IIb}\beta_3$.⁴⁵⁵

4.1.3 La structure du CD40

Le récepteur CD40 est une protéine transmembranaire de type I, de 48 kDa, et fait partie de la famille des récepteurs du TNF («*TNF Receptor*», TNFR). Le CD40 est exprimé à la surface des cellules présentatrices d'antigènes («*Antigen-Presenting Cells*», APCs), telles que les cellules B, les monocytes/macrophages, et les cellules dendritiques, ainsi que dans d'autres types cellulaires, tels que les cellules T (CD4⁺), les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les kératinocytes, les fibroblastes, les plaquettes et les SMCs.^{452, 453} Le gène du CD40, de 16.3kb de longueur, se localise au chromosome 20 dans la région q12-13.2. Le CD40, composé de 277 acides aminés, comprend un peptide signalétique (exon I), un domaine cytoplasmique au terminus C (exons VII à IX), un petit domaine transmembranaire (exon VII) et un grand domaine extracellulaire au terminus N (exons II à VI composés 171 acides aminés) (Figure 4.1).⁴⁴⁶ Ce récepteur est caractérisé par la présence d'une séquence d'acides aminés répétitifs formant quatre sous-domaines riches en cystéines qui consistent de six résidus cystéines formant trois ponts disulfures. Le CD40 trimérise aux résidus Cys238 de chaque monomère en formant des ponts disulfures. Cette trimérisation du CD40 est requise pour sa liaison au CD40L.⁴⁵⁶

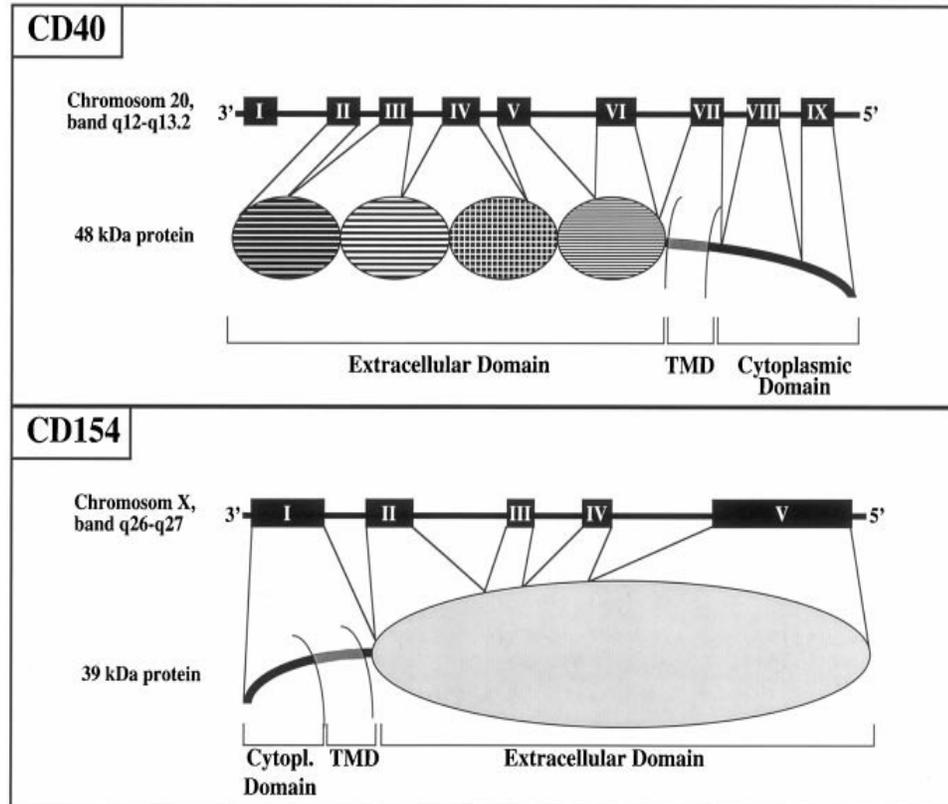


Figure 4.1 : Structure des gènes et des protéines CD40 et CD40L (CD154) humains. Schonbeck *et al.* The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58:4-43

4.1.4 L'interaction du CD40L avec son récepteur CD40

L'axe CD40L/CD40 a largement été décrit dans les interactions des cellules lymphocytaires, B et T, suggérant que ces interactions sont responsables de l'activation, de la différenciation et de la production d'anticorps dans les lymphocytes B de manière lymphocyte T-dépendante.⁴⁴⁶ L'interaction CD40L/CD40 est responsable de l'interaction intercellulaire entre plusieurs types cellulaires et est impliquée dans différents processus physiologiques, tel que l'immunité, et pathophysiologiques, tels que les maladies auto-immunes, inflammatoires et cardiovasculaires.

L'interaction du CD40L avec son récepteur CD40 requière un processus de trimérisation où les monomères sont liés par des ponts disulfures. Par la suite, le CD40L peut interagir avec le récepteur CD40 par l'entremise de résidus basiques chargés. Plus particulièrement, les résidus du CD40L, Arg143, Tyr145, Tyr146, Arg203 et Gln220, lient les résidus, Tyr82, Asp84, Glu74, Glu117 et Asn86, respectivement, au niveau du récepteur CD40.⁴⁵⁶ Des résidus hydrophobiques

entourent cette interaction de résidus entre le CD40L et le CD40 pour supporter et stabiliser l'interaction CD40L/CD40. Malgré qu'auparavant il a été proposé que le CD40 trimérise sous l'effet du CD40L, il est maintenant accepté que le CD40 est pré-assemblé avant l'interaction avec son ligand CD40L.^{457, 458} Cette conformation permet la liaison classique du CD40L au CD40 et peut alors moduler des mécanismes signalétiques intracellulaires par l'association des facteurs associés aux récepteurs du TNF («*TNF receptor-associated factors*», TRAFs), qui sont des protéines adaptatrices cytosoliques essentielles à la signalisation de l'axe CD40L/CD40 permettant l'activation de kinases intracellulaires et de gènes régulateurs, tels que Akt, p38 MAPK, JNK, ERK et NF- κ B (Figure 4.2).^{446, 453, 456, 457, 459, 460}

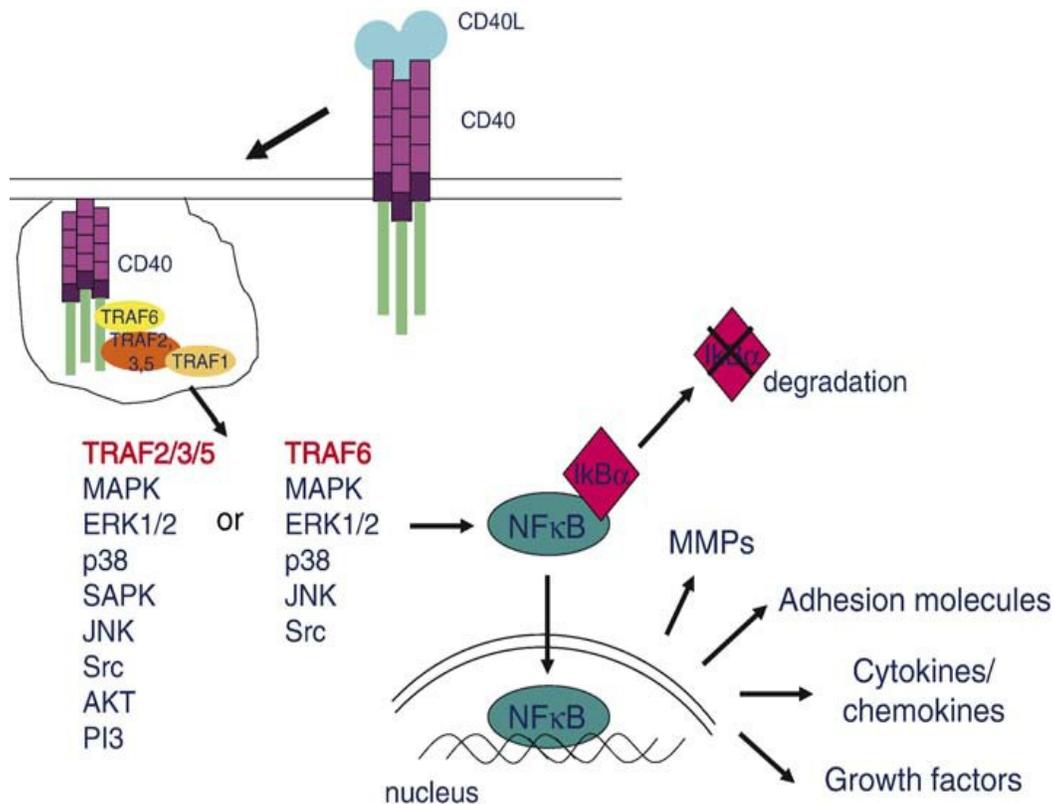


Figure 4.2: Signalisation intracellulaire du récepteur CD40. Le CD40 existe sous forme de homotrimère. Suite à l'association du CD40L, le CD40 devient activé et est alors internalisé. Le CD40 contient deux sites de liaison pour les TRAFs : un pour TRAF2, 3 et 5 et l'autre pour TRAF6. La voie de signalisation engendrée dépend du TRAF associé et du type cellulaire. La plupart des voies intracellulaires induisent la translocation et la transcription de NF- κ B dans le noyau qui résultent en l'expression de plusieurs molécules, dont les médiateurs inflammatoires, les MMPs, les molécules d'adhésion, les cytokines, les chimiokines et les facteurs de croissance. Lutgens *et al.* CD40 and its ligand in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 2007;17:118-123.

L'interaction du CD40L avec son récepteur CD40 induit des signaux intracellulaires qui résultent en plusieurs changements cellulaires. Entre autres, l'association du CD40L avec le CD40 induit la production et la sécrétion de cytokines, ainsi que l'expression de molécules d'adhésion et d'enzymes de dégradation. Ces surexpressions et surproductions sont impliquées dans le développement de plusieurs maladies inflammatoires. Au niveau des APCs, le récepteur CD40 est impliqué dans l'interaction du récepteur des cellules T («*T Cell Receptor*», TCR) avec le complexe majeur d'histocompatibilité («*Major Histocompatibility Complex*», MHC) résultant en une augmentation de l'expression de MHCII et des molécules d'adhésion.⁴⁵³

L'interaction CD40L-CD40 induit la production de plusieurs cytokines par les cellules B, telles que l'IL-2, l'IL-6, l'IL-10, le TNF- α , et le TGF- β .⁴⁵³ Au niveau des cellules endothéliales, l'interaction du CD40L avec le CD40 induit la production de MCP-1, de RANTES et d'IL-8.⁴⁵³ Quant aux macrophages, celles-ci produisent le MCP-1, le RANTES, le MIP-1 α et le MIP-1 β .⁴⁵³ Il est postulé que le CD40L induit également la sécrétion de MMP-1, -2, -3 et -9, par les monocytes/macrophages, et de MMP-11 et -13 en plus chez les cellules endothéliales et les SMCs.⁴⁵³ Par ailleurs, au niveau des cellules endothéliales et des fibroblastes, le CD40L induit la surexpression de molécules d'adhésion, telles que le VCAM-1, ICAM-1 et la E-sélectine.⁴⁵³ Le CD40L affecte également d'autres composantes cellulaires des cellules endothéliales, dont le COX-2 et le facteur tissulaire («*Tissue Factor*», TF), impliquées dans la thrombose et l'inflammation de l'athérosclérose,⁴⁴⁶ ainsi que le PAF⁴⁶¹ et le VEGF impliqués dans l'angiogenèse.⁴⁶²

Afin de comprendre les effets biologiques de l'interaction du CD40L avec le CD40, il est essentiel d'étudier les mécanismes signalétiques intracellulaires qui sont impliqués dans la fonction cellulaire.

4.1.5 Les récepteurs du CD40L

Bien que le CD40 soit le récepteur de plus haute affinité pour le CD40L, l'interaction de ce dernier avec trois autres récepteurs a été notée : les intégrines $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_M\beta_2$ (MAC-1) et $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa).⁴⁶³ Ces récepteurs permettent l'association de CD40L au niveau de plusieurs types cellulaires, mais leurs implications physiopathologiques restent inconnues.

Le récepteur $\alpha_5\beta_1$, composé d'une sous-unité α (CD49e) et β (CD29), fait partie de la famille des intégrines qui reconnaissent la séquence tripeptide RGD (arginine-glycine-acide

aspartique) dans les protéines d'adhésion, telles que la fibronectine et la vitronectine. Cette intégrine est exprimée à la surface de plusieurs types cellulaires, dont les leucocytes, les cellules endothéliales, les fibroblastes⁴⁶⁴, les cellules épithéliales¹⁰⁴ et les plaquettes.⁴⁶³ Le récepteur $\alpha_5\beta_1$ est impliqué dans l'adhésion des monocytes et a été caractérisé pour son rôle dans le chimiotactisme et la motilité des macrophages aux régions inflammatoires.⁴⁶⁵ Une étude récente a démontré que le sCD40L peut lier les cellules U937 CD40 déficientes (CD40^{-/-}), une lignée monocyttaire qui n'exprime pas le récepteur CD40, par le récepteur $\alpha_5\beta_1$.⁴⁶⁶ Le sCD40L lie la forme inactive de ce récepteur. Le changement de conformation du $\alpha_5\beta_1$ suite à son activation et à son attachement à la fibronectine ne permet pas la liaison du sCD40L. Cette liaison induit la translocation de $\alpha_5\beta_1$ aux domaines lipidiques à la membrane et stimule la production de chimiokines, telle que l'IL-8, par l'activation de la voie de signalisation ERK1/2 MAPK.⁴⁶⁶ Le récepteur $\alpha_5\beta_1$ plaquettaire peut également lier le CD40L au niveau des cellules T CD4+ ou d'autres plaquettes pour induire des réponses immunitaires et inflammatoires.⁴⁶³

Le récepteur $\alpha_M\beta_2$, composé d'une sous-unité α (CD11b) et d'une sous-unité β (CD18), est exprimé à la surface de plusieurs leucocytes, dont les monocytes/macrophages, et lie la séquence RGD des protéines d'adhésion, telles que le fibrinogène, la vitronectine, l'ICAM-1 et certains types de collagène, pour induire l'adhésion, l'activation et la transmigration de cellules inflammatoires.^{455, 467, 468} De plus, le récepteur $\alpha_M\beta_2$ est un modulateur chimiotactique du recrutement des leucocytes.⁴⁶⁹ Le CD40L a une plus haute affinité pour la forme active de $\alpha_M\beta_2$.⁴⁷⁰ Par contre, les résidus impliqués dans l'activation de ce récepteur demeurent inconnus. Dans le contexte des lésions athérosclérotiques, le CD40L peut lier les monocytes CD40^{-/-} par le récepteur $\alpha_M\beta_2$ et induire l'adhésion et la migration de ces cellules ainsi que la relâche de myéloperoxydase, un pro-oxydant.⁴⁷⁰ D'ailleurs, l'inhibition du récepteur $\alpha_M\beta_2$ réduit l'accumulation de macrophages aux lésions vasculaires.⁴⁷⁰

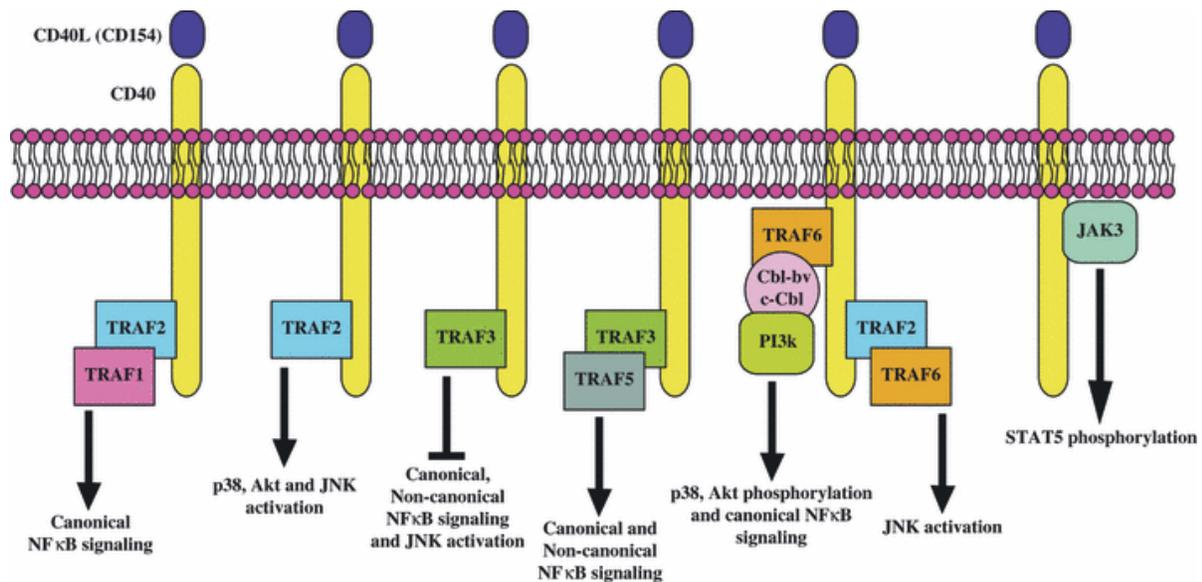
Finalement, le récepteur le plus récemment étudié est l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa). Deux polypeptides, liés par un pont disulfure, forment un hétérodimère des sous-unités α (CD41) et β (CD61). Ce récepteur, qui est le plus abondamment exprimé sur les plaquettes et les mégacaryocytes, lie le fibrinogène et la vitronectine et est un médiateur essentiel à l'adhésion et à l'agrégation plaquettaire.^{471,472} À l'état basal, l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est inactivée par la phosphorylation du résidu Thr753. Par contre, suite à son activation, des résidus sérines, thréonines et tyrosines sont phosphorylés du côté cytoplasmique de ce récepteur.^{473, 474} La

bidirectionnalité de celui-ci, qui induit des signalisations «*outside-in*» et «*inside-out*», est à la base de la régulation de l'activité plaquettaire.¹⁰⁴ Le CD40L peut lier le récepteur $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ via une séquence KGD (lysine-glycine-acide aspartique) aux résidus 115-117, chez l'humain,⁴⁷⁵ et par une séquence RGD (arginine-glycine-acide aspartique), chez la souris, et cette intégrine est nécessaire à la stabilisation d'un thrombus artériel.^{472, 475} De plus, suite à l'interaction interplaquettaire, par l'entremise du récepteur $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, l'expression du CD40L est augmentée à la surface membranaire des plaquettes.⁴⁷⁶⁻⁴⁷⁸ Le CD40L peut alors interagir avec son récepteur $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ au niveau des autres plaquettes ou avec un de ses autres récepteurs exprimé par d'autres types cellulaires et alors exacerber l'environnement inflammatoire lié à l'athérosclérose.

4.2 La voie de signalisation intracellulaire de l'axe CD40L/CD40

4.2.1 Le complexe CD40L/CD40/TRAF et les mécanismes intracellulaires

Le complexe CD40L/CD40/TRAF est essentiel à la signalisation intracellulaire de l'axe CD40L/CD40. Suite à l'association du CD40L à son récepteur CD40, les TRAFs sont recrutés à la queue cytoplasmique du récepteur CD40 afin d'activer une panoplie de composantes moléculaires signalétiques intracellulaires nécessaires à la fonction cellulaire.⁴⁷⁹ Ces associations entre les TRAFs et le CD40 induisent plusieurs voies de signalisations intracellulaires, telles que l'Akt, le p38 MAPK, le JNK, l'ERK et le NF- κ B (Figure 4.3).^{446, 453, 456, 457, 459, 480, 481} À part les TRAFs, il existe une molécule intracellulaire, nommée JAK3, qui peut s'associer au récepteur CD40 et induire une signalisation impliquant la voie de STAT.^{446, 456, 482}



Survival, maturation, proliferation, production of inflammatory cytokines, expression of costimulatory molecules, development of GC B cells, immunoglobulin isotype switching, somatic hypermutation of the immunoglobulin and formation of long-lived plasma cells and memory B cells.

Figure 4.3 : Rôle des TRAFs dans la signalisation de l'axe CD40L/CD40 et les mécanismes intracellulaires qui sont engendrés. Légende: Canonical NF- κ B signaling (voie de signalisation canonique de NF- κ B); non-canonical NF- κ B signaling (voie de signalisation non-canonique de NF- κ B); survival (survie); maturation (maturation); proliferation (prolifération); production of inflammatory cytokines (production de cytokines inflammatoires); expression of costimulatory molecules (expression de molécules de co-stimulation); development of GC B cells (développement de cellules B du centre germinatif); immunoglobulin isotype switching (changement d'isotype de l'immunoglobuline); somatic hypermutation of the immunoglobulin (hypermaturation somatique de l'immunoglobuline); formation of long-lived plasma cells and memory B cells (formation de cellules plasmatiques et de cellules B mémoires de longue durée de survie). Elgueta *et al.* Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev.* 2009;229:152-172.

4.2.2 La structure des TRAFs

La famille des TRAFs comprend six membres : TRAF1, 2, 3, 4, 5 et 6. La structure de ces protéines est semblable entre les membres de cette famille où un domaine TRAF est conservé (180 acides aminés).⁴⁶⁰ Elles sont composées d'un domaine terminal C conservé (TRAF-C), d'un domaine zipper riche en isoleucine, d'un domaine terminal N (TRAF-N) et des domaines riches en motifs zinc (zinc fingers et zinc RING). Le TRAF1 est le seul membre de cette famille qui ne comporte pas de motifs zinc. Les domaines des TRAFs sont impliqués dans plusieurs types d'associations. En effet, le TRAF-C est nécessaire à l'association du TRAF au récepteur CD40 alors que le TRAF-N est requis pour l'association entre les membres de la famille des TRAFs. Les motifs zinc jouent un rôle important dans le recrutement de seconds messagers et de protéines signalétiques intracellulaires formant des homo-/hétéro-dimères (Figure 4.4).^{453, 456, 483}

Chaque membre de la famille des TRAFs lie le CD40 par une séquence qui est reconnue par ce récepteur. Par contre, il est maintenant connu que seuls TRAF2, 3 et 6 lient le récepteur CD40 directement, alors que TRAF1 et 5 se lient indirectement. Le TRAF4 ne semble pas interagir avec le récepteur CD40.⁴⁷⁹ En général, les TNFRs, incluant le CD40, requièrent l'association de plus d'un TRAF pour induire la signalisation intracellulaire.⁴⁶⁰ Le récepteur CD40 contient, dans son domaine cytoplasmique, un site de liaison proximal pour le TRAF6 et un site distal pour le TRAF2, 3 et 5. TRAF1 s'associe au récepteur CD40 seulement lorsque ce dernier est actif et joue le rôle de régulateur, plutôt que d'activateur, en formant un hétéro-dimère avec TRAF2.^{484, 485} Chaque site de liaison peut induire l'activation de différentes voies signalétiques intracellulaires dans plusieurs types cellulaires. Une fois que le CD40L interagit avec le CD40 et que les TRAFs cytoplasmiques s'associent, le récepteur CD40 est internalisé. Par contre, les mécanismes d'internalisation et les voies signalétiques intracellulaires du CD40 qui sont activées peuvent varier d'un type cellulaire à un autre.⁴⁸⁶ Plusieurs études ont rapporté que les récepteurs CD40 se regroupent pour former un signalosome au niveau des radeaux lipidiques, qui sont les domaines insolubles de la membrane plasmique. Sous des conditions de repos, le CD40 est partiellement localisé au niveau des radeaux lipidiques et lorsque ce récepteur est stimulé, il est transloqué davantage dans ces domaines lipidiques.⁴⁶⁰ Il est suggéré que dans la plupart des types cellulaires, la signalisation de l'axe CD40L/CD40 résulte en l'activation de NF- κ B et ce sont les TRAFs et les médiateurs intermédiaires signalétiques qui diffèrent.

Deux voies de signalisation de NF- κ B ont été décrites : la voie canonique (ou classique) et la voie non-canonique. La voie canonique serait principalement activée en réponse aux ligands des récepteurs d'antigènes et de cytokines. Quant à la voie non-canonique, celle-ci serait plutôt activée dans la réponse des récepteurs de la superfamille du TNF, tel que le récepteur de la lymphotoxine- β («*Lymphotoxin- β Receptor*», LT β -R), le récepteur activateur de NF- κ B (RANK), et le CD40.^{487, 488} De plus, la voie canonique implique la kinase IKK β et, subséquemment, la transcription nucléaire des hétéromères p50/RelA alors que la voie non-canonique est activée par IKK α induisant la dégradation de p100 et la translocation de p52/RelB. Il est suggéré que l'activation de la voie canonique de NF- κ B régule la réponse pro-inflammatoire et pro-thrombotique au niveau des plaques athérosclérotiques⁴⁸⁹ alors que la voie non-canonique semble réguler un potentiel auto-régénératif au niveau des HSPCs.⁴⁹⁰ Les interactions CD40-TRAF6 peuvent seulement induire la voie canonique du NF- κ B alors que les interactions CD40-TRAF2, 3 et 5 peuvent induire la voie canonique et non-canonique. De plus, le TRAF3 joue le rôle du TRAF régulateur puisqu'il inhibe la voie signalétique de CD40-TRAF2 et 5 et induit la signalisation du NF- κ B via CD40-TRAF6.⁴⁹¹ D'autre part, des études ont démontré que TRAF2, 5 et 6 semblent réguler plusieurs fonctions cellulaires impliquant les voies signalétiques de NF- κ B et JNK.⁴⁹²

4.2.3 Les membres de la famille des TRAFs et leurs fonctions

Initialement, les TRAFs ont été considérés des médiateurs dans les mécanismes signalétiques des récepteurs du TNF et, plus récemment, leur rôle dans l'axe CD40L/CD40 a été élucidé au niveau de plusieurs fonctions cellulaires. Plusieurs études ont suggéré que les TRAFs régulent ces fonctions de manière différentielle dans chaque type cellulaire. Suite à la translocation des TRAFs aux récepteurs membranaires, ils forment des complexes multi-protéiques et induisent des signalisations intracellulaires, dont la translocation du facteur de transcription NF- κ B et l'activation de JNK, qui peuvent influencer les fonctions cellulaires, telles que l'apoptose, la prolifération, la différenciation, la production d'anticorps et la production de médiateurs intra- ou inter-cellulaires. D'ailleurs, il est maintenant bien établi que les TRAFs sont régulés de manière différentielle et activent différentes voies de signalisations intracellulaires au niveau des différents types cellulaires.⁴⁸³

4.2.3.1 TRAF1

Tel que mentionné précédemment, le TRAF1 peut seulement lier le CD40 suite à l'activation de ce récepteur et l'association des autres TRAFs, particulièrement du TRAF2, pour agir comme régulateur.^{484, 485} Le TRAF1 régule la localisation intracellulaire du TRAF2 et son rôle différentiel serait lié à sa structure unique parmi les membres de la famille des TRAFs. En effet, il a été prouvé qu'un TRAF2 qui ne contient pas le motif zinc RING ne permet pas la translocation et la localisation de cette protéine au niveau des radeaux lipidiques résultant alors en l'inhibition de sa fonction signalétique.⁴⁸⁴ Une autre étude a démontré qu'au niveau des cellules B, TRAF1 et 2 coopèrent dans l'activation engendrée par le CD40 et une déficience de l'un des deux de ces membres de la famille des TRAFs induit une perte de fonction plus significative qu'une déficience en un seul TRAF. Plus spécifiquement, le recrutement de TRAF1 et de TRAF2 serait nécessaire afin d'activer les mécanismes signalétiques de NF- κ B.⁴⁹³ Le TRAF1 serait impliqué dans le processus de dégradation des TRAF2 et 3. Il a été suggéré qu'une déficience en TRAF1 résulte en un plus grand recrutement de TRAF2 au niveau des radeaux lipidiques et alors une dégradation accrue des TRAF2 et 3 en réponse à la signalisation engendrée par le CD40.⁴⁹³ Ces résultats pourraient expliquer l'expression plus prononcée de TRAF1 suite à une stimulation du CD40 dans plusieurs types cellulaires. D'autre part, une surexpression de TRAF1 peut engendrer une dérégulation et une hyper-activation cellulaire affectant négativement les fonctions cellulaires. La stimulation de CD40 avec le CD40L induit des réponses différentielles chez les cellules B et les monocytes. La stimulation du CD40 au niveau des monocytes induit l'augmentation de l'expression de TRAF1 et l'activation d'ERK1/2, promouvant la sécrétion de cytokines, alors que cette voie ne semble pas être impliquée dans la régulation des fonctions des cellules B. Par contre, la voie de JNK et de p38 MAPK, qui jouent un rôle dans la prolifération des cellules B, n'est pas impliquée dans la fonction des monocytes.⁴⁹⁴ Au niveau des cellules endothéliales, une déficience en TRAF1 induit l'expression de MCP-1 et de l'IL-6 suite à une stimulation avec le CD40L.⁴⁹⁵

4.2.3.2 TRAF2

Au cours des années, plusieurs études ont tenté de démontrer le rôle de TRAF2 dans une multitude de fonctions cellulaires. Le domaine RING dans la structure du TRAF2 est responsable

de l'association de ce TRAF à ses récepteurs et des fonctions signalétiques intracellulaires qui en découlent.⁴⁹⁶ Initialement étudié dans le contexte des récepteurs TNF, TNFR-1 et TNFR-2, cette protéine adaptatrice a démontré un rôle double, anti- et pro-apoptotique, dépendamment des voies de signalisation activées, soient NF- κ B et JNK.⁴⁹⁷⁻⁴⁹⁹ Plus particulièrement, une étude a suggéré que la translocation de TRAF2 contribue à la réorganisation des protéines cytoplasmiques entraînant des réponses apoptotiques par la dégradation d'I κ B et l'activation de NF- κ B.⁵⁰⁰ De plus, il semble que les mécanismes signalétiques induits par le TRAF2 inactivent des protéines protectrices, telles que les protéines inhibitrices de l'apoptose cellulaire («*cellular Inhibitor of Apoptosis Proteins*», cIAPs), résultant en une apoptose accrue.^{499, 500} En effet, les cIAPs régulent la dégradation protéosomale du TRAF2 impliqué dans la différenciation des monocytes.⁵⁰¹ Il semble que le TRAF2 est un régulateur des voies signalétiques impliquant le NF- κ B et le JNK même au niveau de l'axe CD40L/CD40.⁴⁸⁴ Le site de liaison de TRAF2 et 3 et la régulation de l'association de ces deux TRAFs sont essentiels au changement d'isotype⁵⁰², à la production d'anticorps et à la prolifération des cellules B⁵⁰³ ainsi qu'à l'activation des voies signalétiques, telles que la p38 MAPK, le JNK et le NF- κ B, dans plusieurs types cellulaires.^{480, 503, 504} D'ailleurs, l'interaction de TRAF2 et 3 semble jouer un rôle important dans la régulation des fonctions cellulaires induites par le CD40L. Plus particulièrement, dans les cellules B à l'état basal, un complexe cytoplasmique est formé entre cIAP1/2, TRAF2, TRAF3 et la protéine kinase inductrice de NF- κ B («*NF- κ B Inducing Kinase*», NIK). Les cIAPs induisent la dégradation de NIK ce qui résulte en l'inhibition de la voie non-canonique de NF- κ B promouvant ainsi l'apoptose de ces cellules. Par contre, lorsque le récepteur CD40 est stimulé, l'activité ubiquitaire ligase des cIAP est dirigée vers TRAF3, induisant la dégradation de ce dernier. Le NIK ne peut alors s'associer au complexe cIAP1/2-TRAF2 et induire la voie non-canonique de NF- κ B, ce qui résulte en la survie des lymphocytes B.^{481, 505, 506} Donc, le TRAF3 joue un rôle négatif dans la régulation de la voie signalétique de NF- κ B engendrée par TRAF2.⁴⁹¹ De plus, au niveau des cellules B, le TRAF2 entre en concurrence avec le TRAF6 pour lier le CD40 et induire l'activation de NF- κ B; par contre, il n'est pas essentiel à l'initialisation de cette voie signalétique.⁵⁰⁷ Une étude a démontré qu'une déficience en TRAF2 et 5 inhibe l'expression de MCP-1 et d'IL-6 suite à une stimulation avec le CD40L dans les cellules endothéliales.⁴⁹⁵ De plus, le laboratoire de Dr Merhi a récemment mis en évidence le rôle de TRAF2 dans la

régulation de l'activité plaquettaire et la formation de thrombus impliquant la voie signalétique de p38 MAPK.⁵⁰⁸

4.2.3.3 TRAF3

Le TRAF3 peut inhiber la signalisation de la voie non-canonique de NF- κ B engendrée par TRAF2 et 5 et induire l'activité transcriptionnelle de NF- κ B induite par le TRAF6.⁴⁹¹ Ces effets sont engendrés principalement par le motif zinc de TRAF3.⁴⁹¹ D'ailleurs, le TRAF3 peut hétérodimériser avec TRAF2 et inhiber la fonction de ce dernier dans l'activation de NF- κ B dans les cellules B.⁵⁰⁴ Une étude a défini le rôle de TRAF3 dans l'athérosclérose en suggérant que les forces de cisaillement élevées inhibent l'activation des cellules endothéliales induites par le CD40L et ce, par une augmentation de l'expression de TRAF3.⁵⁰⁹ Le TRAF3 inhibe l'expression de médiateurs pro-inflammatoires et pro-coagulants dans ces cellules en réponse au CD40L.⁵⁰⁹ D'ailleurs, une étude plus récente sur les cellules endothéliales a démontré que l'inhibition de TRAF3 induit l'expression de MCP-1, de l'IL-6, et de l'IL-8 de manière CD40L-dépendante.⁴⁹⁵ Or, le TRAF3 semble être une cible thérapeutique importante dans la régulation de l'inflammation au niveau des plaques athérosclérotiques. Bien que le TRAF3 semble avoir un effet protecteur au niveau des cellules endothéliales, ce TRAF joue un rôle négatif au niveau des cellules B en induisant la production des ROS de manière CD40-dépendante, par l'entremise de l'association de TRAF3 à la sous-unité cytosolique p40^{phox} de NADPH oxidase, un complexe enzymatique impliqué dans la génération des ROS.⁵¹⁰ Dans le contexte des cellules cancéreuses, le CD40L régule positivement le mRNA de TRAF3 qui, par la suite, induit l'activation de la voie signalétique de JNK et des mécanismes apoptotiques impliquant la caspase-3 et -9.⁵¹¹

4.2.3.4 TRAF4

Le TRAF4 a peu été étudié puisque celui-ci diffère en structure, localisation intracellulaire et fonction des autres membres de la famille des TRAFs. Il semble que le rôle primaire de TRAF4 se trouve au niveau du développement embryonnaire du squelette axial et du tube neural.⁵¹² Parmi, les récepteurs du TNF, le TRAF4 semble interagir seulement avec p75 et LT β -R mais pas avec le CD40.⁵¹³ Par contre, il semble que l'interaction du CD40L avec le CD40 réduit l'expression de TRAF4 dans les cellules humaines de myélome multiple induisant une inhibition de l'apoptose de ces cellules.⁵¹⁴ Dans les cellules B, une activation de CD40 semble augmenter

l'expression de TRAF4.⁵¹⁵ Le rôle du TRAF4 a particulièrement été rapporté au niveau du système nerveux central et des cancers. D'ailleurs, une étude récente a démontré que le TRAF4 serait impliqué dans l'hémostase du système nerveux central par la régulation des processus de myélination.⁵¹⁶ De plus, le TRAF4 serait impliqué dans la régulation de la production d'oxydants et de l'apoptose, en étant capable de jouer le rôle de médiateur anti- et pro-apoptotique.⁵¹³ D'autre part, une étude a élucidé le rôle particulier de TRAF4 dans la régulation de l'immunité innée par laquelle la phosphorylation de ce TRAF par IKK α régule négativement la réponse innée du système immunitaire. Il est d'ailleurs le seul TRAF à réguler l'immunité de manière négative.⁵¹⁷

4.2.3.5 TRAF5

Le TRAF5 est structurellement et fonctionnellement semblable au TRAF2. Par contre, celui-ci ne peut s'associer directement au récepteur CD40 et se lie indirectement en formant des hétéro-oligomères avec TRAF2 et 3, qui eux peuvent lier le CD40 directement.⁴⁹⁶ Les interactions de TRAF2 et 5 peuvent induire l'activation de la voie canonique et non-canonique de NF- κ B.⁴⁹¹ Une étude portant sur les cellules endothéliales a démontré qu'une déficience de TRAF2 et 5 inhibe l'expression CD40L-dépendante de l'IL-6 mais n'a aucun effet sur l'expression de MCP-1 au niveau des plaques athérosclérotiques.⁴⁹⁵ Par ailleurs, une déficience de TRAF5 résulte en une incapacité de prolifération des cellules B suite à une stimulation du CD40.⁵¹⁸

4.2.3.6 TRAF6

Le TRAF6 est le seul membre de la famille des TRAFs qui s'associe à la région proximale membranaire du récepteur CD40. Il a été démontré que le TRAF2 entre en concurrence avec le TRAF6 dans l'association au CD40 pour réguler la voie signalétique de NF- κ B dans les cellules B.⁵⁰⁷ Cependant, une étude portant sur les cellules B a démontré que ce n'est pas le TRAF6, mais plutôt le TRAF2, qui serait impliqué dans le changement d'isotype engendré par le CD40 ainsi que la prolifération et l'activation de NF- κ B, JNK et p38 MAPK dans ces cellules.⁵⁰³ D'autre part, le TRAF6 collabore avec le TRAF2 dans les cellules hématopoïétiques où ce dernier est particulièrement nécessaire pour l'activation des voies signalétiques de NF- κ B, JNK et p38 MAPK.⁴⁸⁰ Le rôle de TRAF6 a été élucidé au niveau de ces voies signalétiques ainsi que dans la

voie signalétique de l'Akt, un médiateur intracellulaire important dans la régulation de la survie et de l'apoptose. Il semble que le TRAF6 ne lie pas seulement le récepteur CD40 directement mais peut également s'associer indirectement au TRAF2.⁴⁸⁰ Zirlik *et al.* ont démontré que l'inhibition de TRAF6 induit l'expression de MCP-1 de manière CD40L-dépendante au niveau des cellules endothéliales.⁴⁹⁵ Le rôle de TRAF6 a particulièrement été souligné dans les maladies vasculaires, et, plus spécifiquement, dans l'athérosclérose. L'interaction du TRAF6 avec le CD40 régule la formation du néointima et du remodelage artériel. Lorsque cette interaction est altérée, la capacité de remodelage des leucocytes est entravée due à une réduction de l'activité dégradante des protéases et de l'infiltration de cellules inflammatoires.⁵¹⁹ Ceci favorise un profil anti-inflammatoire de ces leucocytes, démontré par la production accrue de l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire.⁵²⁰ D'ailleurs, suite à l'endommagement artériel, la signalisation de l'axe CD40L/CD40 induit le recrutement des TRAFs, particulièrement de TRAF6, et favorise l'expression de gènes pro-inflammatoires, tels que le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6, le MCP-1, et des molécules d'adhésion impliquées dans le recrutement des leucocytes, tels que l'ICAM-1 et le VCAM-1, via la voie signalétique de NF- κ B.⁵²¹ L'interaction CD40-TRAF6, induite par le CD40L, active la voie du NF- κ B et promeut la survie des SMCs ainsi que la formation du néointima.⁵²¹ Par ailleurs, une déficience de CD40 ou l'inhibition de TRAF6 semblent réduire l'accumulation de monocytes/macrophages et l'expression de médiateurs inflammatoires, tels que l'ICAM-1, le VCAM-1, le MCP-1, la MMP-9 et le TF, via un effet inhibiteur de la voie NF- κ B.⁵²² Ceci suggère que l'interaction CD40-TRAF6 est une cible thérapeutique dans les maladies vasculaires, dont la resténose. L'effet thérapeutique de cette approche a été élucidé au niveau des cellules HEK293 et des cellules B mettant en évidence le rôle de TRAF6 dans la régulation de l'apoptose cellulaire, et ce de manière indépendante de NF- κ B, alors qu'une apoptose demeure observée dans les cellules comprenant des mutations de TRAF2 et 3.⁵²³

4.2.3.7 JAK3

En plus des TRAFs, le JAK3 est associé aux mécanismes intracellulaires induits par l'axe CD40L/CD40. JAK3 est membre de la famille des kinases Janus qui sont impliquées dans les signalisations engendrées par les cytokines et les facteurs de croissance. Il s'associe au récepteur CD40 par l'entremise de séquences riches en proline de la région proximale de CD40. Cette association au CD40 induit la phosphorylation des résidus tyrosines au niveau de JAK3 induisant

l'activation de ce dernier et, subséquemment, de STAT3.⁵²⁴ Contrairement aux études démontrant l'implication essentielle des TRAFs dans la régulation des fonctions des cellules B, une étude a démontré que JAK3 n'est pas nécessaire au changement d'isotype, à la prolifération et à l'expression de marqueurs de surface dans les cellules B.⁴⁸² L'implication de JAK3 a été soulignée dans les monocytes, induisant l'activation de STAT5a, ce qui n'est pas le cas dans les cellules B.⁵²⁵ De plus, la stimulation de CD40 au niveau des cellules dendritiques induit la maturation de ces cellules, la production de l'IL-12, et l'expression de MHC et de molécules co-stimulatrices.^{526, 527}

4.3 L'axe CD40L/CD40 dans les fonctions cellulaires

L'axe CD40L/CD40 a été décrit dans les fonctions cellulaires des lymphocytes T, lymphocytes B, plaquettes, cellules dendritiques, neutrophiles, monocytes et macrophages, cellules endothéliales et SMCs.^{284, 460} Bien que les premières études sur l'axe CD40L/CD40 ont décrit la fonction de cette voie dans l'immunité et l'apoptose, son implication dans les maladies inflammatoires et cardiovasculaires ont plus récemment fait le sujet de plusieurs études. Notre intérêt porte sur la fonction du CD40L/CD40 dans les plaquettes et les cellules endothéliales afin de comprendre l'implication de cet axe dans les EPCs au niveau de l'athéromatose.

4.3.3 Les plaquettes

Le CD40L en circulation provient principalement des plaquettes et peut réguler la fonction de ces dernières ou des autres types de cellules vasculaires. L'implication du CD40L plaquettaire dans l'activation des plaquettes et la formation de thrombus ainsi que dans la stabilisation de la plaque athéromateuse a été observée dans le développement des maladies cardiovasculaires.²⁷⁶ D'ailleurs, les plaquettes induisent un profil pro-inflammatoire au niveau des cellules endothéliales via des interactions CD40L-CD40. Plus particulièrement, l'expression des molécules d'adhésion, telles que le VCAM-1, l'ICAM-1 et l'E-sélectine, ainsi que la production des chimiokines, telles que le MCP-1, l'IL-6 et l'IL-8, ont été démontrées dans les cellules endothéliales.²⁸³ De plus, l'activation plaquettaire induite par le CD40L, via la GPIIb/IIIa,⁴⁷⁶ favorise les interactions des plaquettes avec les leucocytes, une étape importante dans le recrutement de ces dernières aux sites de lésions vasculaires, et contribue à la pathogenèse de l'athérosclérose.⁵²⁸ Dans ce contexte, le laboratoire de Dr Merhi a démontré que

l'interaction CD40L/CD40 dans les plaquettes induit l'activation et l'agrégation de ces cellules et exacerbe la formation de thrombus via un mécanisme signalétique qui implique TRAF2/Rac1/p38 MAPK.⁵⁰⁸ À part son implication dans les maladies cardiovasculaires, le CD40L plaquettaire régule l'immunité adaptative.⁵²⁹ Les microparticules plaquettaires expriment aussi le CD40L et peuvent interagir avec d'autres cellules vasculaires. Les microparticules dérivées des plaques athéromateuses peuvent stimuler la prolifération des cellules endothéliales et promouvoir l'angiogenèse via l'interaction avec le CD40 des cellules endothéliales.⁵³⁰

4.3.4 Les cellules endothéliales

L'axe CD40L/CD40 a aussi été étudié dans la fonction des cellules endothéliales. Le CD40L, des lymphocytes T, peut interagir avec le CD40 des cellules endothéliales et induire l'expression de MMPs, telles que la MMP-1, MMP-2, MMP-3 et MMP-9, résultant en un potentiel accru de néovascularisation et de remodelage vasculaire dans la formation de la plaque athérosclérotique.⁵³¹ De plus, le sCD40L induit l'expression du VEGF au niveau des cellules endothéliales ainsi que la prolifération et le potentiel angiogénique de ces cellules^{279, 462} et ce via une voie signalétique impliquant le PI3K/Akt. Par contre, ce potentiel angiogénique est limité et réduit par une augmentation de la production des ROS et une diminution de la biodisponibilité du NO.⁵³² Des distinctions ont été notées entre la forme soluble du CD40L (sCD40L) et la forme membranaire du CD40L (mCD40L). Chen *et al.* suggèrent que le mCD40L induit la production et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et l'expression des molécules d'adhésion. L'internalisation du récepteur CD40 induit l'activation de plusieurs voies signalétiques, telles que l'Akt et le NF- κ B, qui régulent plusieurs fonctions cellulaires.⁴⁸⁶ L'activation des cellules endothéliales via CD40, par le CD40L, induit l'expression des molécules d'adhésion, telles que le VCAM-1, l'ICAM-1 et l'E-sélectine, et les chimiokines, telles que l'IL-6, l'IL-8 et le MCP-1, ainsi que le TF, les MMPs et le sCD40L et ce, via le recrutement de différents TRAFs au récepteur CD40.^{283, 284, 495, 533} Cette expression accrue des molécules d'adhésion permet le recrutement des leucocytes et promeut l'athérogenèse.⁵³⁴ Par contre, une étude récente suggère que cet axe inhibe la voie signalétique de l'Akt/eNOS et résulte en la réduction du potentiel de migration des cellules endothéliales.⁵³⁴

4.3.5 Les EPCs

Bien que les études aient décrit le rôle de l'axe CD40L/CD40 au niveau de plusieurs types cellulaires, l'implication de cet axe dans les EPCs nécessite certes des études plus approfondies. Une étude récente a démontré que le CD40L serait impliqué dans le développement des cellules souches et progénitrices hématopoïétiques («*Hematopoietic Stem and Progenitor Cells*», HSPCs) et pourrait promouvoir la différenciation de ces cellules en cellules dendritiques.⁵³⁵ Les EPCs ont fait le sujet d'une seule étude qui a décrit l'implication de l'axe CD40L/CD40 dans leur fonction cellulaire. Récemment, Hristov *et al.* ont suggéré que la dysfonction endothéliale est due aux niveaux élevés de sCD40L plasmatiques qui résultent en une fonction altérée des EPCs. Cette étude a démontré que le CD40L induit la production des ROS et réduit la viabilité et la prolifération des EPCs. Chez des souris déficientes en CD40, les EPCs démontrent une fonction bénéfique en limitant le développement du néointima par la possibilité de réendothélialisation. Conséquemment, les EPCs traitées au CD40L induisent la progression du néointima et démontrent une incorporation atténuée au niveau des lésions vasculaires.⁵³⁶

4.4 Le rôle physiologique de l'axe CD40L/CD40

Le rôle de l'axe CD40L/CD40 a été étudié dans plusieurs processus physiologiques, dont l'immunité humorale, l'immunité cellulaire et l'apoptose. Le rôle du CD40 a plus particulièrement été le sujet des études concernant les cellules B dans l'immunité humorale et les cellules dendritiques dans l'immunité cellulaire.

L'immunité humorale est principalement responsable de la différenciation des cellules B en plasmocytes et de la production d'anticorps (IgA, IgE, IgG et IgM) par ces cellules. Ces processus requièrent l'activation des cellules B de manière CD40-dépendante par les cellules T CD4⁺ activées, qui expriment le CD40L. Par ailleurs, ces dernières sont elles-mêmes activées par les APCs, principalement par les cellules dendritiques. L'activation des cellules dendritiques par le CD40L induit l'expression des molécules de surface co-stimulatrices CD80/CD86 et CD28,^{481, 537} qui permettent l'interaction de ces cellules avec les cellules T et induisent la différenciation de ces dernières en cellules T effectrices et régulatrices par la relâche de l'IL-12 et de l'IL-10.⁵³⁸

L'immunité cellulaire implique aussi l'axe CD40L/CD40. D'ailleurs, cette interaction est à la base de la relâche de cytokines inflammatoires par une panoplie de types cellulaires dans les

maladies auto-immunes dépendantes des cellules T.^{446, 481} Le CD40L plaquettaire a été corrélé avec l'immunité cellulaire. Il semble que le CD40L plaquettaire peut activer les cellules dendritiques et contribuer à la prolifération et à l'accumulation de cellules T CD8⁺ au niveau des tissus infectés.⁵²⁹

Le CD40L joue également un rôle dans l'apoptose cellulaire. Dans certains types cellulaires, le CD40L induit des signaux apoptotiques, par l'expression de Bax, Bak et des caspases, alors que dans d'autres cellules, ce médiateur favorise la survie cellulaire, par l'expression de Bcl-XL.⁵³⁹ Particulièrement, au niveau des cellules B, le CD40L joue le rôle d'un médiateur anti-apoptotique, promouvant la survie, la différenciation et la prolifération de ces cellules.^{540, 541} D'ailleurs, différentes voies intracellulaires activées via CD40 régulent les fonctions anti- et pro-apoptotiques. Alors que l'activation de NF- κ B et d'AP-1 peut agir de manière anti-apoptotique, l'activation de JNK favorise l'augmentation de l'expression de FasL, un récepteur apoptotique, résultant en la mort cellulaire.^{500, 542, 543} De plus, une étude a démontré qu'au niveau des cellules d'une lignée de lymphome, l'activation de CD40 induit une protéine anti-apoptotique c-FLIP via la voie signalétique de NF- κ B.⁵⁴⁴

4.5 L'axe CD40L/CD40 dans l'athéromatose

L'implication de l'axe CD40L/CD40 a été rapportée dans plusieurs maladies, dont les maladies inflammatoires de l'intestin, le cancer, la sclérose en plaques, les maladies auto-immunes (le lupus érythémateux et l'arthrite rhumatoïde), le diabète, l'anémie à cellules falciformes, ainsi que l'athérosclérose et l'athéromatose.⁴⁵³ Il est suggéré que l'axe CD40L/CD40 est impliqué dans le développement de la plaque athéromateuse et que le blocage de cet axe pourrait réduire l'athérosclérose et induire la formation d'une plaque plus stable, caractérisée par une plaque faiblement inflammatoire, exhibant moins de macrophages et de lymphocytes T, et étant considérablement fibreuse, c'est-à-dire plus riche en collagène.^{284, 460}

Depuis le début des années 2000, le CD40L est considéré un médiateur inflammatoire dans le développement de maladies cardiovasculaires. Le rôle des plaquettes dans l'athérosclérose, et particulièrement l'athéromatose, est maintenant bien établi.³⁶² Les plaquettes sont la source majeure de CD40L en circulation. Le CD40L joue trois rôles principaux dans la progression de l'athéromatose : l'inflammation, la thrombose et la resténose. Au niveau de l'inflammation, le CD40L induit la production et la relâche de médiateurs inflammatoires par les cellules

vasculaires et la sécrétion de MMPs, particulièrement le MMP-2 et le MMP-9,⁵⁴⁵ par les cellules résidant au site de la plaque athéromateuse. L'interaction du CD40L avec le CD40 au niveau des cellules circulantes ou de la paroi vasculaire endommagée favorise le recrutement de leucocytes qui contribuent à l'affaiblissement de la plaque et au développement de la thrombose et ce de manière ROS-dépendante. D'ailleurs, le CD40L en circulation induit la relâche de MCP-1 et davantage du CD40L par les cellules endothéliales, promouvant ainsi le recrutement des cellules mononucléaires et des plaquettes au niveau de la plaque.²⁷⁸ Cette dysfonction endothéliale favorise l'athérogenèse. Le récepteur MAC-1 du CD40L joue aussi un rôle important dans le recrutement des cellules qui participent à l'inflammation.⁴⁷⁰ De plus, le CD40L dérivé des plaquettes peut lier le CD40 au niveau des neutrophiles et induire la relâche des ROS promouvant davantage l'activation plaquettaire et la relâche de CD40L.⁵⁴⁶ Cette boucle de rétraction positive contribue au développement de l'athérogenèse. En bref, la relâche des cytokines pro-inflammatoires, la biodisponibilité réduite du NO, la production des ROS et l'expression accrue des molécules d'adhésion promeuvent le recrutement et la migration de leucocytes et induisent la formation et la progression de la plaque athéromateuse.²⁷⁷ D'autre part, le CD40L permet de stabiliser la formation de thrombus en inhibant le processus de réendothélialisation et en permettant la prolifération des SMCs et la formation du néointima créant ainsi une resténose.^{276, 532, 547} Il semble que l'effet thrombotique du CD40L soit corrélé à l'intégrine GPIIb/IIIa des plaquettes. L'activation des plaquettes par la GPIIb/IIIa induit la relâche du CD40L et ce dernier peut également lier son récepteur GPIIb/IIIa pour activer d'autres plaquettes promouvant ainsi la stabilité du thrombus sous des grandes forces de cisaillements.^{276, 475} Urbich *et al.* ont suggéré que le CD40L inhibe la relâche du NO et la migration des cellules endothéliales par une augmentation de la production des ROS. L'interaction de CD40L avec CD40 peut alors inhiber le processus de réendothélialisation et promouvoir la prolifération des SMCs résultant en une resténose.⁵³²

4.5.1 L'initiation, la progression, la stabilisation de la plaque athéromateuse et la thrombose

Les phases principales qui caractérisent le développement de l'athérothrombose sont: l'initiation, la progression et la stabilisation de la plaque athéromateuse suivi de la rupture et de la formation de thrombus. Le CD40L et son récepteur le CD40 sont exprimés au niveau de

plusieurs types cellulaires dans les lésions athérosclérotiques, dont les lymphocytes T, les plaquettes, les monocytes/macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques, les cellules endothéliales et les SMCs. Aux stades précoces, ces molécules inflammatoires sont faiblement exprimées. Cependant, leur expression est accrue au cours de la progression de la plaque athéromateuse.⁵⁴⁸ Il est proposé que l'axe CD40L/CD40 soit impliqué dans chaque stade du développement de la plaque athérosclérotique.

L'athérosclérose débute avec le dépôt du cholestérol, ou LDL, au niveau de la paroi vasculaire. Lors de l'initiation de l'athérosclérose, les cellules endothéliales sont activées par l'LDL oxydé («*oxidized LDL*», oxLDL) induisant ainsi une expression accrue du CD40L et du CD40. De plus, l'activation des monocytes et des lymphocytes T contribue à l'augmentation de la sécrétion de médiateurs inflammatoires qui induisent davantage l'expression du CD40 au niveau des cellules endothéliales.⁵⁴⁷ Ceci stimule la relâche des chimiokines et l'expression de molécules d'adhésion qui jouent un rôle primordial dans le recrutement des leucocytes et leur transmigration vers l'intima. Un des médiateurs importants dans ce processus est le CD40L qui, lors de son interaction avec le CD40, induit l'expression des molécules d'adhésion, telles que l'ICAM, le VCAM et l'E-sélectine au niveau de l'endothélium. Ces molécules d'adhésion sont responsables du recrutement des leucocytes, particulièrement les monocytes qui se différencient en macrophages et relâchent des médiateurs inflammatoires importants, tels que le MCP-1, le RANTES, le MIP-1 α et le MIP-1 β .⁵⁴⁸ La stimulation des cellules endothéliales par le CD40L induit la relâche d'une panoplie de facteurs pro-inflammatoires et l'expression des molécules d'adhésion permettant l'adhésion de monocytes et de lymphocytes T et leur transmigration vers l'intima à travers l'endothélium.⁵⁴⁷ D'autre part, les interactions plaquettes-cellules endothéliales et plaquettes-leucocytes via CD40L/CD40 participent au développement de l'inflammation.⁵⁴⁷

La néovascularisation de la plaque athéromateuse implique la livraison de nutriments et de l'oxygène aux cellules résidant au niveau de la plaque. Le CD40L joue un rôle important dans l'étape de la vascularisation de la plaque en induisant la prolifération et la motilité des cellules endothéliales et promeut l'expression de facteurs pro-angiogéniques, tel que le VEGF.⁴⁶² Ces nouveaux vaisseaux peuvent induire davantage le recrutement de cellules immunitaires et contribuer à la déstabilisation de la plaque.

La progression de la plaque athéromateuse est principalement due à l'accumulation de cellules inflammatoires au niveau de la lésion athérosclérotique. Les macrophages deviennent

des cellules spumeuses, par la phagocytose de lipides, et les lymphocytes T et les neutrophiles se domicilient au niveau de la plaque. Ces cellules ne survivent pas au sein de la plaque et des processus d'apoptose et de nécrose se produisent. Par la suite, la migration de SMCs induit la formation d'une matrice de collagène formant ainsi une chape fibreuse. Le CD40L joue un rôle important dans la prolifération et la relâche de cytokines inflammatoires et des MMPs par les SMCs induisant la formation du néointima et de l'hyperplasie.⁵⁴⁷ En stimulant le CD40 au niveau des macrophages par le CD40L principalement exprimé par les lymphocytes T, ces cellules relâchent une multitude de cytokines inflammatoires, telles que l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8, le TNF- α et IFN- γ , ainsi que des enzymes dégradantes de la matrice, telles que MMP-1, MMP-2, MMP-3 et MMP-9, qui affaiblissent la chape fibreuse, induisant ainsi la déstabilisation de la plaque et une susceptibilité à la rupture.⁵⁴⁷⁻⁵⁴⁹ De plus, le CD40L/CD40 serait impliqué dans la formation d'un centre nécrotique au sein de la plaque athéromateuse.²⁸⁴ La lésion est alors fibreuse et formée principalement de protéines de la matrice extracellulaire, de leucocytes, de cellules spumeuses (dérivées des macrophages) et des SMCs.⁵⁴⁷

Une plaque susceptible à la rupture est caractérisée par un contenu lipidique et un microenvironnement inflammatoire accru ainsi qu'une diminution du dépôt de protéines extracellulaires et de SMCs.⁵⁴⁷ Ce processus implique l'activité des MMPs au niveau des SMCs et des cellules endothéliales.⁵⁴⁷ La rupture de la plaque est l'étape avancée de la formation de la plaque athéromateuse et implique des événements thrombotiques importants. Ce processus est engendré principalement par les plaquettes qui jouent un rôle dans la thrombose et la coagulation. En effet, la rupture de la plaque induit l'exposition de la matrice extracellulaire et, par la suite, le recrutement et l'activation plaquettaire qui forment un agrégat. C'est à ce stade qu'on décrit la plaque comme étant vulnérable puisque la paroi vasculaire n'est plus protégée des composantes pro-thrombotiques et pro-coagulantes en circulation. La perte de collagène fibrillaire de la chape fibreuse induit la rupture de la plaque et l'exposition de la matrice extracellulaire. D'ailleurs, le CD40 serait impliqué dans la déstabilisation de la plaque et le remodelage dû au profil pro-inflammatoire présenté dans la formation de la plaque athéromateuse.^{447, 549}

Suite à la rupture de la plaque, l'axe CD40L/CD40 est également impliqué dans la formation de thrombus. La stimulation du CD40 au niveau de plusieurs types cellulaires, dont les cellules endothéliales, les macrophages et les SMCs, induit la relâche de TF favorisant ainsi la

formation de thrombus plaquettaire et la coagulation. D'autre part, la signalisation du CD40L via son récepteur GPIIb/IIIa plaquettaire promeut la formation et la stabilisation des agrégats plaquettaires.^{528, 548} Le laboratoire de Dr Merhi a récemment démontré que l'interaction du CD40L avec son récepteur CD40 au niveau des plaquettes induit leur activation et leur agrégation et exacerbe la formation de thrombus.⁵⁰⁸

Les microparticules plaquettaires sont aussi impliquées au niveau de la plaque athérosclérotique. Une étude a démontré que les microparticules, exprimant le CD40L, isolées de lésions athérosclérotiques chez l'humain, peuvent stimuler les cellules endothéliales via CD40 et favoriser la prolifération et le potentiel angiogénique de ces dernières.⁵³⁰ Il est donc postulé que les microparticules seraient impliquées dans la vascularisation de la plaque induisant ainsi sa susceptibilité.⁵³⁰

4.6 Le CD40L et son implication clinique

4.6.1 Le CD40L soluble : un indicateur de risque cardiovasculaire

Le CD40L a suscité l'intérêt de la recherche clinique et fondamentale. En effet, le sCD40L est maintenant considéré par certains chercheurs comme un biomarqueur important de risque cardiovasculaire.^{550, 551} Plus particulièrement, les patients souffrant de syndromes coronariens aigus expriment plus de CD40L au niveau des plaquettes.⁵⁵² Le CD40L a également été corrélé avec d'autres biomarqueurs inflammatoires, dont le CRP et l'IL-6.⁴⁵³ Cependant, il n'est pas clair si le niveau élevé de sCD40L est le résultat ou la cause des événements cardiovasculaires. Pour l'instant, des niveaux élevés du sCD40L en circulation ont été corrélés avec l'incidence de maladies cardiovasculaires, dont l'athérosclérose, l'athérombose, l'infarctus du myocarde, et l'angine.

4.6.2 Les études cliniques et la thérapie

Plusieurs études cliniques ont démontré que les niveaux de sCD40L sont corrélés avec les risques cardiovasculaires.^{550, 551} En effet, l'axe CD40L/CD40 semble être une cible thérapeutique importante au niveau des maladies cardiovasculaires et d'autres manifestations cliniques, dont les maladies auto-immunes et les maladies inflammatoires. Cet axe a fait le sujet de plusieurs études qui visent à bloquer l'interaction du CD40L avec le CD40 pour réduire le

profil inflammatoire et thrombotique impliqué dans le développement de maladies cardiovasculaires (Tableau 4.2).⁴⁵² Des anticorps anti-CD40L, tel que le BG9588, ont été considérés comme approche thérapeutique.⁵⁵³ Par contre, dû aux événements thromboemboliques observés, cette approche a été terminée et des approches alternatives ont été envisagées. D'ailleurs, une nouvelle approche thérapeutique est l'utilisation de RNAi dans le silençage de gènes qui a été suggérée dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde⁵⁵⁴ et pourrait être considérée au niveau des maladies inflammatoires.⁵⁵⁵ En effet, la dérégulation de cet axe a été discutée au niveau des maladies auto-immunes et pourrait être une approche importante pour cibler l'axe CD40L/CD40 dans les maladies cardiovasculaires.⁵⁵⁶ Une étude a démontré que l'estradiol pourrait prévenir l'expression du CD40L et du CD40 dans les cellules endothéliales et inhiber l'adhésion des neutrophiles.⁵⁵⁷ D'autre part, l'utilisation de la vitamine C antioxydante a démontré un potentiel de réduction de la relâche du sCD40L par les plaquettes activées.⁵⁵⁸ Par ailleurs, l'étude clinique CAPTURE a démontré que l'administration de l'abciximab,⁵⁵¹ un bloqueur de l'intégrine GPIIb/IIIa plaquettaire, peut être bénéfique pour les patients exhibant des niveaux élevés de CD40L puisque ces patients présentent un plus grand risque de mortalité et de récurrence de l'infarctus du myocarde.^{559, 560}

Trois approches principales ont été décrites pour contrer les effets de l'axe CD40L/CD40 : les composés anti-plaquettaires et anti-thrombotiques, les statines et les thiazolidinediones.²⁷⁷ Les anti-plaquettaires ont été considérés puisque les plaquettes représentent la source principale de sCD40L. Le clopidogrel, un inhibiteur du récepteur de l'ADP, inhibe la relâche de CD40L par les plaquettes activées par l'ADP.⁵⁶¹ De plus, l'inhibition de COX par l'aspirine peut réduire les niveaux de CD40L produits et relâchés.⁴⁷⁷ D'autre part, l'étude clinique MIRACL a démontré que les statines peuvent réduire la concentration du CD40L plasmatique et les risques cardiovasculaires.^{562, 563} Les thiazolidinediones, qui sont des agonistes de PPAR γ , peuvent réduire les concentrations du sCD40L plasmatique. En effet, l'administration de rosiglitazone réduit les niveaux du CD40L circulant chez des patients souffrant de diabète et des maladies des artères coronaires.⁵⁶⁴

Tableau 4.2 : Approches thérapeutiques utilisées pour cibler l'axe CD40L/CD40

Approche	Mécanisme d'action	Effet	Références
RNAi	Silencage post-transcriptionnel	Réduction de l'expression de CD40	Pluvinet et al. (2004) ⁵⁵⁵
Anticorps anti-CD40L	Interruption de l'interaction CD40-CD40L	Inhibition de la cascade inflammatoire par une compétition avec le CD40L	Boumpas et al. (2003) ⁵⁶⁵ Grammer et al. (2003) ⁵⁶⁶
Estradiol	Lie le récepteur α de l'estrogène (ER α)	Réduit l'expression du CD40 et du CD40L induite par le IFN- γ dans les cellules endothéliales	Geraldes et al. (2006) ⁵⁵⁷
Antioxydants (vitamine C, dipyridamole, seleno-L-méthionine, N-acetylcystéine) et inhibiteurs de GPIIb/IIIa	«Scavenger» des ROS et inhibiteurs plaquettaires	Atténuation de la relâche de sCD40L par les plaquettes et réduction du stress oxydatif dans les cellules endothéliales	Nannizzi-Alaimo et al. (2003) ⁴⁷⁷ Chakrabarti et al. (2005) ⁵⁶⁷ Chakrabarti et al. (2007) ²⁷⁸ Chen et al. (2007) ⁵⁶⁸

Inspiré de Rizvi *et al.* CD40-CD40 ligand interactions in oxidative stress, inflammation and vascular disease. *Trends Mol Med.* 2008;14:530-538

Chapitre 5

Projet de recherche

5.1 Problématique

Dans le cadre général des maladies cardiovasculaires et, plus spécifiquement, dans le syndrome coronarien aigu, notre intérêt porte sur le rôle des cellules endothéliales progénitrices (EPCs) dans la thrombogenèse et les processus de réparation vasculaire. Les EPCs sont des précurseurs endothéliaux qui jouent un rôle émergent dans la réparation vasculaire, la thérapie cellulaire et la médecine régénérative. Le recrutement des EPCs aux sites des lésions vasculaires est facilité par les plaquettes. Dans des études antérieures, le laboratoire de Dr Merhi a démontré que les EPCs lient et inhibent l'activation et l'agrégation des plaquettes et réduisent ainsi les réactions thrombotiques. Il semble que les plaquettes et les EPCs interagissent pour moduler leurs fonctions respectives. Plus récemment, nous avons réussi à différencier deux sous-types d'EPCs: les EPCs précoces, ou «*early*», et tardives, ou «*late*», chacune distincte dans sa morphologie, phénotype et fonction. Nous avons aussi trouvé que ces EPCs expriment le CD40 d'une façon constitutive, alors que les plaquettes sécrètent et constituent la source principale de son ligand le CD40L. Il est connu que l'axe CD40L/CD40 module la réponse thrombo-inflammatoire par une cascade de signalisation intracellulaire. Le CD40L, étant exprimé et sécrété par les plaquettes, pourrait réguler la fonction des EPCs et moduler leurs propriétés anti-thrombotiques et angiogéniques durant la réparation vasculaire ce qui pourrait influencer le processus de l'hémostase vasculaire.

5.2 Hypothèse et objectifs

Hypothèse principale: Le sCD40L module la fonction des EPCs et leur contribution à la fonction plaquettaire et à l'angiogenèse.

Objectifs de recherche:

- I. Différencier et caractériser les EPCs et démontrer l'existence de l'axe CD40L/CD40/TRAFs dans les «*early*» et «*late*» EPCs.
- II. Étudier les effets des «*early*» EPCs sur l'agrégation plaquettaire et vérifier l'implication de l'axe CD40L/CD40 dans ce processus.
- III. Déterminer les effets du sCD40L sur la sécrétion des métalloprotéinases (MMPs) par les «*early*» EPCs et vérifier l'implication de l'axe CD40L/CD40 dans l'angiogenèse.

5.3 Signification du projet

Nous anticipons identifier le rôle du sCD40L dans la fonction des EPCs et comment celles-ci influencent l'athérombose. Ainsi, ces notions fondamentales pourront constituer la base pour planifier des études cliniques futures afin de corréler la relation entre le niveau de sCD40L circulant, le nombre des EPCs dans la circulation et l'incidence des maladies cardiovasculaires, plus particulièrement l'athérosclérose et la thrombose dans le syndrome coronarien aigu.

Chapitre 6

Contribution Scientifique

Mise en contexte pour le premier article :

Soluble CD40 ligand impairs the anti-platelet function of peripheral blood early outgrowth cells via increased production of reactive oxygen species

Dans l'hémostase vasculaire, l'interaction des plaquettes avec la paroi vasculaire et les cellules sanguines est nécessaire durant le processus de la réparation vasculaire. Il est maintenant connu que les plaquettes jouent un rôle important dans le recrutement des leucocytes et des cellules progénitrices aux sites d'endommagement vasculaire. Actuellement, l'utilisation des EPCs comme cible thérapeutique fait l'objet de plusieurs études fondamentales et cliniques dans le domaine de la réparation et de la régénération vasculaire. En effet, il est bien établi que les EPCs servent de cellules protectrices lors des lésions vasculaires. Elles modulent la réponse vasculaire par la relâche d'une multitude de facteurs vasoactifs et par leur incorporation et différenciation en cellules endothéliales aux sites des lésions vasculaires. Cette capacité protectrice attribuée aux EPCs a été explorée au niveau des stents capteurs d'EPCs dans le but de limiter les réactions thrombo-inflammatoires associées à l'implantation des stents dans les maladies coronariennes. Plus particulièrement, le rôle des «*early*» EPCs, qui sont également nommées «*early outgrowth cells*» (EOCs), a été le sujet de plusieurs études puisque ces cellules offrent un profil paracrine important par la relâche de plusieurs médiateurs anti-thrombotique, anti-inflammatoire et pro-angiogénique.

Le laboratoire de Dr Merhi a rapporté antérieurement que les plaquettes interagissent avec les EPCs et modulent leurs fonctions et que ces dernières peuvent également moduler la fonction des plaquettes. Plus spécifiquement, Il a été démontré que les EPCs interagissent avec les plaquettes via un mécanisme impliquant la P-sélectine et inhibent leur adhésion, activation et agrégation ainsi que la formation de thrombus via l'expression de COX et la sécrétion de PGI₂. Plus récemment, nous avons démontré que les EPCs expriment constitutivement le récepteur inflammatoire CD40 et il est bien établi que les plaquettes sont la source principale de la forme soluble de son agoniste, le sCD40L, dans la circulation. Alors que le laboratoire de Dr Merhi a précédemment démontré que le sCD40L induit l'activation et l'agrégation des plaquettes ainsi que la formation de thrombus, le rôle du sCD40L dans la fonction anti-thrombotique et angiogénique des EPCs n'a pas encore été élucidé. Dans ce travail nous avons voulu étudier la

fonction de l'axe CD40L/CD40 dans les EOCs et tester l'hypothèse que cet axe affecte la fonction des EOCs et renverse leur effet inhibiteur sur les plaquettes. Notre focus dans le cadre de ce travail était les «*early*» EPCs ou EOCs puisque cette population est générée en quelques jours de culture et elle est surtout responsable de la relâche d'une multitude de facteurs qui influencent de manière paracrine la fonction des autres cellules du système vasculaire. Ainsi, la portée de cette étude pourra contribuer à expliquer le lien qui existe entre des niveaux élevés de sCD40L, la fonction réduite des EOCs, et les complications thrombotiques chez les patients souffrant de maladies cardiovasculaires.

Contribution des auteurs

Lara Bou Khzam : Planification et exécution de la majorité des expériences, analyse des résultats, rédaction et correction de l'article.

Ahmed Hachem : Participation aux expériences d'immunoprécipitation et correction de l'article.

Younes Zaid : Participation aux expériences d'agrégation plaquettaire.

Rahma Boulahya: Participation à l'isolation des PBMCs et à la culture des EPCs et assistance dans l'exécution de quelques expériences.

Walid Mourad : Planification de l'étude et correction de l'article.

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

ORIGINAL ARTICLE

Soluble CD40 ligand impairs the anti-platelet function of peripheral blood angiogenic outgrowth cells via increased production of reactive oxygen species

Lara Bou Khzam¹; Ahmed Hachem¹; Younes Zaid¹; Rahma Boulahya¹; Walid Mourad²; and Yahye Merhi^{1,2}

¹ Laboratory of Thrombosis and Haemostasis, Montreal Heart Institute, Québec, Canada

² Department of Medicine, Université de Montréal, Québec, Canada

Running title: Effect of sCD40L on EOCs in platelet aggregation

World count: abstract (204 words), original article (3339 words)

Correspondence: Yahye Merhi, Laboratory of Thrombosis and Haemostasis, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger, Montréal, Québec, Canada, H1T 1C8; Tel: (514) 376-3330 ext. 3035; Fax: (514) 376-1355

Summary

Adult peripheral blood angiogenic early outgrowth cells (EOCs), also known as early endothelial progenitor cells, interact with other blood and vascular cells and may regulate atherothrombosis. We have previously shown that endothelial progenitor cells inhibit platelet function and thrombus formation. The CD40L/CD40 axis is a thrombo-inflammatory mediator that affects platelet and endothelial functions. It has been shown that EOCs express CD40, whereas platelets represent the major source of its soluble ligand (sCD40L), which impairs EOC function. We aimed to test the hypothesis that the sCD40L/CD40 axis affects the anti-platelet function of EOCs. Human peripheral blood mononuclear cell-derived EOCs in culture inhibited platelet aggregation. Pre-treatment of EOCs with sCD40L reduced their inhibitory effect on platelet aggregation in a CD40-dependent manner. EOCs viability and release of the anti-aggregating agents, prostacyclin and nitric oxide, were not affected by sCD40L. However, production of reactive oxygen species (ROS) was increased in sCD40L-treated EOCs. Blockade of ROS reversed the effects of sCD40L-treated EOCs on platelet aggregation. This study reveals that the sCD40L/CD40 axis impairs the anti-platelet properties of EOCs through increased production of ROS. These data may explain the link between elevated levels of sCD40L, impaired activity of EOCs and enhanced platelet reactivity, and consequently the occurrence of atherothrombotic disease.

Keywords

CD40, CD40L, early outgrowth cells, platelets, reactive oxygen species

Background

Peripheral blood contains a complex assortment of progenitor cells that possess the ability to differentiate into endothelial progenitor cells (EPCs) *in vitro*, which can either consist of a minimally proliferative myeloid-monocytic cell population (monocytic EPCs, early outgrowth cells [EOCs], or cultured angiogenic cells) or consist primarily of a high proliferative non-myeloid endothelial cell (EC) population (late EPCs, colony-forming EPCs, or late outgrowth cells), which have emerged as important regulators of vascular biology through their implication in vascular repair, cell therapy and regenerative medicine (1). Following the pioneering study of Asahara *et al.* (2), which demonstrated the potential of adult CD34⁺ hematopoietic stem cells to differentiate into ECs and to induce neovascularisation, multiple studies have focused on identifying the source, nature and characterization of EPCs, while highlighting their role in vascular and cardiac repair, as well as in vascular biology and haemostasis. Indeed, interactions between EPCs and vascular and blood cells can significantly influence their biological and functional properties. More specifically, the interaction of EPCs with platelets provides a critical signal required for their migration, homing and differentiation into ECs at the sites of vascular injury (3-8). In addition, it has been shown that platelet microparticles enhance the potential of EOCs to restore endothelial integrity after vascular injury (9). Conversely, EPCs can modulate platelet function (10), thus emphasizing on their importance in vascular haemostasis and their potential role in regulating atherothrombosis.

Platelet adhesion to damaged blood vessels represents the first step in atherothrombosis. In turn, this induces signals, which lead to platelet activation and aggregation through binding of GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin) to fibrinogen. The functional impact of EPCs on platelets was indirectly explored in a number of studies showing that EPCs participate in preventing in stent restenosis by improving re-endothelialisation and reducing neointima proliferation and thrombosis (11-13). More recently, Soehnlein *et al.* (14) have shown that neutrophils play an important role during the early healing process following arterial injury by promoting adhesion and function of EOCs, thereby improving re-endothelialization and limiting neointima formation. Taken together, these studies suggest that EPCs and blood cells modulate each other's functions. Indeed, we have shown that human EPCs bind

platelets via P-selectin and inhibit platelet activation, aggregation, adhesion and thrombus formation through the upregulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) and prostacyclin (PGI₂) secretion (10). On the other hand, platelet activation is accompanied by the secretion of soluble CD40L (sCD40L, also known as sCD154) (15), which could interact with its receptor CD40 on EPCs to modulate their functions. In this regard, it has been shown that sCD40L impairs the function of EOCs by increasing superoxide anion production and decreasing their viability and proliferation, leading to accelerated neointimal progression (16).

The CD40L/CD40 axis has gained much attention over the years for its involvement in the pathogenesis of inflammation, atherosclerosis and atherothrombosis (17). CD40L is expressed on a variety of tissues such as immune cells, ECs, monocytes/macrophages, vascular smooth muscle cells (VSMCs) and platelets (15, 17, 18). Overwhelming evidence has demonstrated the importance of the CD40L/CD40 axis in thrombo-inflammatory reactions through the upregulation of cell adhesion molecules and production of pro-inflammatory cytokines, chemokines, metalloproteinases, reactive oxygen species (ROS), growth and pro-coagulant factors (15, 17-21). In macrophages and ECs, the CD40L/CD40 dyad induces tissue factor expression and reduces thrombomodulin expression, thereby favouring local pro-coagulant and pro-thrombotic conditions (22). In fact, sCD40L reduces EC-derived NO bioavailability, increases ROS production and induces EC apoptosis, all of which promote thrombosis (23-26). Although sCD40L affects ECs, its potential involvement in EOC biology remains to be determined. Recently, a direct link between sCD40L and EOC function has been established (16), where treatment with sCD40L impaired the function of EOCs. However, evidence as to whether sCD40L could also influence the anti-platelet properties of EOCs is elusive. This study was therefore designed to determine the impact of sCD40L on the anti-platelet properties of EOCs on platelet function.

Methods

Isolation and culture of EOCs

Blood sampling was carried out according to a protocol approved by the Montreal Heart Institute ethical committee. Informed consent was obtained from healthy volunteers, free

from any drug intake over the last 10 days prior to blood sampling. Culture-derived EOCs were conducted as previously described (27). Briefly, Ficoll-Paque (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) density gradient centrifugation was used to isolate peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 100 mL of peripheral blood. PBMCs were cultured in complete endothelial growth medium EGM-2 (Lonza Inc, Burlington, ON, CA) supplemented with 2% FBS, at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. To generate EOCs, 1 x 10⁶ mononuclear cells per cm² were seeded on 6-well fibronectin-coated tissue culture plates (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada). Following 4 days of culture, medium was changed to remove non-adherent cells. Additional culturing up to 7 days was performed to obtain EOCs. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), used as controls, were cultured on 0.2% gelatine-coated plates in complete EGM-2 supplemented with 10% FBS. EOCs were incubated with recombinant human sCD40L (1 µg/ml, Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA) for 24 h at 37°C.

Characterization of EOCs

EOCs were observed by optical microscopy and by laser confocal microscopy for the binding of Ulex-Lectin and the uptake of DiI-Acetylated Low Density Lipoprotein (Ac-LDL). Cells were incubated with DiI-labelled Ac-LDL (4.8 µg/ml, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 2 h at 37°C followed by 4% paraformaldehyde fixation and subsequent incubation for 1 h with FITC-labelled Ulex-Lectin (10 µg/ml, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) at room temperature. Nuclear staining was done with TO-PRO-3 (1.5 µM, Invitrogen) for 15 min at room temperature. Slides were mounted using 0.4% DABCO (Sigma-Aldrich), and visualized under an inverted fluorescent microscope at 63X magnification (10).

Phenotypic characterization of EOCs was performed using flow cytometry assessment of cell surface markers. Cells were harvested using trypsin-EDTA 0.05% (Gibco, Burlington, ON, CA) for 15 min at 37°C and washed with phenol red-free and serum-free basal RPMI 1640 medium. They were subsequently blocked with normal mouse serum for 15 min and incubated for 30 min with PE-labelled fluorescent human monoclonal antibodies against CD14 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), CD45 (AbD Serotec, Oxford, UK), CD34 (BD Biosciences), VEGFR2 (R&D Systems), CD144 (BD Biosciences), CD31 (AbD

Serotec), CD40 and CD40L (Immunotech, Marseille, France). Negative IgG control antibodies were used in all experiments. EOCs were then fixed in 4% paraformaldehyde and analyzed using FACS Epics-Altra (Beckman Coulter, Mississauga, ON, Canada), as described previously (10).

The potential of EOCs and HUVECs to form tube-like structures was compared on Matrigel-coated 24-well plates. Matrigel growth factor reduced (GFR, BD Biosciences) (200 μ l) was allowed to polymerize to a gel-like surface for 30 min at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. Cells were harvested using trypsin-EDTA 0.05%, washed and suspended in complete EGM-2 at 200 x 10³ per 300 μ l per well. Following incubation for 24 h at 37°C in 5% CO₂, cells were viewed under an inverted microscope and images were taken at 10X magnification (28).

Platelet aggregation

Platelets were isolated from peripheral blood of healthy volunteers as previously described (10) and prepared at a concentration of 250 x 10⁶ platelets/ml. Platelet aggregation was performed in a 4-channel optical aggregometer (Chronolog Corp., Havertown, PA, USA) using 400 μ l of platelets incubated with 100 μ l of EOCs (4 x 10⁶/ml) or their supernatant at 37°C for 5 min prior to the aggregation assay. Untreated and pre-treated EOCs with sCD40L (1 μ g/ml) in the presence or absence of a blocking anti-CD40 (5 μ g/ml, R&D Systems) monoclonal antibody were tested. In another set of experiments, untreated and sCD40L pre-treated EOCs with a ROS scavenger, superoxide dismutase (SOD, 100 μ M, Sigma-Aldrich), were used to assess the effect of ROS on platelet aggregation. Platelet aggregation in the presence of complete EGM-2 culture medium containing 2% or 10% FBS, for culture of EOCs and HUVECs respectively, was used as control. The aggregation response was induced with 1 μ g/ml collagen (Chronolog Corp.) and monitored under shear (1000 rpm) at 37°C using the Aggro-Link software (Chronolog Corp.).

PGI₂ and NO release

EOCs (4 x 10⁶/ml) were left untreated (control) or stimulated with sCD40L for 24 h at 37°C in 5% CO₂ and the stable metabolite of PGI₂, 6-keto-PGF_{1 α} , was measured from the supernatants using a commercial radioimmunoassay (RIA) kit (Assay Designs, San Diego,

CA, USA). Levels of nitrate and nitrite were assessed using a commercial fluorometric assay kit (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) according to the manufacturer's instructions.

Apoptosis and viability assay

Control and sCD40L-treated EOCs for 24 h were assessed for apoptosis and necrosis using FITC-labelled Annexin V (BD Pharmingen, Mississauga, ON, Canada) and Propidium Iodide (PI) (BD Pharmingen), respectively. Cells were washed in phenol red-free RPMI 1640 basal media, suspended at 1×10^5 cells per 100 μ l in $1\times$ Annexin V binding buffer and stained with Annexin V-FITC and PI for 15 min at room temperature. Flow cytometric analysis was then used to assess apoptosis and necrosis. Annexin V and PI double negative cells were considered live cells, Annexin V positive cells were considered apoptotic, PI positive cells were considered necrotic and Annexin V and PI double positive cells were considered dead.

Viability of control and sCD40L-treated EOCs was assessed using 0.4% trypan blue staining (Gibco) after 24 h stimulation with sCD40L. The percent viability was calculated by counting cells stained in blue as non-viable cells over non-stained viable cells.

ROS assay

EOCs were left untreated or stimulated with sCD40L for 24 h at 37°C in 5% CO₂ in the absence or presence of SOD (100 μ M) or an anti-CD40 (5 μ g/mL) antibody. Cells were then incubated with 10 μ g/mL hydroethidine for 15 min at 37°C (Invitrogen) and analyzed by flow cytometry for the detection of ethidium-positive cells (16).

Statistics analysis

All results were expressed as mean \pm SEM of at least 3 independent experiments. Paired student's *t*-test and analysis of variance followed by Dunnett's test were used for statistical analysis. $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Characterization of EOCs

We first aimed to determine the morphological and phenotypical characteristics of PBMC-derived EOCs following 7 days of culture on fibronectin-coated plates. EOCs form a heterogeneous population of round and elongated cells (Fig. 1A) and show a rather immature EC differentiation stage, as they still resemble mononuclear cells. Furthermore, EOCs bind Ulex-Lectin and internalize DiI-Ac-LDL, both EC characteristics (Fig. 1A). Assessment of cell surface markers by flow cytometry shows that EOCs continue to express leukocyte and monocyte cell surface markers, CD45 and CD14, respectively, but also acquire characteristics of progenitor and ECs by expressing VEGFR2 and CD31 (Fig. 1B). In functional studies using the Matrigel assay, we show that EOCs lack the capability to form tube-like structures on Matrigel, whereas HUVECs form well-defined tube networks (Fig. 1C). Collectively, these results indicate that our population of PBMCs-derived EOCs in culture is a minimally proliferative myeloid-monocytic cell population, also named monocytic EPCs, early outgrowth cells, or cultured angiogenic cells, as described previously (27, 29).

sCD40L reverses the inhibitory effect of EOCs on platelet aggregation

We have previously shown that EPCs inhibit platelet activation and aggregation (10). Here, we investigated the functional impact of the CD40L/CD40 axis on the anti-platelet properties of EOCs. Figure 2 shows that EOCs were less potent inhibitors of platelet aggregation (32% inhibition) than their supernatant (70% inhibition). Interestingly, pre-treatment of EOCs with sCD40L significantly reduced the anti-platelet aggregation properties of their supernatant by approximately 50%, without any significant effect on the anti-aggregating properties of EOCs. Specific inhibition of CD40 using a blocking monoclonal antibody prevented the effect of sCD40L on EOCs (Fig. 2), thus highlighting the requirement of CD40 in this process.

sCD40L does not affect EOC PGI₂ and NO release nor apoptosis and viability

In order to reveal the mechanisms by which sCD40L impairs the anti-platelet properties of EOCs, we first evaluated the impact of sCD40L stimulation on EOC PGI₂ and NO release,

which are well documented anti-aggregating agents. Our results show that EOCs produce substantial amounts of PGI₂ and NO, but their levels were unaffected by sCD40L stimulation (Fig. 3A, 3B), indicating that sCD40L does not impair the anti-platelet properties of EOCs through modulation of these mediators. We also sought to verify whether this sCD40L-mediated reversal process could be attributed to apoptosis or viability effects. As shown in Figure 3C, stimulation with sCD40L for 24 h did not induce EOC apoptosis or necrosis, as determined by Annexin and PI staining. Moreover, cell viability and integrity were unaffected, as assessed by trypan blue staining.

Impact of ROS

Since sCD40L does not affect the release of PGI₂ and NO by EOCs, we sought to investigate the involvement of ROS in this process. ROS have been shown to modulate platelet function and previous data indicate that sCD40L regulates ROS generation in EOCs (16). As shown in Figure 4, sCD40L treatment induced a significant increase (50%) in intracellular ROS generation in EOCs. This increase was reversed by pre-treatment with SOD, a ROS scavenger, or by a blocking anti-CD40 monoclonal antibody. Moreover, pre-treatment of EOCs with SOD abolished the reversal effect of sCD40L on the anti-platelet properties of EOCs (Fig. 5), indicating that ROS are central elements to this sCD40L-induced impairment of EOC function on platelet aggregation.

Discussion

Given the debate concerning the source and the nature of EPCs, it was therefore important for us to put into context the characteristics of our EPC population. Since the pioneering work of Asahara et al. (2), showing that human peripheral blood contains CD34⁺ and VEGFR-2⁺ progenitor cells, which can attach to fibronectin, acquire certain characteristics of mature ECs *in vitro*, and contribute to neoangiogenesis *in vivo*, numerous cells for improving cardiovascular function have emerged, including EPCs, bone marrow mononuclear cells, adult myocardial stem cells, adult mesenchymal stem cells, and embryonic stem cells (30). Recently, it has been postulated that cells originally defined as EPCs and used for potential therapy are not true endothelial progenitors (31-33). Indeed, recent analyses have revealed that, depending on the methods by which EPCs are isolated

and cultured, the EPC population can either consist of a minimally proliferative myeloid-monocytic cell population (EOCs, monocytic EPCs, or cultured angiogenic cells) or consist primarily of a high proliferative non-myeloid EC population (late EPCs, colony-forming EPCs, or late outgrowth cells). Based on these new definitions and on standardized isolation and differentiation protocols (27, 31, 32, 34), we have successfully differentiated EOCs from peripheral PBMCs in culture and showed that their phenotype reflected rather mononuclear-like cells expressing endothelial markers. However, it has been demonstrated that these cells and mature ECs act synergistically at sites of new vessel formation where EOCs are responsible for the release of paracrine factors whereas ECs are themselves incorporated at these sites (35, 36). Indeed, we showed that EOCs neither proliferate nor form tube-like structures, whereas HUVECs are highly proliferative and form defined tube-like structures on Matrigel. Taken together and as previously recognized (37, 38), our population of EOCs reflects endogenous angiogenic capacity that contributes to supporting tissue regeneration.

It is well established that platelets play important roles not only in haemostasis and thrombosis, but also in inflammation and tissue repair through paracrine mechanisms or direct interactions with other blood, vascular, and progenitor cells. In this regard, it has been shown that platelets promote homing and differentiation of EPCs at sites of vascular injury (3-7), whereas their microparticles enhance the potential of EOCs to restore endothelial integrity (9). Conversely, EPCs influence platelet function and modulate platelet thrombogenic properties (10, 11, 13, 39). Among the mediators involved in thrombo-inflammatory disorders, sCD40L, which is mainly released by activated platelets (15), has gained much attention over the years for its pivotal role in the pathogenesis of inflammation, atherosclerosis and atherothrombosis (17, 40, 41), such that it has become a reliable predictor of cardiovascular risk and disease (42). The present study provides new insights into the regulation of platelet function by EOCs and presents novel evidence for the involvement of the CD40L/CD40 axis in modulating the anti-platelet properties of EOCs.

By interacting with its receptor(s) on EOCs, sCD40L is expected to activate different or parallel intracellular events that would converge to the release of inhibitors or activators of platelet function. In addition to CD40, the classical counter receptor of CD40L, different receptors for CD40L have been identified in different cell types (17). This includes the $\alpha_{IIb}\beta_3$

platelet integrin, which is involved in thrombus stabilization; the inactive conformation of $\alpha_5\beta_1$, which induces activation of the human monocytic U937 cell line; and finally, $\alpha_M\beta_2$ can mediate CD40L-dependent inflammatory responses, in particular leukocyte adhesion and neointimal formation. In the present study, we initially confirmed, as demonstrated in our previous study (10), that the predominant effects of EOCs on platelet aggregation seem to be related to the release of platelet inhibitory factors, such as PGI₂ and NO, that downregulate platelet function. We then demonstrated that EOCs express CD40, the principal ligand for CD40L, and showed that sCD40L reverses the anti-platelet aggregation potential of EOC supernatant, but not washed cells, suggesting that sCD40L may skew the release of EOC-derived platelet inhibitor factors toward platelet activator ones. This effect is CD40-dependent, since it was inhibited by blockade of CD40, indicating a possible interplay between sCD40L, platelets and EOCs in regulating each other's function. Based on our previous study showing that the anti-platelet property of EPCs is mainly related to the secretion of the anti-platelet PGI₂ (10), we sought to examine the effects of sCD40L on the production of two platelet antagonists, PGI₂ and NO. Surprisingly, pre-treatment of EOCs with sCD40L had no significant effects on PGI₂ and NO release, indicating that the partial reversal of the anti-platelet properties of EOCs following sCD40L stimulation could not be attributed to PGI₂ or NO. Moreover, apoptosis of EOCs was not affected by sCD40L, indicating that sCD40L does not hinder the protective platelet properties of EOCs through impaired cell viability. Thus, we hypothesize that alternate platelet activating factors released by EOCs in response to sCD40L could be involved in this process. In this regard, it has been shown that sCD40L impairs the function of EOCs by increasing superoxide anion production and decreasing viability and proliferation, thereby leading to accelerated neointimal progression (16). Indeed, we found that sCD40L increased the production of EOC-derived ROS in a CD40-dependent manner and that ROS scavenging with SOD reversed the effect of sCD40L on the anti-platelet properties of EOCs.

Our findings could be of important physiopathological relevance, since the acute vascular response to injury involves the adhesion, activation, and aggregation of platelets, followed by recruitment of additional platelets, leukocytes, and possibly circulating EOCs and late outgrowth cells or EPCs. The recruitment of circulating EOCs at the site of injury may contribute first, to attenuate the acute thrombotic response by inhibiting platelet

function, and second, to promote re-endothelialisation and vascular repair by EPCs. However, in the presence of elevated plasma levels of sCD40L, as seen in patients with cardiovascular diseases, the anti-platelet and pro-endothelial functions of EOCs and EPCs would be impaired, hence contributing to creating a thrombo-inflammatory environment that may enhance atherothrombosis at the sites of vascular injury. In addition to sCD40L, it has been shown that platelet bound CD40L is a potent inducer of proatherogenic inflammatory processes by enhancing the interaction between platelets, leukocytes, and the endothelium (43). Thus, it is likely that both the membrane bound and the circulating forms of CD40L derived from platelets at the sites of injury are involved in the thrombo-inflammatory properties of EOCs and EPCs in general, but their relative importance in EPC functions requires further investigations.

Collectively, our findings support the existence of a crosstalk between EOCs and platelets in regulating each other's function. Hence, sCD40L signals via CD40 in EOCs and reverses their platelet anti-aggregatory properties via increased ROS production. These results support the existence of a link between elevated levels of sCD40L, impaired activity of EPCs and enhanced platelet reactivity, and consequently the occurrence of atherothrombotic disease.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research (201103MOP) and the Heart and Stroke Foundation of Canada. We thank Dr Daniel Yacoub for his revision of the manuscript.

Conflict of interests

The authors state that they have no conflict of interest.

References

1. Kawamoto A, Losordo DW. Endothelial progenitor cells for cardiovascular regeneration. *Trends Cardiovasc Med* 2008; 18: 33-7.
2. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-7.
3. Daub K, Langer H, Seizer P, et al. Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells. *FASEB J* 2006; 20: 2559-61.
4. 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* 2006; 26: 1653-9.
5. 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* 2006; 96: 498-504.
6. 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* 2006; 203: 1221-33.
7. 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* 2008; 117: 206-15.
8. Stellos K, Gnerlich S, Kraemer B, et al. Platelet interaction with progenitor cells: vascular regeneration or inquiry? *Pharmacol Rep* 2008; 60: 101-8.
9. Mause SF, Ritzel E, Liehn EA, et al. Platelet microparticles enhance the vasoregenerative potential of angiogenic early outgrowth cells after vascular injury. *Circulation* 2010; 122: 495-506.
10. Abou-Saleh H, Yacoub D, Theoret JF, et al. Endothelial progenitor cells bind and inhibit platelet function and thrombus formation. *Circulation* 2009; 120: 2230-9.
11. 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* 2005; 45: 1574-9.
12. Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, et al. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med* 2001; 7: 1035-40.
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 engineering* 2003; 9: 127-36.
14. Soehnlein O, Wantha S, Simsekylmaz S, et al. Neutrophil-derived cathelicidin protects from neointimal hyperplasia. *Science translational medicine* 2011; 3: 103-98.
15. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998; 391: 591-4.
16. Hristov M, Gumbel D, Lutgens E, et al. Soluble CD40 ligand impairs the function of peripheral blood angiogenic outgrowth cells and increases neointimal formation after arterial injury. *Circulation* 2010; 121: 315-24.
17. Hassan GS, Merhi Y, Mourad WM. CD154 and its receptors in inflammatory vascular pathologies. *Trends Immunol* 2009; 30: 165-72.

18. Karmann K, Hughes CC, Schechner J, et al. CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 4342-6.
19. Rizvi M, Pathak D, Freedman JE, et al. CD40-CD40 ligand interactions in oxidative stress, inflammation and vascular disease. *Trends Mol Med* 2008; 14: 530-8.
20. Mach F, Schonbeck U, Fabunmi RP, et al. T lymphocytes induce endothelial cell matrix metalloproteinase expression by a CD40L-dependent mechanism: implications for tubule formation. *Am J Pathol* 1999; 154: 229-38.
21. Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, et al. CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol* 2000; 156: 7-14.
22. Aukrust P, Damas JK, Solum NO. Soluble CD40 ligand and platelets: self-perpetuating pathogenic loop in thrombosis and inflammation? *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 2326-8.
23. Urbich C, Dernbach E, Aicher A, et al. CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species. *Circulation* 2002; 106: 981-6.
24. Chen C, Chai H, Wang X, et al. Soluble CD40 ligand induces endothelial dysfunction in human and porcine coronary artery endothelial cells. *Blood* 2008; 112: 3205-16.
25. Longo CR, Arvelo MB, Patel VI, et al. A20 protects from CD40-CD40 ligand-mediated endothelial cell activation and apoptosis. *Circulation* 2003; 108: 1113-8.
26. Chakrabarti S, Blair P, Freedman JE. CD40-40L signaling in vascular inflammation. *J Biol Chem* 2007; 282: 18307-17.
27. Mead LE, Prater D, Yoder MC, et al. Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from human blood. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2008; Chapter 2: Unit 2C 1.
28. Yamamoto K, Takahashi T, Asahara T, et al. Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress. *J Appl Physiol* 2003; 95: 2081-8.
29. Hur J, Yoon CH, Kim HS, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascuogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 288-93.
30. Sieveking DP, Ng MK. Cell therapies for therapeutic angiogenesis: back to the bench. *Vasc Med* 2009; 14: 153-66.
31. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 2004; 104: 2752-60.
32. Prater DN, Case J, Ingram DA, et al. Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* 2007; 21: 1141-9.
33. Pearson JD. Endothelial progenitor cells - hype or hope? *J Thromb Haemost* 2009; 7: 255-62.
34. Zhang Y, Ingram DA, Murphy MP, et al. Release of proinflammatory mediators and expression of proinflammatory adhesion molecules by endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296: H1675-82.
35. Krenning G, van der Strate B, Schipper M, et al. CD34(+) Cells Augment Endothelial Cell Differentiation of CD14(+) Endothelial Progenitor Cells in vitro. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 2521-33.

36. Yoon CH, Hur J, Park KW, et al. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation* 2005; 112: 1618-27.
37. Hirschi KK, Ingram DA, Yoder MC. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 1584-95.
38. Rehman J, Li J, Orschell CM, et al. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003; 107: 1164-9.
39. 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* 2008; 155: 128-32.
40. Antoniades C, Bakogiannis C, Tousoulis D, et al. The CD40/CD40 ligand system: linking inflammation with atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54: 669-77.
41. Lievens D, Eijgelaar WJ, Biessen EA, et al. The multi-functionality of CD40L and its receptor CD40 in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2009; 102: 206-14.
42. de Lemos JA, Zirlik A, Schonbeck U, et al. Associations between soluble CD40 ligand, atherosclerosis risk factors, and subclinical atherosclerosis: results from the Dallas Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 2192-6.
43. Lievens D, Zerneck A, Seijkens T, et al. Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis. *Blood* 2010; 116: 4317-27.

Figure Legends

Figure 1: Characterization of PBMC-derived EOCs. A) *Left:* Representative optical microscopy image of EOCs taken at 10X magnification using an inverted light microscope. EOCs display a heterogeneous population of round and elongated cells on fibronectin following 7 days of culture. *Right:* Representative confocal microscopy image taken at 63X magnification showing EOC double staining of DiI-AcLDL uptake (red) and Ulex-Lectin binding (green) as well as TO-PRO-3 nuclear staining (blue). B) Cell surface marker expression profile, as assessed by flow cytometry, of EOCs using mouse anti-human PE-conjugated monoclonal antibodies against leukocyte, progenitor and EC markers. Histogram represents the mean of data \pm SEM of at least 4 independent experiments. C) Optical microscopy images showing the tube-like structure formation potential of EOCs and control HUVECs on a Matrigel surface. 10X magnification using an inverted microscope.

Figure 2: Effect of EOCs on platelet aggregation. Platelets ($250 \times 10^6/\text{ml}$) were co-incubated with EOCs or their supernatants for 5 min in a 4-channel optical aggregometer under 1,000 rpm of shear at 37°C and aggregation was recorded following stimulation with collagen (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). PBMCs and HUVECs were used as negative and positive control, respectively. A) Representative traces of platelet aggregation alone (control) or in the presence of the supernatant of $4 \times 10^6/\text{ml}$ EOCs pre-treated or not with sCD40L (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) with and without an anti-CD40 blocking monoclonal antibody. B) Histogram represents the mean data \pm SEM ($n=6$, $*P < 0.05$ vs EOCs + sCD40L, $**P < 0.05$ vs control, $***P < 0.05$ vs EOCs).

Figure 3: sCD40L does not affect PGI₂ and NO release and apoptosis of EOCs. A) Supernatants from EOCs and sCD40L-treated EOCs were collected after 24 h of stimulation and assessed for PGI₂ release by RIA of 6-keto-PGF_{1 α} concentration, and B) NO release by nitrate/nitrite fluorometric assay for nitrate concentration. C) Untreated and sCD40L-treated (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) EOCs for 24 h were stained with Annexin V-FITC (apoptosis) and PI (necrosis) and the percent cell fluorescence staining was measured by flow cytometry. Viability was analyzed using the trypan blue exclusion assay. Histogram represents the mean data \pm SEM ($n \geq 3$).

Figure 4: Effect of sCD40L on intracellular ROS in EOCs. Control or sCD40L-treated (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) EOCs in the presence of SOD (100 μM) or anti-CD40 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h were collected and subjected to ROS measurement using hydroethidine. Histogram represents the mean data \pm SEM (n=7; * $P < 0.05$ vs all).

Figure 5: Impact of ROS on platelet aggregation in sCD40L-stimulated EOCs. Platelets (250 $\times 10^6/\text{mL}$) were co-incubated with EOCs for 5 min in a 4-channel optical aggregometer at 37°C, and aggregation was recorded following stimulation with collagen (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A) Representative traces of platelet aggregation alone (control) or in the presence of the supernatant of 4 $\times 10^6/\text{mL}$ EOCs pre-treated or not with sCD40L (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) with and without SOD (100 μM). B) Histogram represents the mean data \pm SEM (n=6, * $P < 0.05$ vs control, ** $P < 0.05$ vs EOCs and EOCs + sCD40L + SOD).

What is known on this topic?	What this paper adds?
EOCs reduces platelet function	sCD40L reverses the anti-platelet properties of EOCs
EOCs express CD40	This effect is CD40-dependent
sCD40L impairs the function of EOCs in endothelial repair	This effect is related to increased ROS production

Figure 1

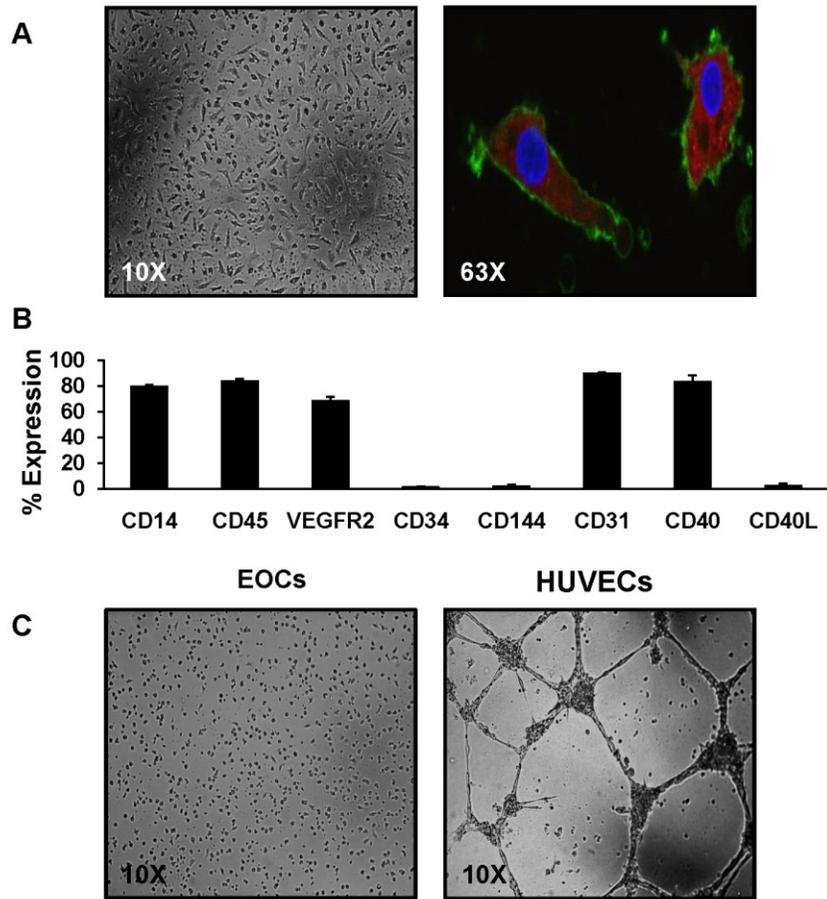


Figure 2

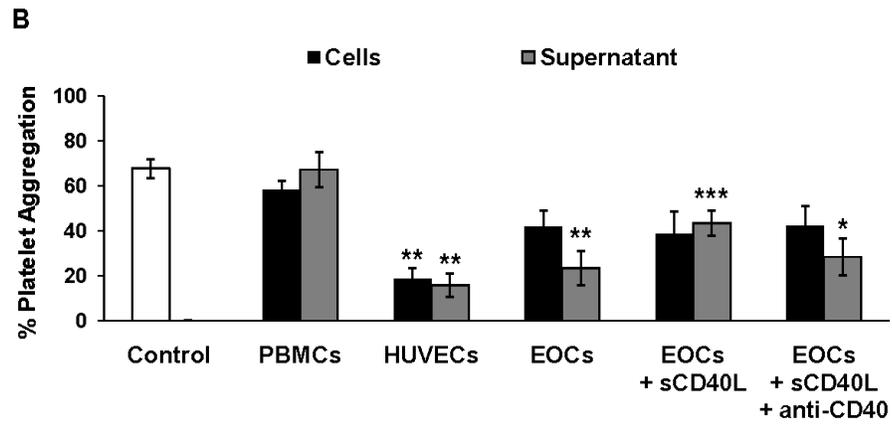
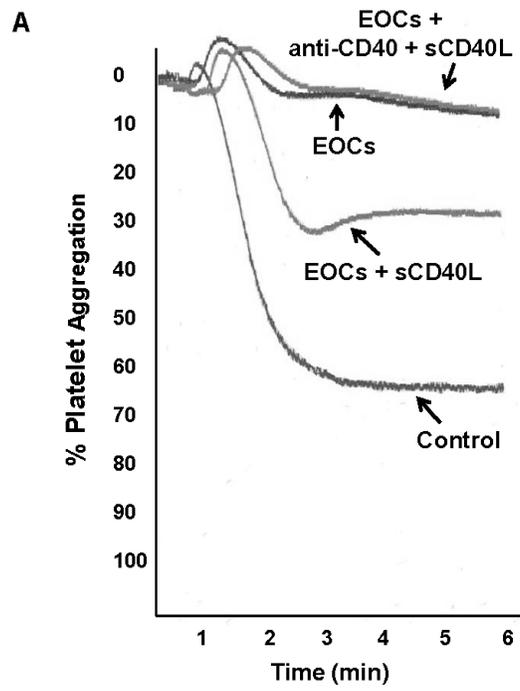


Figure 3

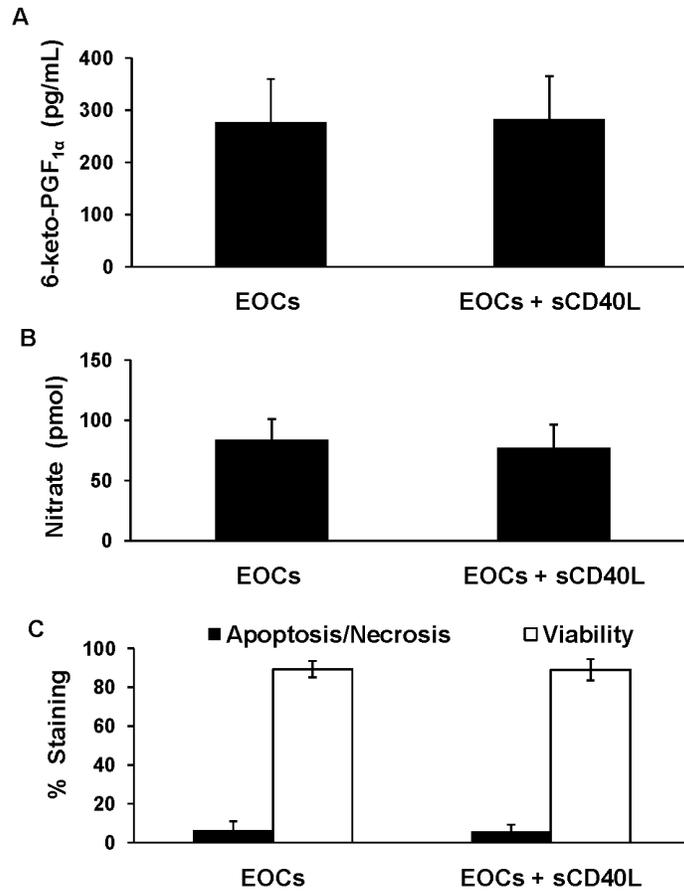


Figure 4

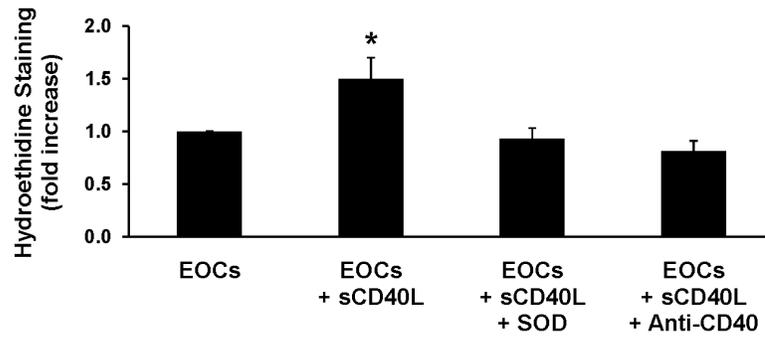
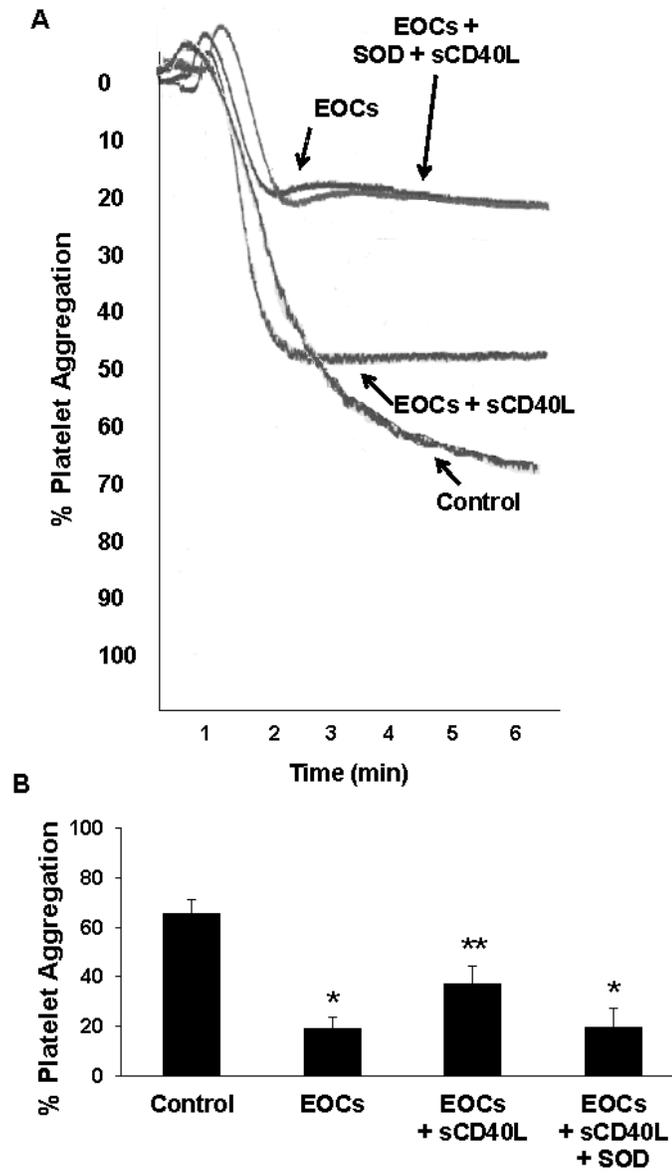


Figure 5



Mise en contexte pour le deuxième article :

Soluble CD40 Ligand stimulates the pro-angiogenic function of early outgrowth cells by increasing matrix metalloproteinase 9 release via the p38 mitogen activated protein kinase pathway

Dans notre étude précédente, nous avons démontré la présence de l'axe CD40L/CD40/TRAF dans les «*early*» EPCs ou EOCs et décrit l'effet du sCD40L sur la fonction inhibitrice des EOCs dans la fonction plaquettaire. Nous avons démontré que le sCD40L renverse l'effet inhibiteur des EOCs sur l'agrégation plaquettaire via un mécanisme impliquant une augmentation du stress oxydatif. Ainsi, les EPCs possèdent un potentiel anti-thrombotique qui est réduit par le sCD40L. Cependant, les mécanismes de réparation vasculaire impliquent une balance entre le potentiel pro-thrombotique des plaquettes et le potentiel anti-thrombotique de l'endothélium. Ainsi, l'utilisation des EPCs comme cible thérapeutique a largement été décrite dans plusieurs études démontrant un potentiel régénératif important à la fois *in vitro* et *in vivo*. Plus spécifiquement, les EOCs sont des cellules impliquées dans la réparation vasculaire et la néoangiogenèse par l'entremise de la sécrétion des facteurs paracrines qui agissent sur la prolifération des cellules endothéliales et sur la différenciation des «*late*» EPCs en cellules endothéliales dans le processus de régénération vasculaire. Ainsi, notre focus dans le cadre de ce travail était orienté à l'étude de la fonction des EOCs dans la réparation endothéliale. En se basant sur notre étude antérieure démontrant la modulation de la fonction anti-thrombotique des EOCs par le sCD40L, cette étude a été planifiée dans le but d'étudier les effets du sCD40L sur le potentiel angiogénique des EOCs dans la réparation endothéliale.

Contribution des auteurs

Lara Bou Khzam : Planification et exécution de la majorité des expériences, rédaction et correction de l'article.

Haitham Abou-Saleh : Planification de quelques expériences et correction de l'article.

Ahmed Hachem : Correction de l'article.

Younes Zaid : Exécution de quelques expériences.

Rahma Boulahya: Participation à l'isolation des PBMCs et à la culture des EPCs et assistance dans l'exécution de quelques expériences.

Walid Mourad : Correction de l'article.

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

Soluble CD40 Ligand stimulates the pro-angiogenic function of early outgrowth cells by increasing matrix metalloproteinase 9 release via the p38 mitogen activated protein kinase pathway

Lara Bou Khzam^a, Haitham Abou-Saleh^b, Ahmed Hachem^a, Younes Zaid^a, Rahma Boulahya^a, Walid Mourad^{c,d}, Yahye Merhi^{a,c*}

^a Laboratory of Thrombosis and Hemostasis, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger, Montreal, Québec, H1T 1C8, Canada

^b Qatar Cardiovascular Research Center, Qatar Foundation-Education City, Doha, Qatar

^c Université de Montréal, Department of Medicine, 2900 boul. Édouard-Montpetit, Montréal, Québec, H3T 1J4, Canada

^d Centre Hospitalier Université de Montréal, 264 boul. René-Lévesque est, Montréal, Québec, H2X 1P1, Canada

* **Corresponding author:** Yahye Merhi, Montreal Heart Institute, Laboratory of

Thrombosis and Hemostasis, 5000 Belanger, Montréal, Québec, Canada, H1T 1C8; Tel:

(514) 376-3330 ext. 3035; Fax: (514) 376-1355

Abbreviations: PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell), EOC (Early Outgrowth Cell), CD40L (CD40 Ligand), HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell), MMP-9 (Matrix Metalloproteinase-9), p38 MAPK (p38 Mitogen Activated Protein Kinase), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

ABSTRACT

Endothelial progenitor cells (EPCs) have recently been regarded as potential therapeutic targets in vascular repair. The effects of EPCs are related to their incorporation at sites of vascular lesions and to their release of various angiogenic factors. It has been shown that soluble CD40 ligand (sCD40L) levels are elevated in patients suffering from cardiovascular disease, which may influence the function of EPCs. We have identified the expression of the inflammatory receptor CD40 on early outgrowth EPCs (EOCs), derived from peripheral blood mononuclear cells, and aimed to study the effect of its ligand, sCD40L, on the function of EOCs in endothelial repair. Following stimulation with sCD40L, EOCs significantly increased the angiogenic potential of cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), as determined by wound healing assay. Stimulation of EOCs with sCD40L increased, in a concentration-dependent manner, the release of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) via the p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) pathway. Inhibition of p38 MAPK, by SB203580, in sCD40L-treated EOCs, reversed their release of MMP-9 and their pro-angiogenic effect on HUVECs. Inhibition of MMP-9 also reversed the pro-angiogenic effect of sCD40L-treated EOCs in *in vitro* wound healing assay on HUVECs. We have shown that sCD40L increases the pro-angiogenic function of EOCs on cultured HUVECs by inducing a significant increase in MMP-9 release via the p38 MAPK signaling pathway.

Keywords: Endothelial progenitor cells, sCD40L, MMP, p38 MAPK, endothelial repair

1. Introduction

Endothelial progenitor cells (EPCs) have shown considerable potential in cell therapy and regenerative medicine [1]. Circulating levels of EPCs have been associated with endothelial damage and the incidence of cardiovascular disease [2,3,4,5]. Following the pioneer study by Asahara *et al.*, demonstrating the potential of adult CD34⁺ hematopoietic stem cells to differentiate to endothelial cells and induce neovascularisation [6], numerous studies have investigated the role of EPCs in vascular repair [7,8]. Since this study, the concept of *de novo* vessel formation, or neovascularisation by postnatal vasculogenesis, has emerged thereby challenging the initial belief that angiogenesis is the sole vascular repair system in adults [9].

Recent studies have shown the existence of two EPC subtypes, early outgrowth cells (EOCs), also named early EPCs, and late EPCs, displaying differential roles in cardiovascular diseases, such as atherosclerosis, and vascular processes, such as endothelial repair [10]. It has been suggested that EOCs derive from an abundant monocytic cell line [11,12,13], whereas late EPCs derive from a rare stem cell source [14,15]. Studies suggest that EOCs may not themselves be incorporated at the sites of vascular lesions, as opposed to late EPCs; however, they may influence vascular repair in a paracrine manner through the release of various angiogenic factors [13,16,17,18].

The process of neovascularisation relies on the invasive properties of cells by the release of proteolytic enzymes named matrix metalloproteinases (MMPs) which are required for the degradation of the endothelial basement membrane allowing for cell migration [19]. These proteases maintain the physiological balance between pro- and anti-angiogenic factors by modifying and activating growth factors, such as transforming growth factor (TGF- β) and vascular endothelial growth factor (VEGF) [19]. It has been shown that MMPs are also involved in the recruitment and mobilization of progenitor cells from the bone marrow and allow the incorporation of these cells during vascular repair. More specifically, MMP-9 is responsible for the proteolytic cleavage necessary for soluble Kit-ligand (sKitL) release from bone marrow, which is required for the recruitment of haematopoietic stem cells [19,20,21].

We have previously shown that the interaction between EPCs and platelets occurs via P-selectin, a cell adhesion molecule expressed at the surface of activated platelets and endothelial cells, thereby impairing the function of platelets by inhibiting their activation, aggregation, adhesion and thrombus formation potential via an increase in COX-2 expression and prostacyclin (PGI₂) release [22]. In more recent studies, we have identified the constitutive expression of the CD40 receptor on EOCs, a 39-kd glycoprotein member of the tumor necrosis factor receptor family expressed on B cells, platelets, macrophages, dendritic cells and endothelial cells [23]. It is well established that activated platelets constitute the main source of its ligand in the circulation, known as soluble CD40 ligand (sCD40L), which is an 18-kd truncated form of CD40 ligand (CD40L). CD40L is a 48-kDa trimeric transmembrane protein and member of the tumor necrosis superfamily that has been identified on immune cells such as T cells and platelets [24,25,26]. Adaptor proteins, named tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factors (TRAFs), are required to bind to the cytoplasmic tail of the CD40 receptor in order to form a CD40L/CD40/TRAF complex and induce various downstream intracellular signalling mechanisms [23,27].

The CD40L/CD40 axis plays an important role in inflammation mainly by increasing the expression of cell adhesion molecules, pro-inflammatory cytokines, chemokines and matrix metalloproteinases [28,29,30,31,32]. The clinical correlation between significantly elevated levels of CD40L and cardiovascular risk factors has evoked an interest in the implication of the CD40L/CD40 axis in the various cardiovascular diseases, such as atherosclerosis and acute coronary syndrome [32,33,34,35,36]. The thrombo-inflammatory processes involved in the induction of endothelial dysfunction play an important role in the development of these diseases [24,31,32,37]; thereby raising an interest in further investigating the role of EPCs in endothelial repair. Hristov *et al.* have recently shown that elevated levels of plasma sCD40L, which induce endothelial dysfunction, may be linked to an impaired function of EPCs [38].

Various studies have investigated the role of the CD40L/CD40 dyad in endothelial cells; however, the implication of this inflammatory pathway remains poorly characterized in EPCs. In this study we show the effect of sCD40L on the angiogenic function of EOCs in endothelial repair.

2. Materials and methods

2.1 Isolation and culture of PBMC-derived EOCs

This study was carried out according to a protocol accepted by the Montreal Heart Institute (Québec, CA) ethical committee. Informed consent was obtained from healthy volunteers aged between 20 and 60 years and free from any drug intake, over the last 10 days prior to blood isolation. Culture of EOCs was carried out as previously described [13,39,40]. Briefly, Ficoll-Paque (GE Healthcare) density gradient centrifugation was used to isolate peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 100 mL of peripheral blood. PBMCs were cultured in complete endothelial growth media EGM-2 (Lonza Inc.) at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. To generate EOCs, 1 x 10⁶ PBMCs per cm² were seeded on 6-well fibronectin-coated tissue culture plates (BD Biosciences). Following 4 days of culture, medium was changed to remove non-adherent cells. Additional culturing up to 7 days was allowed to obtain EOCs [39,40,41]. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were cultured on 0.2% gelatin-coated plates in complete EGM-2 (Lonza Inc.) supplemented with 10% FBS.

2.2. Gelatin zymography

EOCs were scraped, washed and resuspended in EGM-2 at 4 x 10⁶ cells per mL. Untreated (control) and sCD40L (1 µg mL⁻¹, Alexis Biochemicals) – treated EOC 24-hour supernatants were collected. Similarly, supernatants were collected from EOCs treated for 24 hours with the p38 inhibitor SB203580 (10 µM, Sigma-Aldrich). Thereafter, 20 µL samples were mixed with SDS 1X sample buffer, without reducing agent, and loaded on SDS-PAGE gels containing 2 mg mL⁻¹ gelatin. Gels were washed twice for 15 min with 2.5% Triton X-100 wash buffer and incubated overnight in enzyme assay buffer (38 mM Trizma hydrochloride, 13 mM pH 7.5, CaCl₂ anhydride, 0.05% NaN₃) in a 37°C hot bath to allow development of enzyme activity bands. Following overnight incubation, the gel was washed twice with wash buffer for 5 min and stained with 0.2% Coomassie brilliant blue (methanol: acetic acid: water [4:1:6]) for 1 hour on a shaker at room temperature. The gel was destained in 40% methanol with 10% acetic acid until gelatinase activity appeared as clear bands against a dark background. Finally, the gel was scanned (BioRad GS-800) and

relative band density for pro-MMP-9 (92 kDa) was obtained (QuantityOne Analysis Software) [17,42,43].

2.3. Wound scratch healing assay

EOCs were scraped, washed and resuspended in starved EGM-2 (without FBS, VEGF and FGF) at 4×10^6 cells per mL. Untreated (control), sCD40L ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$, Alexis Biochemicals) - , and MMP-9 inhibitor ($10 \mu\text{M}$, EMD Millipore) – treated EOCs were incubated for 24 hours at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2 , then supernatants were collected. HUVECs were cultured on 0.2% gelatin-coated plates until confluence. On the day of the assay, straight line scratches were performed using 100 μL pipette tips. Wells were washed carefully using PBS 1X to remove loosely attached cells and 150 μL of starved EGM-2 was added to each well. 150 μL of control and treated EOCs supernatants were added to each well. HUVEC wound healing was observed over an 8-hour period and images were taken at 2X magnification using an inverted microscope. Quantification of scratches was performed using the T-scratch program (CSE lab ETH, Swiss Federal Institute of Technology Zurich) by calculating percent wound healing using the wound area at 0 and 8 hours.

2.4. Statistical analysis

All results were expressed as mean \pm SEM. Paired student's t-test were used for statistical analysis. $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1 sCD40L induces concentration-dependent MMP-9 release by EOCs

EOCs generated from cultured PBMCs form a heterogeneous population of round and elongated cells. We have shown that EOCs do not form tube-like structures whereas HUVECs form well-defined tube networks (Data not shown). These results confirm previous studies suggesting that EOCs may be implicated in the vascular processes through the release of paracrine factors [10,17]. In order to characterize the functionality of EOCs, supernatants from EOC cultures were collected and subjected to gelatin zymography studies. Interestingly, we have found that EOCs significantly release MMP-9 whereas control

HUVECs release MMP-2 (Fig. 1A). We sought to investigate the effect of sCD40L on the release of MMP-9 by EOCs. Indeed, we have found that sCD40L induces a significant increase in MMP-9 release by EOCs in a concentration-dependent manner (Fig. 1B) suggesting a possible increased reactivity of EOCs in vascular repair in patients with elevated levels of circulating sCD40L.

3.2 sCD40L induces phosphorylation of p38 MAPK in EOCs

Having previously shown the implication of the p38 MAPK in platelet function upon sCD40L stimulation [26], we sought to investigate whether this pathway is also involved in EOC function. Interestingly, we have found that sCD40L significantly induces the phosphorylation of p38 MAPK without having an effect on the total p38 MAPK protein levels (Fig. 2). Inhibition of p38 MAPK, using the specific inhibitor SB203580, reversed the increase in p38 MAPK phosphorylation (Fig. 2). These results suggest that sCD40L induces downstream signalling through the p38 MAPK pathway.

3.3 Inhibition of p38 MAPK reverses sCD40L-induced increase in MMP-9 release by EOCs

Considering sCD40L induces the release of MMP-9 and influences phosphorylation of p38 MAPK in EOCs; we were interested in investigating whether there exists a correlation between these observed results. Indeed, using the specific inhibitor SB203580, we show that inhibition of p38 MAPK phosphorylation significantly reverses the sCD40L-induced increase in MMP-9 release by EOCs (Fig. 3). Hence, we have shown that the increase in MMP-9 release by EOCs, which is induced by sCD40L, occurs via the p38 MAPK intracellular signalling pathway.

3.4 EOCs in presence of sCD40L induce endothelial wound healing via an increase in MMP-9 release

In order to further investigate the functional effect of EOCs in the presence of sCD40L, a wound scratch assay on HUVECs was performed and the effect of sCD40L-treated EOC supernatants on wound healing was measured. Interestingly, we have shown that sCD40L-treated EOC supernatants significantly favor endothelial wound healing via an increase in

MMP-9 release by EOCs, whereas the inhibition of MMP-9 reverses the sCD40L-induced wound repair (Fig. 4).

4. Discussion

Endothelial damage is a leading phenomenon in numerous cardiovascular conditions often resulting in endothelial dysfunction. Various studies have focussed developing approaches to regenerate the endothelium and induce novel vessel formation. A pioneer study by Asahara *et al.* was the first to have shed light on the concept of neovascularisation in the adult human. A rare population of CD34⁺VEGFR2⁺ cells, referred to as EPCs, circulating among the adult human peripheral blood was shown to have the capacity to differentiate into functionally mature endothelial cells *in vitro* and contribute to neoangiogenesis *in vivo* [6]. Numerous studies have further investigated the potential of EPCs to promote new vessel formation. Studies focusing on the role of EOCs have suggested an indirect implication of these cells in endothelial repair and neovascularisation by the release of paracrine factors [16,44].

We have previously shown that EPCs bind platelets and inhibit their adhesion, activation and aggregation as well as thrombus formation via P-selectin [22]. In turn, platelets have been shown to promote the recruitment and homing of EPCs to sites of vascular injury via the release of various mediators [45,46,47,48,49]. Among the mediators released by activated platelets, we find sCD40L, a thrombo-inflammatory mediator which has been identified as a biomarker for cardiovascular risk and disease [24,31,35,50,51]. It has been shown that increased sCD40L impairs the function of EOCs by inducing an increase in superoxide anion production leading to reduced viability and proliferation of EOCs. [38]. In the present study, we have shed light on the effect of sCD40L on the functional role of EOCs in endothelial repair.

The process of neovascularization requires the degradation of the extracellular matrix by matrix degradation enzymes, namely MMPs [19], which have been also shown to promote vascular repair [52]. We have found that EOCs release MMP-9 and sCD40L further promotes the release of MMP-9 by EOCs. We have previously shown that sCD40L induces platelets adhesion, activation and aggregation as well as thrombus formation via a p38 MAPK activator signal [26]. In our present study, we show that sCD40L also induces an

activator signal involving the p38 MAPK in EOCs. Interestingly, we have found that the inhibition of p38 MAPK reverses the sCD40L-induced MMP-9 release by EOCs; thus, providing evidence that MMP-9 release by EOC in response to sCD40L involves the p38 MAPK pathway.

Based on various studies showing that EOCs are implicated in angiogenesis and endothelial repair by the release of paracrine factors [16,44], we have shown that sCD40L-treated EOCs promote endothelial wound repair via an increase in MMP-9 release. Hence, we have correlated the functional role of EOCs in endothelial repair to their release of MMP-9 and identified the intracellular signalling mechanism involved in the sCD40L/CD40 response of EOCs. Thus, increased levels of sCD40L, released mainly by activated platelets, may induce the pro-angiogenic function of EOCs on mature endothelial cells and contribute to endothelial repair.

In this study, we have investigated the effect of sCD40L on the paracrine role of EOCs in endothelial repair. Further studies are required to explore the effect of sCD40L on the *in vivo* functional role of these EPCs. As patients with cardiovascular disease display elevated levels of sCD40L in circulation, this study offers new insights on the athero-protective and therapeutic role of EOCs in the presence of sCD40L.

Acknowledgements

The authors thank the Canadian Institute for Health Research for funding (MOP-82767)

References

- [1] A. Kawamoto, D.W. Losordo, Endothelial progenitor cells for cardiovascular regeneration, *Trends Cardiovasc Med* 18 (2008) 33-37.
- [2] D.A. Ingram, I.Z. Lien, L.E. Mead, M. Estes, D.N. Prater, E. Derr-Yellin, L.A. DiMeglio, L.S. Haneline, In vitro hyperglycemia or a diabetic intrauterine environment reduces neonatal endothelial colony-forming cell numbers and function, *Diabetes* 57 (2008) 724-731.
- [3] H.W. Chang, S. Leu, C.K. Sun, C.L. Hang, A.A. Youssef, Y.K. Hsieh, C.H. Yang, C.I. Cheng, S.M. Chen, C.J. Chen, S. Chua, L.T. Chang, C.J. Wu, H.K. Yip, Level and value of circulating endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction undergoing primary coronary angioplasty: in vivo and in vitro studies, *Transl Res* 156 (2010) 251-263.
- [4] J.M. Hill, G. Zalos, J.P. Halcox, W.H. Schenke, M.A. Waclawiw, A.A. Quyyumi, T. Finkel, Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk, *N Engl J Med* 348 (2003) 593-600.
- [5] S. Sen, S.P. McDonald, P.T. Coates, C.S. Bonder, Endothelial progenitor cells: novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease, *Clin Sci (Lond)* 120 (2011) 263-283.
- [6] T. Asahara, T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Witzenbichler, G. Schatteman, J.M. Isner, Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis, *Science* 275 (1997) 964-967.
- [7] P. Romagnani, L. Lasagni, S. Romagnani, Peripheral blood as a source of stem cells for regenerative medicine, *Expert Opin Biol Ther* 6 (2006) 193-202.
- [8] H. Bompais, J. Chagraoui, X. Canron, M. Crisan, X.H. Liu, A. Anjo, C. Tolla-Le Port, M. Leboeuf, P. Charbord, A. Bikfalvi, G. Uzan, Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells, *Blood* 103 (2004) 2577-2584.
- [9] T. Asahara, A. Kawamoto, Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis, *Am J Physiol Cell Physiol* 287 (2004) C572-579.
- [10] J. Hur, C.H. Yoon, H.S. Kim, J.H. Choi, H.J. Kang, K.K. Hwang, B.H. Oh, M.M. Lee, Y.B. Park, Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 (2004) 288-293.
- [11] P. Romagnani, F. Annunziato, F. Liotta, E. Lazzeri, B. Mazzinghi, F. Frosali, L. Cosmi, L. Maggi, L. Lasagni, A. Scheffold, M. Kruger, S. Dimmeler, F. Marra, G. Gensini, E. Maggi, S. Romagnani, CD14+CD34low cells with stem cell phenotypic and functional features are the major source of circulating endothelial progenitors, *Circ Res* 97 (2005) 314-322.
- [12] M. Harraz, C. Jiao, H.D. Hanlon, R.S. Hartley, G.C. Schatteman, CD34- blood-derived human endothelial cell progenitors, *Stem Cells* 19 (2001) 304-312.
- [13] J. Rehman, J. Li, C.M. Orschell, K.L. March, Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors, *Circulation* 107 (2003) 1164-1169.

- [14] R. Gulati, D. Jevremovic, T.E. Peterson, S. Chatterjee, V. Shah, R.G. Vile, R.D. Simari, Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood, *Circ Res* 93 (2003) 1023-1025.
- [15] Y. Lin, D.J. Weisdorf, A. Solovey, R.P. Heibel, Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood, *J Clin Invest* 105 (2000) 71-77.
- [16] G. Marsboom, S. Janssens, Endothelial progenitor cells: new perspectives and applications in cardiovascular therapies, *Expert Rev Cardiovasc Ther* 6 (2008) 687-701.
- [17] C.H. Yoon, J. Hur, K.W. Park, J.H. Kim, C.S. Lee, I.Y. Oh, T.Y. Kim, H.J. Cho, H.J. Kang, I.H. Chae, H.K. Yang, B.H. Oh, Y.B. Park, H.S. Kim, Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases, *Circulation* 112 (2005) 1618-1627.
- [18] T. He, T. Lu, L.V. d'Uscio, C.F. Lam, H.C. Lee, Z.S. Katusic, Angiogenic function of prostacyclin biosynthesis in human endothelial progenitor cells, *Circ Res* 103 (2008) 80-88.
- [19] V.W. van Hinsbergh, P. Koolwijk, Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead, *Cardiovasc Res* 78 (2008) 203-212.
- [20] Q. Rao, G.G. Zheng, Y.M. Lin, K.F. Wu, Production of matrix metalloproteinase-9 by cord blood CD34+ cells and its role in migration, *Ann Hematol* 83 (2004) 409-413.
- [21] T. Inoue, I. Taguchi, S. Abe, S. Toyoda, K. Nakajima, M. Sakuma, K. Node, Activation of matrix metalloproteinase-9 is associated with mobilization of bone marrow-derived cells after coronary stent implantation, *Int J Cardiol* 152 (2011) 332-336.
- [22] H. Abou-Saleh, D. Yacoub, J.F. Theoret, M.A. Gillis, P.E. Neagoe, B. Labarthe, P. Theroux, M.G. Sirois, M. Tabrizian, E. Thorin, Y. Merhi, Endothelial progenitor cells bind and inhibit platelet function and thrombus formation, *Circulation* 120 (2009) 2230-2239.
- [23] U. Schonbeck, P. Libby, The CD40/CD154 receptor/ligand dyad, *Cell Mol Life Sci* 58 (2001) 4-43.
- [24] P. Andre, L. Nannizzi-Alaimo, S.K. Prasad, D.R. Phillips, Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease, *Circulation* 106 (2002) 896-899.
- [25] V. Henn, J.R. Slupsky, M. Grafe, I. Anagnostopoulos, R. Forster, G. Muller-Berghaus, R.A. Kroczek, CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells, *Nature* 391 (1998) 591-594.
- [26] D. Yacoub, A. Hachem, J.F. Theoret, M.A. Gillis, W. Mourad, Y. Merhi, Enhanced levels of soluble CD40 ligand exacerbate platelet aggregation and thrombus formation through a CD40-dependent tumor necrosis factor receptor-associated factor-2/Rac1/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30 (2010) 2424-2433.
- [27] D. Engel, T. Seijkens, M. Poggi, M. Sanati, L. Thevissen, L. Beckers, E. Wijnands, D. Lievens, E. Lutgens, The immunobiology of CD154-CD40-TRAF interactions in atherosclerosis, *Semin Immunol* 21 (2009) 308-312.
- [28] K. Karmann, C.C. Hughes, J. Schechner, W.C. Fanslow, J.S. Pober, CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 4342-4346.

- [29] F. Mach, U. Schonbeck, R.P. Fabunmi, C. Murphy, E. Atkinson, J.Y. Bonnefoy, P. Graber, P. Libby, T lymphocytes induce endothelial cell matrix metalloproteinase expression by a CD40L-dependent mechanism: implications for tubule formation, *Am J Pathol* 154 (1999) 229-238.
- [30] S. Chakrabarti, P. Blair, J.E. Freedman, CD40-40L signaling in vascular inflammation, *J Biol Chem* 282 (2007) 18307-18317.
- [31] P. Ferroni, F. Santilli, F. Guadagni, S. Basili, G. Davi, Contribution of platelet-derived CD40 ligand to inflammation, thrombosis and neoangiogenesis, *Curr Med Chem* 14 (2007) 2170-2180.
- [32] C. Antoniades, C. Bakogiannis, D. Tousoulis, A.S. Antonopoulos, C. Stefanadis, The CD40/CD40 ligand system: linking inflammation with atherothrombosis, *J Am Coll Cardiol* 54 (2009) 669-677.
- [33] E. Lutgens, L. Gorelik, M.J. Daemen, E.D. de Muinck, I.S. Grewal, V.E. Kotliansky, R.A. Flavell, Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis, *Nat Med* 5 (1999) 1313-1316.
- [34] F. Cipollone, F. Chiarelli, G. Davi, C. Ferri, G. Desideri, M. Fazio, A. Iezzi, F. Santilli, B. Pini, C. Cuccurullo, S. Tumini, A. Del Ponte, A. Santucci, F. Cuccurullo, A. Mezzetti, Enhanced soluble CD40 ligand contributes to endothelial cell dysfunction in vitro and monocyte activation in patients with diabetes mellitus: effect of improved metabolic control, *Diabetologia* 48 (2005) 1216-1224.
- [35] J.A. de Lemos, A. Zirlik, U. Schonbeck, N. Varo, S.A. Murphy, A. Khera, D.K. McGuire, G. Stanek, H.S. Lo, R. Nuzzo, D.A. Morrow, R. Peshock, P. Libby, Associations between soluble CD40 ligand, atherosclerosis risk factors, and subclinical atherosclerosis: results from the Dallas Heart Study, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25 (2005) 2192-2196.
- [36] A. Chatzigeorgiou, M. Lyberi, G. Chatzilymperis, A. Nezos, E. Kamper, CD40/CD40L signaling and its implication in health and disease, *Biofactors* 35 (2009) 474-483.
- [37] M. Xia, G. Li, J. Ma, W. Ling, Phosphoinositide 3-kinase mediates CD40 ligand-induced oxidative stress and endothelial dysfunction via Rac1 and NADPH oxidase 2, *J Thromb Haemost* 8 397-406.
- [38] M. Hristov, D. Gumbel, E. Lutgens, A. Zerneck, C. Weber, Soluble CD40 ligand impairs the function of peripheral blood angiogenic outgrowth cells and increases neointimal formation after arterial injury, *Circulation* 121 (2010) 315-324.
- [39] L.E. Mead, D. Prater, M.C. Yoder, D.A. Ingram, Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from human blood, *Curr Protoc Stem Cell Biol* Chapter 2 (2008) Unit 2C 1.
- [40] Y. Zhang, D.A. Ingram, M.P. Murphy, M.R. Saadatzaheh, L.E. Mead, D.N. Prater, J. Rehman, Release of proinflammatory mediators and expression of proinflammatory adhesion molecules by endothelial progenitor cells, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296 (2009) H1675-1682.
- [41] J.D. Stroncek, B.S. Grant, M.A. Brown, T.J. Povsic, G.A. Truskey, W.M. Reichert, Comparison of endothelial cell phenotypic markers of late-outgrowth endothelial progenitor cells isolated from patients with coronary artery disease and healthy volunteers, *Tissue Eng Part A* 15 (2009) 3473-3486.

- [42] H. Abou-Saleh, J.F. Theoret, D. Yacoub, Y. Merhi, Neutrophil P-selectin-glycoprotein-ligand-1 binding to platelet P-selectin enhances metalloproteinase 2 secretion and platelet-neutrophil aggregation, *Thromb Haemost* 94 (2005) 1230-1235.
- [43] M. Wu, Y.G. Li, The expression of CD40-CD40L and activities of matrix metalloproteinases in atherosclerotic rats, *Mol Cell Biochem* 282 (2006) 141-146.
- [44] A. Zampetaki, J.P. Kirton, Q. Xu, Vascular repair by endothelial progenitor cells, *Cardiovasc Res* 78 (2008) 413-421.
- [45] K. Stellos, H. Langer, K. Daub, T. Schoenberger, A. Gauss, T. Geisler, B. Bigalke, I. Mueller, M. Schumm, I. Schaefer, P. Seizer, B.F. Kraemer, D. Siegel-Axel, A.E. May, S. Lindemann, M. Gawaz, Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human CD34+ cells to endothelial progenitor cells, *Circulation* 117 (2008) 206-215.
- [46] H.F. Langer, A.E. May, D. Vestweber, H.C. De Boer, A.K. Hatzopoulos, M. Gawaz, Platelet-induced differentiation of endothelial progenitor cells, *Semin Thromb Hemost* 33 (2007) 136-143.
- [47] H. Langer, A.E. May, K. Daub, U. Heinzmann, P. Lang, M. Schumm, D. Vestweber, S. Massberg, T. Schonberger, I. Pfisterer, A.K. Hatzopoulos, M. Gawaz, Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro, *Circ Res* 98 (2006) e2-10.
- [48] D. Leshem-Lev, A. Omelchenko, L. Perl, R. Kornowski, A. Battler, E.I. Lev, Exposure to platelets promotes functional properties of endothelial progenitor cells, *J Thromb Thrombolysis* 30 398-403.
- [49] W. Hiesinger, J.R. Frederick, P. Atluri, R.C. McCormick, N. Marotta, J.R. Muenzer, Y.J. Woo, Spliced stromal cell-derived factor-1alpha analog stimulates endothelial progenitor cell migration and improves cardiac function in a dose-dependent manner after myocardial infarction, *J Thorac Cardiovasc Surg* 140 (2010) 1174-1180.
- [50] K. Otterdal, T.M. Pedersen, N.O. Solum, Release of soluble CD40 ligand after platelet activation: studies on the solubilization phase, *Thromb Res* 114 (2004) 167-177.
- [51] F. Santilli, S. Basili, P. Ferroni, G. Davi, CD40/CD40L system and vascular disease, *Intern Emerg Med* 2 (2007) 256-268.
- [52] M.A. Renault, D.W. Losordo, The matrix revolutions: matrix metalloproteinase, vasculogenesis, and ischemic tissue repair, *Circ Res* 100 (2007) 749-750.

Figure legends

Figure 1: Effect of sCD40L on MMP-9 release from EOCs. (A) Differential MMP expression in EOCs and HUVECs. Gelatin zymography gel representative of MMP released from HUVECs and EOCs, showing EOCs significantly release MMP-9 whereas HUVECs release MMP-2. Histogram represents the mean optical density of at least 4 independent experiments ($n \geq 4$, $**P < 0.01$ vs. HUVECs). (B) Gelatin zymography gel showing control and sCD40L (0.1, 0.5 and $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$) concentration-dependent MMP-9 release by EOCs following 24 hours of stimulation. Histogram represents the mean density ratio of at least 3 independent experiments ($n \geq 3$, $*P < 0.05$ vs. control).

Figure 2: sCD40L induces p38 MAPK phosphorylation in EOCs. Representative SDS-PAGE blot of EOCs pre-treated or not with sCD40L ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), p38 inhibitor SB203580 ($10 \mu\text{M}$), and double sCD40L and SB203580. Fold increase in phospho-p38 MAPK band density was calculated compared to control EOCs using optical density analysis. Histogram represents mean fold increase in optical density of at least 3 independent experiments ($n \geq 3$, $*P < 0.05$ vs. EOCs and EOCs + sCD40L)

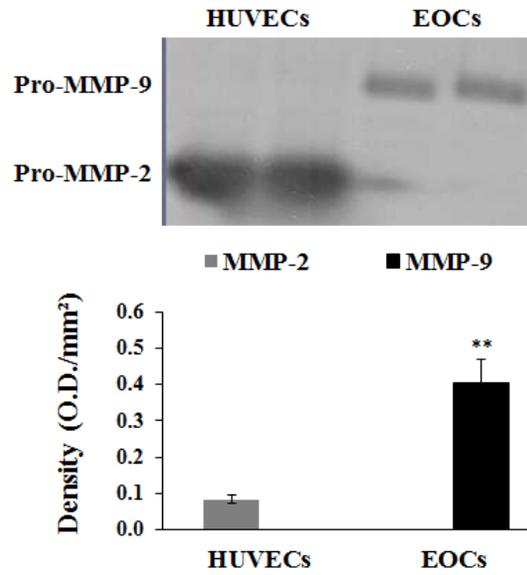
Figure 3: sCD40L-induced MMP-9 release is reversed by p38 MAPK inhibition in EOCs. Representative gelatin zymography gel of EOCs pre-treated or not with sCD40L ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), p38 inhibitor SB203580 ($10 \mu\text{M}$), and double sCD40L and SB203580. Fold increase in pro-MMP-9 (92 kDa) band density was calculated compared to control EOCs using optical density analysis. Histogram represents mean fold increase in optical density of at least 3 independent experiments ($n \geq 3$, $*P < 0.05$ vs. EOCs and EOCs + SB203580 + sCD40L)

Figure 4: sCD40L-treated EOCs induce endothelial wound healing via MMP-9 release. (A) Images representative of wound healing assay at 0 and 8 hours following HUVEC wound scratch in the presence of supernatants from EOCs pre-treated or not with sCD40L ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), MMP-9 inhibitor ($10 \mu\text{M}$), and double sCD40L and MMP-9 inhibitor. Images were taken using an inverted microscope at 2X magnification. (B) Histogram represents percent wound healing of HUVECs in presence of supernatants from EOCs pre-treated or not with sCD40L ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), MMP-9 inhibitor ($10 \mu\text{M}$), and double sCD40L and MMP-9

inhibitor. Wound area was calculated at 0 and 8 hours and percent wound healing was calculated for each treatment condition. Histogram represents mean data of percent wound healing of at least 3 independent experiments ($n \geq 3$, $*P < 0.05$ vs EOCs and EOCs + MMP-9 inhibitor + sCD40L).

Figure 1

A



B

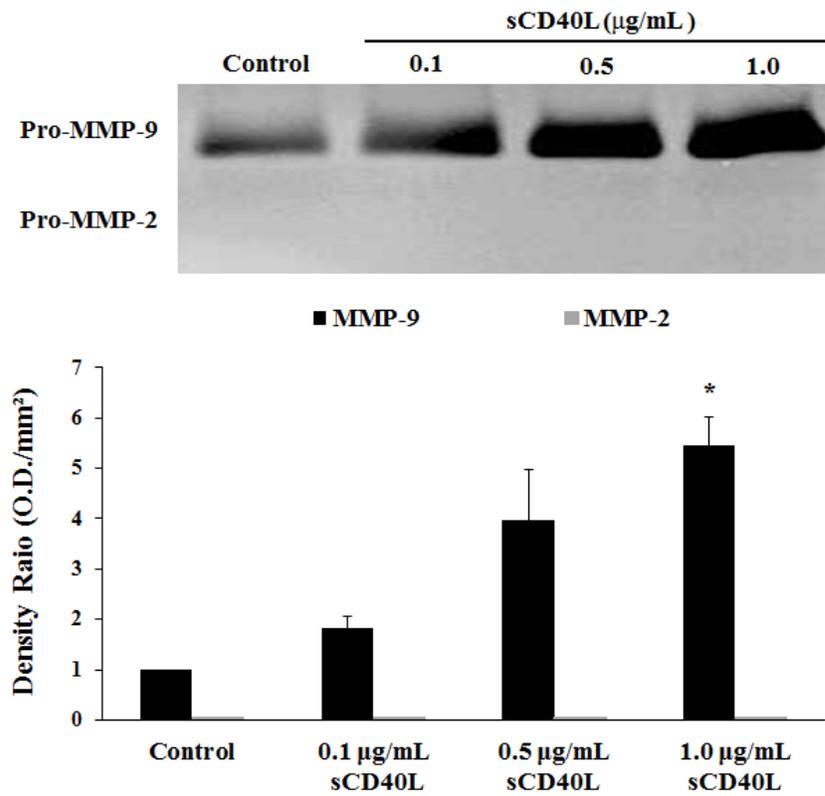


Figure 2

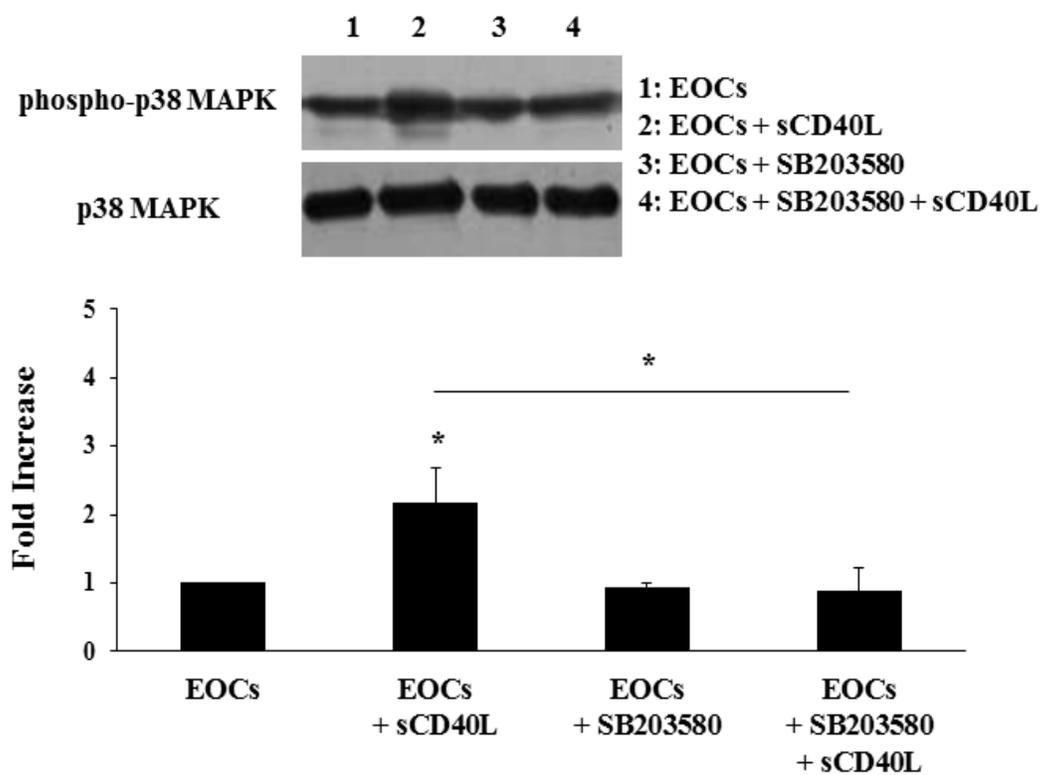


Figure 3

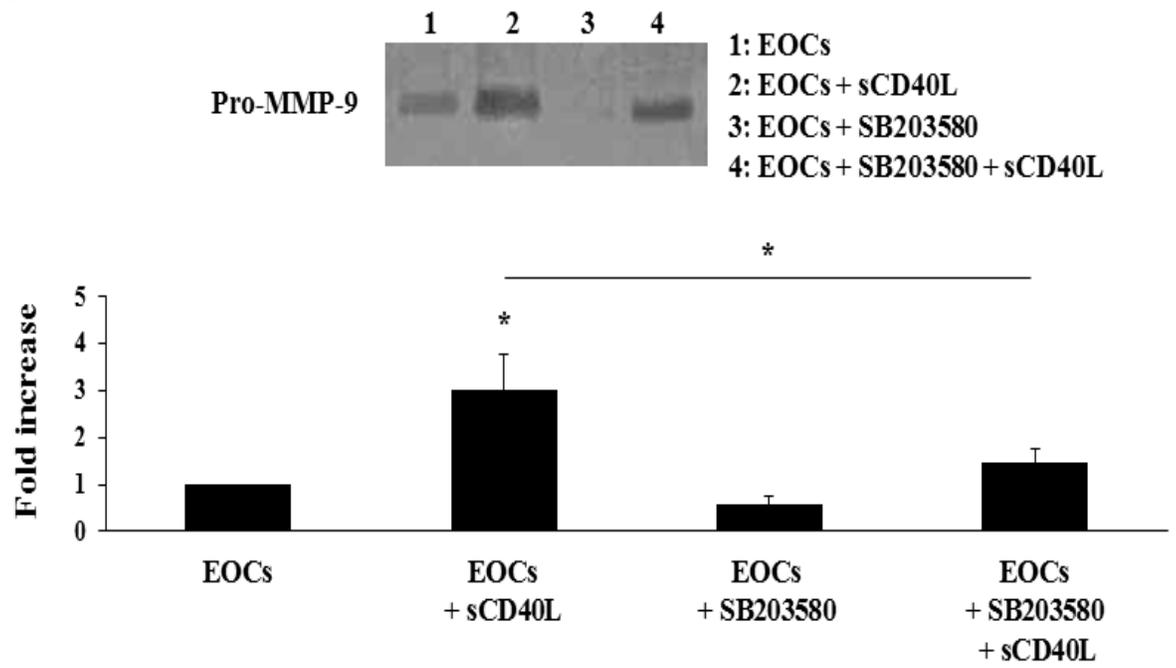
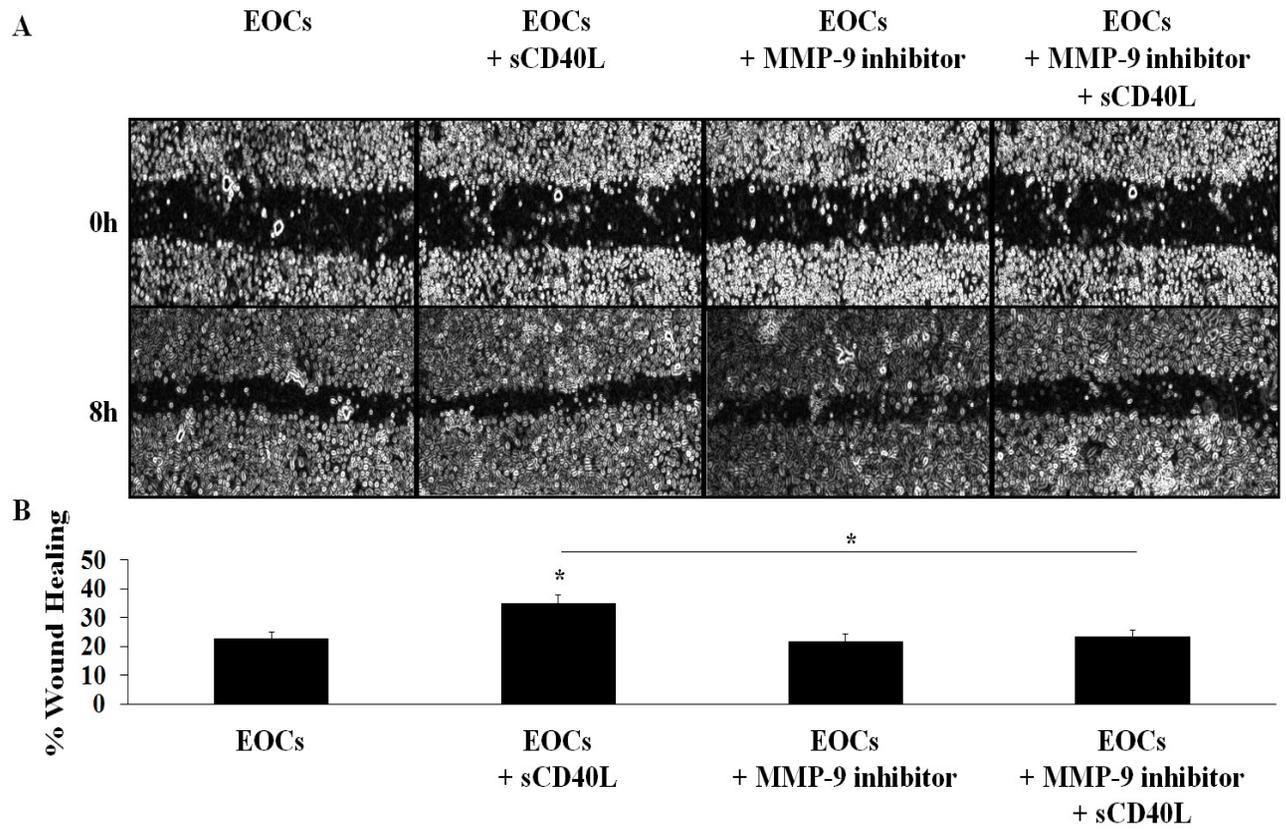


Figure 4



Chapitre 7

Résultats supplémentaires

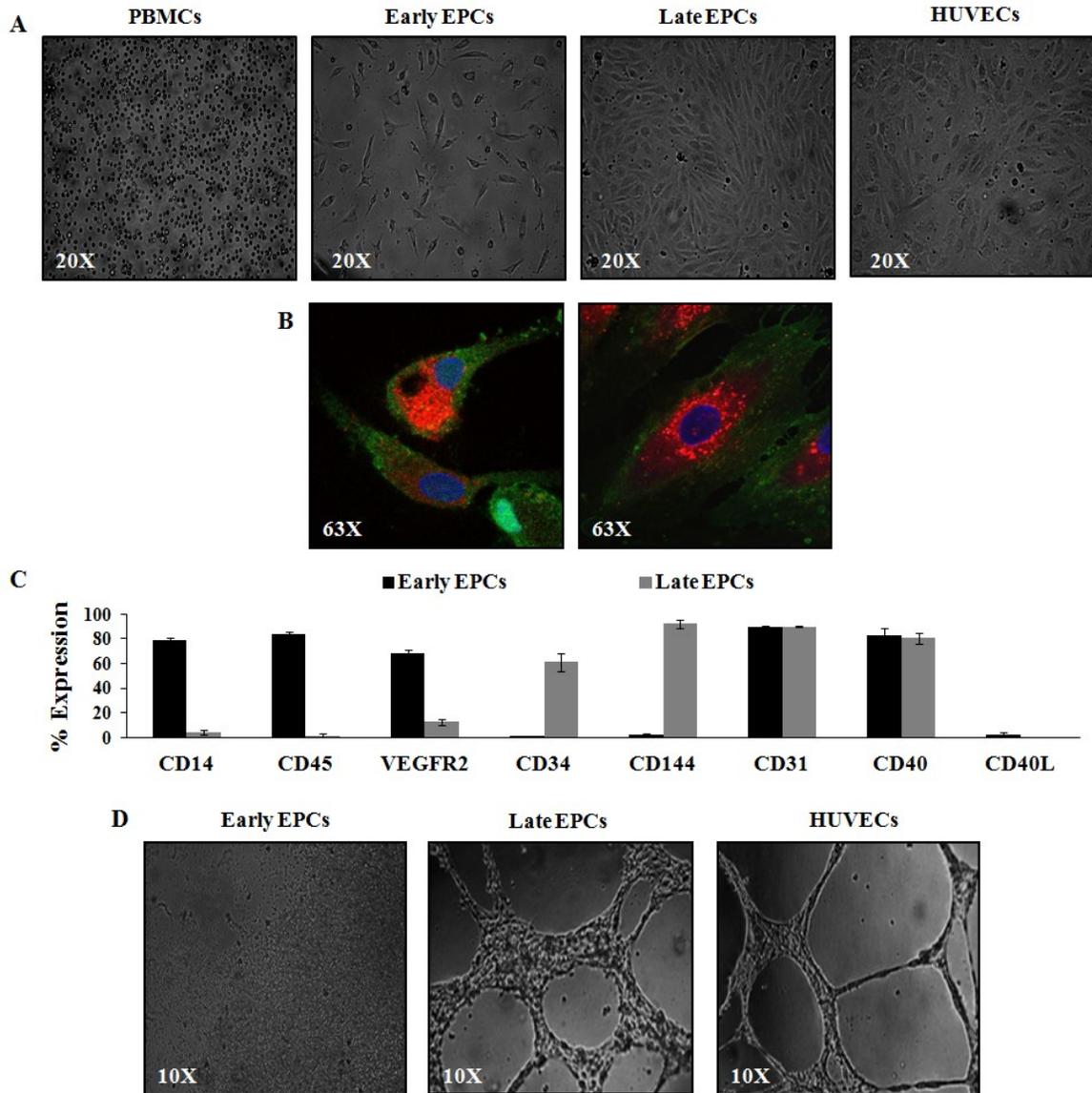


Figure 7.1: Caractérisation comparative des «early» et «late» EPCs. A) Images représentatives des PBMCs, «early» EPCs, «late» EPCs et HUVECs par microscopie optique (20X). Les PBMCs ont été ensemencées sur la fibronectine à une densité de 10×10^6 cellules/cm² pour générer des «early» EPCs et sur le collagène à une densité de 60×10^6 cellules/cm² pour générer des «late» EPCs. Les «early» EPCs sont caractérisées comme étant une population hétérogène de cellules rondes et allongées sur une surface de fibronectine suite à 7 jours de culture alors que les «late» EPCs démontrent une monocouche homogène de cellules «cobblestone-like» sur une surface de collagène suite à 21 jours de culture, ressemblant au HUVECs. B) Images représentatives de double marquage de DiI-AcLDL (rouge) et Ulex-lectin (vert) ainsi que le marquage nucléaire TO-PRO-3 (bleu) des «early» et «late» EPCs par microscopie confocale (63X) (n≥3). C) Le profil d'expression des marqueurs de surface cellulaire par cytométrie en flux dans les «early» and «late» EPCs utilisant des anticorps monoclonaux conjugués au PE (phycoérythrine) dirigés contre : CD14, CD45, VEGFR2, CD34, CD144, CD31, CD40 et CD40L. L'histogramme est représentatif de la moyenne ± SEM (n≥4). D) Images par microscopie optique (10X) représentatives du potentiel de formation de tubes sur Matrigel des «early» et «late» EPCs en comparaison aux HUVECs (n≥3).

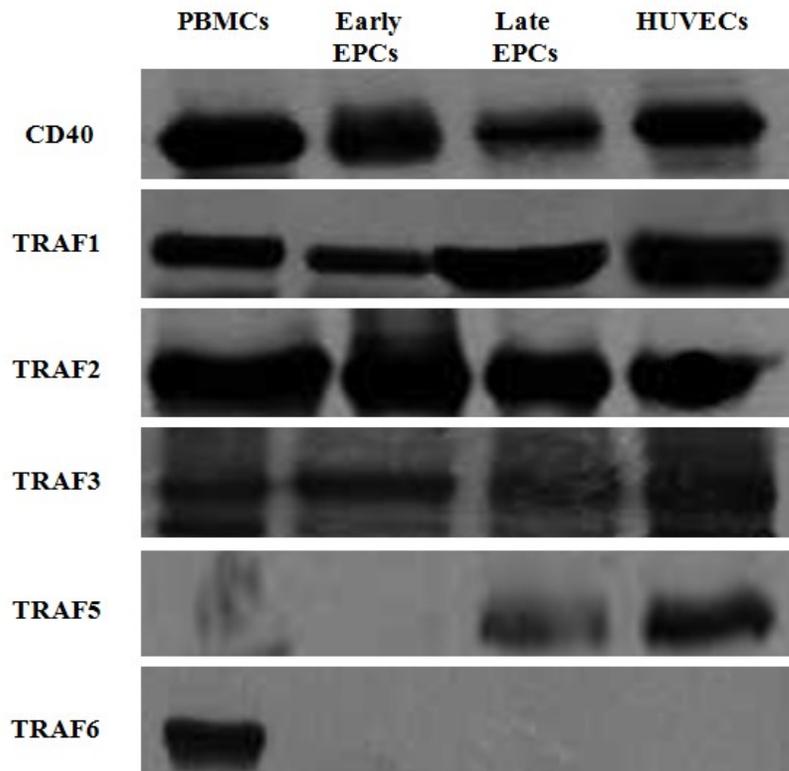


Figure 7.2: Expression de CD40 et des TRAFs dans les EPCs dérivées des PBMCs. Gels représentatifs des lysats cellulaires analysés pour TRAF1, 2, 3, 5 et TRAF6 et révélés par SDS-PAGE (Western Blot) (n≥3).

Tableau 7.1 : Caractéristiques des «early» et «late» EPCs

	Early EPCs	Late EPCs
Culture	4-7 jours EGM2 Fibronectine 10 x 10 ⁶ cellules/puits	21+ jours EGM2+10%FBS Collagène 60 x 10 ⁶ cellules/puits
Expression de marqueurs	CD14+, CD45+, tie2+, VEGFR2+, CD31+, CD34-, CD144-, CD40+	CD14-, CD45-, CD31+, CD34+, CD144+, CD40+
Potentiel prolifératif	Non	Oui
Potentiel angiogénique	Ne forment pas de tubes sur Matrigel	Forment des tubes sur Matrigel
Expression des TRAFs	TRAF1, 2, 3	TRAF1, 2, 3, 5

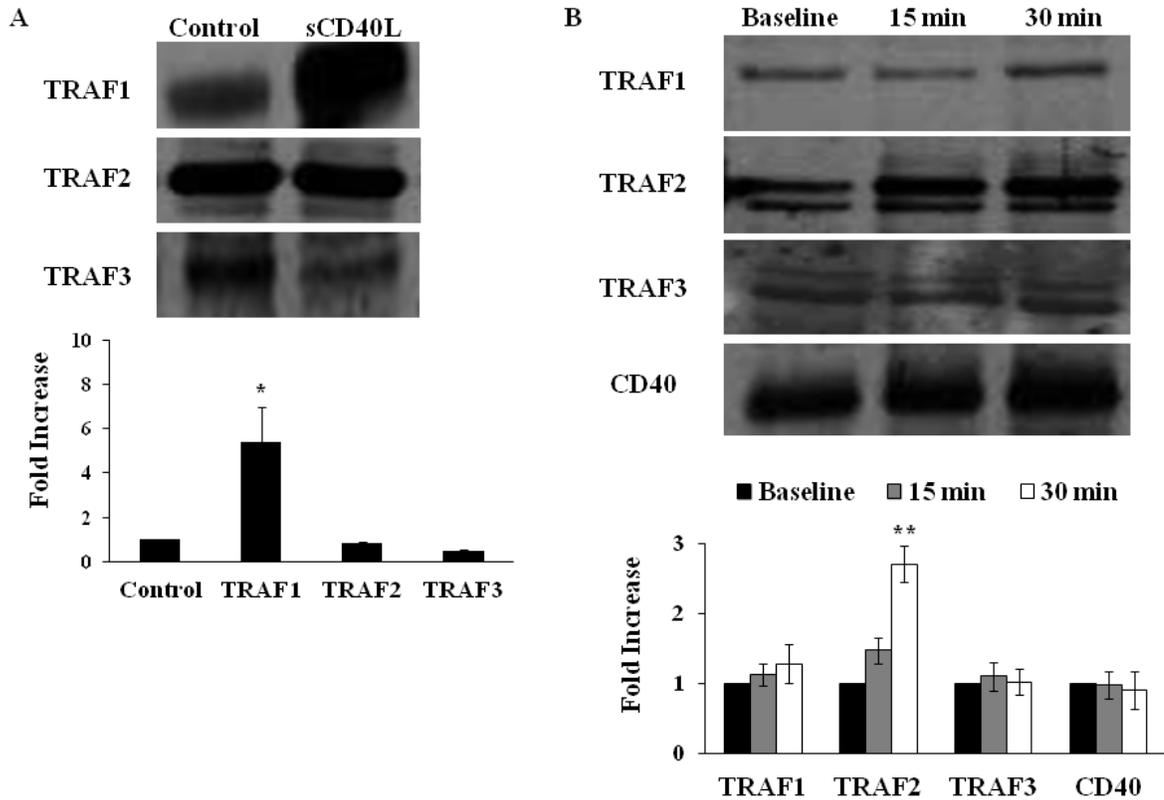


Figure 7.3: Effet du sCD40L sur les TRAFs dans les «early» EPCs. (A) Effet du sCD40L sur l'expression de TRAF1, 2 et 3 dans les EOCs stimulées 24 heures avec le sCD40L (1 µg/mL). L'expression des TRAFs a été révélée par SDS-PAGE (Western Blot). L'histogramme représente la moyenne d'augmentation de la densité optique de l'expression des TRAFs dans les EOCs stimulées avec le sCD40L. Moyenne ± SEM, n=3, * $P < 0.05$ vs control. (B) Effet du sCD40L sur l'association des TRAF1, 2 et 3 au CD40. Les EOCs ont été stimulées avec le sCD40L (1 µg/mL) pour 15 et 30 minutes ou non-traitées (baseline). Le CD40 des EOCs a été immunoprécipité en utilisant un anticorps monoclonal anti-CD40. Les échantillons immunoprécipités ont été analysés pour TRAF1, 2 et 3 par SDS-PAGE (Western Blot). L'histogramme représente la moyenne d'augmentation de la densité optique de l'association des TRAFs au CD40 dans les EOCs stimulées avec le sCD40L, démontrant une augmentation temps-dépendante de l'association de TRAF2 au CD40. Moyenne ± SEM, n ≥ 4, ** $P < 0.01$ vs baseline.

Discussion

L'importance des EPCs en médecine régénérative a émergé suite à l'étude pionnière publiée par Asahara *et al.* en 1997 qui a démontré qu'une population de cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ circule parmi les cellules du sang périphérique humain et possède un potentiel de différenciation en cellules endothéliales matures qui peuvent contribuer à la néovascularisation.²⁶ La fonction des EPCs dans le maintien de l'intégrité vasculaire, la réparation et la régénération vasculaire ainsi que dans l'ingénierie tissulaire a largement été décrite au cours des dernières années. Leur potentiel thérapeutique important suggère que ces cellules seraient une cible thérapeutique importante dans les maladies cardiovasculaires, telle que l'athérosclérose, et les maladies coronariennes aiguës.

En état physiologique normal, les EPCs circulent dans le sang périphérique et n'interagissent pas avec l'endothélium vasculaire. Cependant, lorsque l'état physiologique est en déséquilibre et tend vers un profil pathologique associé à une dysfonction endothéliale, les EPCs sont alors appelées à participer au processus de réparation et de régénération vasculaire. Elles sont influencées également par le statut des autres cellules sanguines, telles que les plaquettes, avec lesquelles elles viennent en contact. Lors d'une lésion vasculaire, les plaquettes sont les premières cellules recrutées au site vasculaire en question. L'adhésion et l'activation des plaquettes entraînent des changements physiologiques caractérisés par la relâche d'une panoplie des facteurs, comme l'ADP, la TXA₂, des MMPs et des facteurs de croissance, qui contribuent à l'activation et au recrutement des autres cellules en proximité, telles que les cellules endothéliales, les EPCs, les leucocytes et d'autres plaquettes. Les EPCs qui sont alors recrutées jouent le rôle de cellules réparatrices qui, dépendamment de leur nature, peuvent contribuer à la réparation vasculaire soit par l'entremise de la relâche de facteurs angiogéniques ou l'incorporation directe aux sites de lésions vasculaires. Cependant, des limitations dans l'utilisation des EPCs ont été notées, particulièrement à cause de leur faible nombre en circulation.

Plusieurs études ont développé des moyens afin d'augmenter la mobilisation des EPCs et leur recrutement aux sites d'endommagement et de lésions vasculaires. Entre autres, la mobilisation et le recrutement des EPCs à partir de la moelle osseuse fut une approche importante impliquant l'utilisation de cytokines, telles que le SDF-1 α et le GM-CSF.^{62, 67, 92,}

135, 264, 328, 569, 570 D'autre part, l'expansion des EPCs en culture *ex vivo* et leur transplantation aux sites de lésions vasculaires fut une autre approche thérapeutique envisagée dans plusieurs études expérimentales. Ainsi, trois sources principales ont été décrites pour générer des EPCs: la moelle osseuse, le cordon ombilical et le sang périphérique. Cependant, aucun consensus ne fut atteint sur les conditions optimales concernant la source, la nature, la caractérisation, et la fonction des EPCs. Au contraire, une controverse a émergé indiquant que les cellules initialement considérées comme étant des EPCs ne sont pas de «vraies» EPCs.^{53, 75, 571} En effet, des études approfondies plus récentes ont démontré la présence de deux sous-type d'EPCs : «*early*» et «*late*», chacun ayant une morphologie, un phénotype et une fonction différente.^{69, 75, 80, 82, 85, 86, 259} Dans ce projet, nous avons réussi à différencier et caractériser les deux sous-types d'EPCs, «*early*» et «*late*», selon des méthodes qui ont été standardisées au cours des dernières années.^{80, 82, 572} Ceci implique une méthodologie et des conditions de culture spécifiques pour générer chaque sous-population d'EPCs (Tableau 7.1). Alors que les «*early*» EPCs sont cultivées, à faible concentration, pour quelques jours sur la fibronectine, les «*late*» EPCs sont cultivées sur le collagène pour plus de 21 jours, à de plus grandes concentrations permettant des contacts intercellulaires plus étroits; tous les deux dans un milieu favorisant la différenciation endothéliale.

Comme il a été rapporté précédemment, les «*early*» EPCs ressemblent morphologiquement et phénotypiquement aux monocytes (Figure 7.1A). Suite à leur différenciation à partir des PBMCs, les «*early*» EPCs forment une population hétérogène de cellules allongées, mais également de cellules encore rondes. D'ailleurs, ces cellules continuent à exprimer le marqueur monocytaire CD14 et leucocytaire CD45, mais acquièrent l'expression de marqueurs endothéliaux, tels que le VEGFR-2 et le CD31 (Figure 7.1C). Du point de vue fonctionnel, en conformité avec des études antérieures, nous avons rapporté que les «*early*» EPCs ne sont pas prolifératives et ne peuvent pas former de nouveaux tubes sur Matrigel (Figure 7.1D). Cependant, leur rôle dans l'angiogenèse a été attribué à la relâche d'une multitude de facteurs angiogéniques paracrines qui contribuent à la réparation endothéliale et à la néoangiogenèse (Tableau 7.1).^{80, 85, 257, 571-573}

Quant aux «*late*» EPCs, celles-ci ressemblent aux cellules endothéliales matures par leur morphologie et leur phénotype (Figure 7.1). En effet, elles forment une population homogène de cellules «*cobblestone-like*» qui sont caractérisées par l'absence de marqueurs

leucocytaires et par leur expression de marqueurs progéniteurs, CD34, et endothéliaux, CD144 et CD31. Les deux sous-types d'EPCs lient l'Ulex-lectine et assimilent l'Ac-LDL, une caractéristique importante dans la définition des EPCs en général (Figure 7.1B).

Étant donné que l'objectif de nos études était d'étudier l'existence et le rôle potentiel de l'axe CD40L/CD40 dans la fonction des EPCs, nous avons voulu identifier l'expression du récepteur CD40 et de son ligand, le CD40L, ainsi que les protéines adaptatrices, nommées les TRAFs, qui sont nécessaires à la signalisation intracellulaire du CD40, puisque ce dernier ne possède pas d'activité signalétique intrinsèque.⁴⁴⁶

Avant d'entreprendre nos études sur les effets du CD40L sur les fonctions des EPCs, nous avons tout d'abord démontré que les «*early*» et «*late*» EPCs expriment son récepteur le CD40, mais pas le CD40L (Figure 7.1C), au contraire des plaquettes qui expriment le CD40 et son ligand le CD40L et qui constituent la source principale du sCD40L dans la circulation. De plus, ces deux sous-types d'EPCs expriment de manière différentielle les membres de la famille des TRAFs qui sont essentiels à la fonction du CD40 (Figure 7.2). Au niveau de l'expression des TRAFs, les «*early*» EPCs ressemblent aux PBMCs par l'expression des TRAF1, 2 et 3 alors que les «*late*» EPCs ressemblent plutôt aux HUVECs par l'expression des TRAF1, 2, 3 et 5. Il est intéressant de noter que seuls les PBMCs expriment le TRAF6 et que ce dernier est perdu au cours de leur différenciation en «*early*» et «*late*» EPCs. Ainsi, nous pouvons postuler que l'absence de TRAF6 pourrait être considérée comme marqueur de différenciation cellulaire, mais ceci reste à être confirmé. Étant donné que le profil d'expression des TRAFs est différentiel dans les PBMCs, «*early*» EPCs, «*late*» EPCs et HUVECs, et que cette expression est altérée au cours de la différenciation des EPCs, ces résultats suggèrent que les TRAFs pourront être impliqués dans la différenciation et la fonction de ces cellules. De plus, des études ont rapporté le rôle des TRAFs dans d'autres types cellulaires. Entre autres, le TRAF2 active la voie non-canonique de NF- κ B dans les cellules B et stimule la différenciation de ces cellules.^{574, 575} Par ailleurs, le rôle de TRAF6 a été reconnu dans la maturation et la génération de cellules plasmiques.⁵⁷⁶ De plus, les TRAFs pourraient être impliqués dans différentes fonctions cellulaires, telles que la prolifération, la sécrétion cellulaire et l'apoptose. Une étude portant sur les cellules humaines embryonnaires de rein (HEK293) suggère que l'activation des récepteurs de la famille du TNFR par le TNF- α induit le recrutement des TRAFs et

l'activation de voies signalétiques intracellulaires qui résultent en l'augmentation de la production des ROS dans les mitochondries de ces cellules.⁵⁷⁷

L'axe CD40L/CD40, initialement étudié dans le domaine de l'immunité, est maintenant considéré comme étant un modulateur important dans l'inflammation et, particulièrement, dans les réactions thrombo-inflammatoires manifestées dans les maladies cardiovasculaires. Il a été postulé que le CD40L est impliqué dans la déstabilisation de la plaque athérosclérotique^{283, 447, 452, 463, 547, 578-580} par l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion cellulaires, des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines, des MMPs, des facteurs de coagulation, des facteurs de croissance et des ROS. Dans ce contexte, il a été rapporté que les individus souffrant de maladies cardiovasculaires exhibent des niveaux plus élevés de la forme soluble du CD40L (sCD40L) par rapport aux individus sains.⁴⁴⁸ Or, une corrélation entre les niveaux plasmatiques du sCD40L et l'incidence des maladies cardiovasculaires a été établie, particulièrement dans l'athérosclérose et les maladies coronariennes aiguës. Cet axe a aussi été étudié pour son implication physiologique et pathologique dans les cellules immunitaires, les plaquettes, les leucocytes, et les cellules endothéliales. Avec l'émergence des EPCs comme cellules centrales en médecine régénérative, où elles sont appelées à interagir avec les cellules sanguines et vasculaires, l'étude de l'axe CD40L/CD40 dans ce contexte sera essentielle afin de comprendre les relations qui existent entre les niveaux élevés du sCD40L, qui dérivent majoritairement des plaquettes, et les fonctions des EPCs. Par ailleurs, les plaquettes peuvent moduler le recrutement et la fonction des EPCs aux sites de lésions vasculaires et l'équipe du Dr Merhi a démontré que les EPCs interagissent aussi avec les plaquettes et modulent leurs fonctions.¹¹⁷ Plus récemment, la même équipe a démontré que l'axe CD40L/CD40 est impliqué dans la fonction plaquettaire.⁵⁰⁸ Ainsi, nous avons postulé que les interactions entre les plaquettes et les EPCs pourraient être modulées par l'axe CD40L/CD40.

Dans un premier temps, ayant été démontré que les EPCs inhibent l'activation et l'agrégation plaquettaire et la formation de thrombus via un mécanisme impliquant des interactions adhésives avec la P-sélectine plaquettaire et l'augmentation de l'expression de COX-2 et la production de PGI₂,¹¹⁷ nous avons étudié le rôle des «early» EPCs dans l'agrégation plaquettaire et l'implication de l'axe CD40L/CD40 dans ce processus.

D'ailleurs, les interactions des EPCs avec les plaquettes offrent des signaux cellulaires qui induisent le recrutement et la migration des EPCs ainsi que leur différenciation en cellules endothéliales matures.^{111-114, 308, 429} Le rôle des plaquettes dans l'athéromatose a été mis en évidence,³⁶² et, plus récemment, le laboratoire de Dr Merhi a étudié l'effet du sCD40L sur la fonction plaquettaire et a trouvé que le sCD40L potentialise l'activation et l'agrégation des plaquettes ainsi que la formation de thrombus via un mécanisme impliquant l'axe CD40/TRAF2/p38 MAPK.⁵⁰⁸ Toutefois, aucune étude n'a élucidé, jusqu'à présent, l'effet du sCD40L sur le rôle des EPCs dans la fonction plaquettaire. Des études cliniques ont démontré le potentiel des EPCs, capturées sur des stents endovasculaires, à prévenir la thrombose.^{333, 581-584} Sachant que les individus souffrant de maladies cardiovasculaires présentent des niveaux élevés de sCD40L en circulation et que la fonction des EPCs chez ces individus est réduite, nous avons envisagé d'étudier l'effet du sCD40L sur la fonction protectrice des EPCs. Ainsi, nos résultats démontrent que le sCD40L renverse l'effet inhibiteur des «*early*» EPCs dans l'agrégation plaquettaire. Nous avons confirmé dans cette étude que l'inhibition de l'agrégation plaquettaire par les «*early*» EPCs est principalement due à une relâche de PGI₂.¹¹⁷ En effet, lorsque la relâche de PGI₂ est inhibé par le NS-398, un inhibiteur de COX-2, l'effet inhibiteur des «*early*» EPCs dans l'agrégation plaquettaire est renversé, alors que l'inhibition du NO, par le PTIO, un chélateur du NO, n'a aucun effet sur la fonction des «*early*» EPCs. À notre grande surprise, le sCD40L n'avait pas d'effet sur la relâche de PGI₂ ni de NO, ce qui suggère que d'autres facteurs sont altérés par le sCD40L pour renverser le profil anti-agrégant des «*early*» EPCs. Ainsi, nous avons postulé que l'effet du sCD40L pourrait être expliqué par une perte d'intégrité cellulaire des «*early*» EPCs. Toutefois, aucun effet n'a été noté sur l'apoptose ni sur la viabilité de ces cellules suite à leur stimulation par le sCD40L. Il a été établi que les ROS générés par les leucocytes et les cellules endothéliales influencent l'activité plaquettaire.⁵⁸⁵ D'ailleurs, il a été rapporté que des niveaux accrus de stress oxydatif sont responsables de l'agrégation plaquettaire en réponse au sCD40L.⁵⁶⁷ Dans cette étude, nous avons démontré que le sCD40L induit une augmentation significative de la production des ROS par les «*early*» EPCs; ce qui pourrait expliquer l'effet du sCD40L dans le renversement de l'agrégation plaquettaire, puisque le SOD renverse l'effet du sCD40L sur la propriété anti-plaquettaire des «*early*» EPCs. Il fut rapporté auparavant que le sCD40L réduit la biodisponibilité du NO au niveau des cellules

endothéliales, ce qui pourrait augmenter les ROS et favoriser la thrombose.^{532, 568} Seule une étude récente sur les EPCs a suggéré que le sCD40L induit la production des ROS et pourrait contribuer à réduire la viabilité et la prolifération cellulaire et conséquemment, pourrait favoriser la progression néointimale.⁵³⁶ De plus, nous postulons que les ROS dérivés des «*early*» EPCs, tel que le O_2^- , peuvent réagir avec le NO, un agent anti-agrégant, et former des espèces réactives de l'azote («*Reactive Nitrogen Species*», RNS), dont le peroxy-nitrite (ONOO⁻), contribuant ainsi à entraver davantage la fonction protectrice des «*early*» EPCs.⁵⁸⁵ Or, il est possible que les ROS jouent un rôle dans la balance des facteurs pro- et anti-agrégants, favorisant un profil pro-thrombotique. De plus, il nous serait pertinent d'étudier l'effet du sCD40L sur la fonction anti-plaquettaire des «*early*» EPCs *in vivo* dans un modèle de souris sauvages et déficientes en CD40 (CD40^{-/-}) suite à l'initiation d'une thrombose.

Étant donné que les EPCs sont surtout étudiées pour leur potentiel angiogénique, nous nous sommes intéressés, dans une deuxième étude, à déterminer l'effet du sCD40L dans la fonction angiogénique des «*early*» EPCs. Le processus de néovascularisation est largement dépendant de la propriété invasive des cellules, qui leur permet de migrer à travers une matrice et de se localiser au tissu lésé. Ceci est principalement engendré par la relâche d'enzymes protéolytiques, entre autres les MMPs, qui sont requises pour dégrader la membrane basale permettant ainsi la migration des cellules.⁵⁸⁶ De plus, ces protéases maintiennent l'équilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques par la modification et l'activation des facteurs de croissance.⁵⁸⁶ Le rôle de la MMP-9 a particulièrement été élucidé dans plusieurs études pour son rôle dans le recrutement et dans la mobilisation de cellules progénitrices de la moelle osseuse par un mécanisme impliquant le clivage de sKitL.^{301, 586, 587} En sachant que les «*early*» EPCs sont impliquées dans l'angiogenèse par l'entremise de la relâche des facteurs angiogéniques paracrines,^{80, 85, 257, 571-573} nous avons identifié les MMPs qui sont relâchées par ces cellules et qui pourraient être responsables de la dégradation de la matrice et la formation de nouveaux vaisseaux par les cellules endothéliales. Nous avons démontré que les «*early*» EPCs sécrètent la MMP-9 alors que les HUVECs sécrètent la MMP-2. De plus, le sCD40L augmente significativement la relâche de MMP-9 par les «*early*» EPCs. Ayant été démontré que le sCD40L stimule la voie signalétique de CD40/TRAF2/Rac1/p38 MAPK dans les plaquettes,⁵⁰⁸ notre intérêt portait

sur les mécanismes signalétiques impliqués dans la fonction angiogénique des «*early*» EPCs en présence du sCD40L. En effet, nous avons démontré que le sCD40L induit la phosphorylation de la p38 MAPK dans les «*early*» EPCs et que l'inhibition de cette voie signalétique, par le SB203580, un inhibiteur de la p38 MAPK, inhibe la sécrétion accrue sCD40L-dépendante de la MMP-9. Du point de vue fonctionnel, le surnageant des «*early*» EPCs prétraitées avec le sCD40L induisent la réparation endothéliale. L'inhibition de la MMP-9 renverse l'effet pro-angiogénique des «*early*» EPCs stimulées avec le sCD40L, ce qui confirme que l'effet pro-angiogénique est principalement dû à une relâche accrue de MMP-9. Or, dans cette étude nous avons conclu que l'effet pro-angiogénique des «*early*» EPCs dans la réparation endothéliale est principalement dû à une augmentation de la sécrétion de MMP-9 via un mécanisme intracellulaire impliquant la voie signalétique de la p38 MAPK. Bref, les «*early*» EPCs semblent posséder une capacité angiogénique importante permettant de favoriser la réparation endothéliale. Pour poursuivre cette étude, il nous serait pertinent d'étudier l'effet du sCD40L sur la fonction pro-angiogénique et réparative des «*early*» EPCs *in vivo* dans un modèle de souris sauvages et CD40^{-/-} suite à une ischémie périphérique.

Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la réponse des «*early*» EPCs au sCD40L, nous avons étudié son effet sur l'expression et l'association des TRAFs au récepteur CD40. En effet, nous avons démontré que le sCD40L augmente, de façon significative, l'expression de TRAF1 sans avoir un effet sur l'expression de TRAF2 et 3. De plus, à l'état basal, tous les TRAFs sont associés au récepteur CD40. Par contre, seule l'association du TRAF2 est augmentée dans les «*early*» EPCs suite à leur stimulation avec le sCD40L (Figure 7.3A). Ces résultats supportent des études qui suggèrent que le TRAF1 est un TRAF régulateur, positif ou négatif dépendamment du type cellulaire, de la fonction des autres TRAFs, particulièrement du TRAF2 avec lequel il se lie de façon hétérotrimérique.^{484, 493} Étant donné que le CD40 est également un récepteur membre de la famille des TNFRs, on propose que l'expression et le recrutement accrus des TRAFs observés dans les «*early*» EPCs suite à leur activation avec le sCD40L serait responsable de l'augmentation des ROS, qui renverse l'effet anti-plaquettaire des «*early*» EPCs. Or, nous suggérons que les «*early*» EPCs inhibent l'agrégation plaquettaire et que le sCD40L renverse cet effet inhibiteur des «*early*» EPCs en induisant la production de ROS et ce,

possiblement, par un mécanisme impliquant l'association du TRAF2 au CD40. Cependant, cette spéculation reste à être validée dans des études futures.

Ayant démontré que l'association de TRAF2 au CD40 est significativement augmentée suite à une stimulation avec le sCD40L dans les «*early*» EPCs (Figure 7.3B), notre laboratoire a entamé des études visant à bloquer le TRAF2, ainsi que les autres TRAFs présents dans les EPCs, à l'aide de petits ARNs interférants («*small interfering RNA*» siRNA), afin d'étudier l'effet de ces protéines adaptatrices sur la survie, la différenciation et la fonction des «*early*» EPCs dans l'agrégation plaquettaire et l'angiogenèse. Nous suggérons que l'expression et l'association altérées des TRAFs contribuent à la fonction cellulaire des EPCs. De plus, l'expression différentielle des TRAFs entre les «*early*» et les «*late*» EPCs pourrait expliquer la morphologie, le phénotype et la fonction différentielle de ces deux types d'EPCs.

Il a été suggéré que les «*late*» EPCs sont plus efficaces que les «*early*» EPCs dans la réparation vasculaire par leur capacité de survie, de prolifération, d'incorporation au site de lésions vasculaires et de formation de nouveaux vaisseaux, tel que confirmé dans la présente étude (Figure 7.1D). Par contre, les «*early*» EPCs ne prolifèrent pas, mais elles jouent un rôle plutôt complémentaire à la régénération vasculaire par l'entremise de la relâche des facteurs autocrines et paracrines, tels que des facteurs de croissance, des chimiokines, des cytokines et des MMPs.^{80, 85, 572, 588} Toutefois, des études ont suggéré que la synergie entre les deux sous-types d'EPCs offre un potentiel thérapeutique accru.⁸⁰ En se basant sur ces études, il serait intéressant d'explorer si cette synergie est maintenue en présence de niveaux élevés de sCD40L, tel qu'observé chez les patients souffrant de maladies cardiovasculaires. Dans nos études, nous avons démontré que le sCD40L renverse, d'une part, l'effet anti-plaquettaire des «*early*» EPCs mais, d'autre part, induit la relâche de MMP-9 par ces cellules et promeut la réparation endothéliale des HUVECs. Ces résultats nous amènent à questionner si les effets paracrines des «*early*» EPCs améliorent aussi la fonction réparative des «*late*» EPCs, et si les «*late*» EPCs, à leur tour, améliorent la fonction protectrice des «*early*» EPCs par la relâche d'une multitude de facteurs anti-thrombotiques. Ces études seraient pertinentes particulièrement dans le contexte de l'athérosclérose et maladies coronariennes aiguës.

Les EPCs ont fait le sujet de plusieurs études qui visent des approches thérapeutiques dans les maladies cardiovasculaires, particulièrement l'athérosclérose et l'infarctus du myocarde. Parmi les approches thérapeutiques envisagées, on compte : 1) l'expansion *ex vivo* des EPCs et leur transplantation; 2) la mobilisation et le recrutement des EPCs; et, plus récemment, 3) la thérapie génétique. Les EPCs ont spécifiquement été considérées dans l'utilisation des stents suite à l'angioplastie coronarienne afin de limiter la thrombogénicité et favoriser le révascularisation.^{267, 268, 294, 296, 298, 300, 302, 304, 347, 581, 583, 584, 589} L'expansion des EPCs et la bio-ingénierie des stents ont démontré des résultats bénéfiques post-opératoires. Par contre, des limitations ont été relevées quant à la biodisponibilité et la durée de survie et de protection offerte par ces cellules. D'autre part, l'utilisation de plusieurs facteurs, particulièrement des cytokines et chimiokines, a été considérée comme approche thérapeutique dans le recrutement des EPCs aux sites de lésions vasculaires afin d'augmenter le nombre d'EPCs disponibles.^{169, 264, 329, 346} Ces études ont démontré des résultats positifs puisque le nombre accru de cellules permet davantage la revascularisation et ce, pour une durée accrue. La thérapie génétique des EPCs est une nouvelle méthode utilisée afin d'augmenter leur nombre et leur fonction. Des études récentes utilisant les miRs ont démontré une particularité de ces courtes séquences dans la régulation de gènes cibles permettant d'altérer ou d'améliorer les propriétés cellulaires des EPCs, telles que la prolifération et la sécrétion des facteurs angiogéniques et vasoactifs.^{343-345, 590-593} En se basant sur les résultats de nos études, la modification génétique des EPCs visant à augmenter la production de la PGI₂ par le COX-2 et du NO par les NOS ou d'inhiber la production des ROS seraient une approche intéressante. D'autre part, la modification génétique des EPCs au niveau des TRAFs et/ou du CD40 serait une cible pertinente dans la compréhension de la biologie et de l'application thérapeutique des EPCs. Ces informations nous permettront d'évaluer si le blocage du récepteur CD40 ou de certains TRAFs pourrait servir de moyen à interrompre l'interaction du CD40L avec le CD40 et les effets cellulaires qui en résultent. Étant donné que l'interaction CD40L/CD40 inhibe la fonction protectrice des «early» EPCs dans l'agrégation plaquettaire, mais induit un profil pro-angiogénique de ces cellules dans la réparation endothéliale, nous proposons que le blocage des TRAFs soit plus spécifique que le blocage du récepteur CD40. En assumant que différents TRAFs sont impliqués dans différentes fonctions cellulaires, cette approche permettrait de cibler plus spécifiquement

une fonction cellulaire en particulier. Par contre, pour se faire, les TRAFs spécifiques qui sont impliqués dans chaque fonction cellulaire des EPCs devront d'abord être identifiés. Enfin, dans la thérapie cellulaire utilisant les EPCs, nous visons à compenser les effets néfastes des niveaux élevés de sCD40L sans toutefois entraver les effets protecteurs et réparatives des EPCs en présence du sCD40L. Ayant été démontré que le blocage du CD40L en utilisant un anticorps anti-CD40L, le BG9588, induit des événements thromboemboliques,⁵⁶⁵ la thérapie génétique semble une approche plus appropriée dans la modulation de l'axe CD40L/CD40.

Bien que les études sur les EPCs dans la thérapie cellulaire aient démontré le rôle bénéfique de ces cellules, des limitations ont été notées quant à la survie et la fonctionnalité des EPCs dans le cadre des études cliniques. Nous reconnaissons, sans constituer une limitation pour nos études, que la fonction des EPCs, dans certaines conditions pathologiques associées aux maladies cardiovasculaires, pourrait être compromise par les facteurs de risque présents chez les patients coronariens, à titre d'exemple, et par les médicaments pris par ces patients. Cependant, nos études ont été réalisées avec des EPCs différenciées en culture à partir des PBMCs des donneurs sains. Cette approche est pré requise et essentielle afin de cerner les effets des EPCs en conditions physiologiques normales et aussi afin de mieux caractériser les effets du sCD40L sur leurs propriétés anti-plaquettaires et angiogéniques, avant d'entreprendre des études plus complexes chez les patients. En effet, il faut noter que les individus présentant des risques cardiovasculaires ou souffrant de maladies cardiovasculaires ne répondent pas toujours aux thérapies aux niveaux souhaités. Plusieurs facteurs devront donc être pris en considération. Dans ce contexte, nos études sur l'effet du sCD40L dans la fonction des EPCs suggèrent qu'il reste bien des travaux à accomplir avant de considérer ces cellules «sécuritaires» du point de vue thérapeutique. Alors que ces cellules contribuent considérablement à la réparation vasculaire et à la néoangiogenèse, il est nécessaire de tenir compte que certains de ces effets sur la fonction plaquettaire sont nuls, alors que leurs effets sur l'angiogénèse sont augmentés en présence de niveaux élevés de sCD40L, particulièrement observés chez les individus présentant des risques cardiovasculaires. Or, le sCD40L pourrait contribuer à augmenter ou à limiter leur potentiel thérapeutique, ce qui pourrait expliquer les résultats variables des études cliniques. Il serait donc d'une importance primordiale d'approfondir nos

connaissances sur la biologie des EPCs et de développer les moyens appropriés quant à leur efficacité et leur utilité clinique. Nous soulignons aussi que l'emphase de nos présentes études a été placée sur les «*early*» EPCs. Alors que les «*early*» et «*late*» EPCs expriment semblablement le CD40, les «*early*» EPCs ont été le sujet de cette étude puisque ces cellules sont connues pour leurs effets paracrines sur d'autres cellules du système vasculaire. Or, les prochaines études à entamer porteront sur l'effet des «*early*» EPCs et du sCD40L sur la fonction des «*late*» EPCs.

Conclusions et directions futures

Les résultats de nos études révèlent de nouvelles connaissances sur le rôle des «*early*» EPCs dans la fonction plaquettaire et dans l'angiogenèse. Nous avons démontré que le sCD40L renverse l'effet protecteur et inhibiteur des «*early*» EPCs dans l'agrégation plaquettaire par un mécanisme impliquant une production accrue des ROS. D'autre part, le sCD40L offre un caractère pro-angiogénique aux «*early*» EPCs en stimulant la relâche de facteurs paracrines, particulièrement la MMP-9, qui favorise la réparation endothéliale. Or, les avancées proposées par nos travaux offrent des éléments pertinents à considérer quant à l'utilisation des «*early*» EPCs dans le contexte thérapeutique. Une évaluation approfondie des effets bénéfiques et néfastes du sCD40L sur les «*early*» EPCs devrait être visée avant d'entamer l'utilisation thérapeutique de ces cellules. Le comportement des «*early*» EPCs en présence de niveaux élevés de sCD40L, tel qu'observé dans plusieurs maladies cardiovasculaires, souligne le potentiel angiogénique mais limitant de ces cellules. Or, bien des questions restent à être abordées concernant les mécanismes d'action du sCD40L sur les «*early*» EPCs et l'utilisation de ces cellules à des fins thérapeutiques. D'autre part, nous reconnaissons que des études sur les «*late*» EPCs seront aussi nécessaires afin de comparer l'efficacité thérapeutique de ces deux sous-types d'EPCs dans un contexte où les niveaux plasmatiques de sCD40L sont élevés. Ceci serait essentiel afin de mieux comprendre et évaluer le potentiel thérapeutique des EPCs chez des individus qui présentent un environnement vasculaire thrombo-inflammatoire, comme dans le syndrome coronarien aigu.

Les approches thérapeutiques utilisées jusqu'à ce jour comportent des traitements qui visent à stimuler la mobilisation et le recrutement des EPCs à partir de la moelle osseuse et l'expansion *ex vivo* des EPCs puis leur transplantation. D'autre part, des études plus récentes ont rapporté une approche génétique permettant de moduler le nombre, la survie et la fonction des EPCs. Bien que les méthodes utilisées démontrent un potentiel thérapeutique important des EPCs, des études continues sont nécessaires afin de mieux caractériser les sous-types d'EPCs et de déterminer lesquels seraient les plus efficaces et d'identifier leur source, leur nature et leur fonction. De plus, les moyens d'utilisation des EPCs dans le contexte clinique requièrent encore bien des études afin de bien comprendre les modalités de ces approches, entre autres, le nombre et le type d'EPCs transplantées, leur localisation, leur stade de différenciation et les conditions optimales à utiliser. Or, il reste encore bien des

travaux sur la compréhension de la biologie et des mécanismes cellulaires impliqués dans la fonction des EPCs, spécifiquement chez les individus souffrant de maladies cardiovasculaires.

Suite à notre présente étude, quelques questions méritent des analyses futures :

- 1- Du point de vue mécanistique, il serait important de faire le lien entre les TRAFs qui s'associent au CD40 suite à son activation par le sCD40L et leurs effets cellulaires dans la fonction des EPCs.
- 2- Est-ce que l'axe sCD40L/CD40/TRAFs est impliqué dans la survie, la prolifération, la migration et la différenciation des EPCs? Est-ce que cet axe est aussi impliqué dans les fonctions des EPCs dans l'agrégation plaquettaire et l'angiogenèse?
- 3- Est-ce que les «*late*» EPCs se comportent comme les «*early*» EPCs dans leur réponse au sCD40L? Quel est l'effet du sCD40L sur la fonction des «*late*» EPCs dans l'agrégation plaquettaire et l'angiogenèse?
- 4- Quel sous-type d'EPCs, «*early*» ou «*late*», serait plus efficace dans la thérapie cellulaire *in vivo*? Est-ce que l'influence du sCD40L sur chaque type d'EPCs offrirait un effet thérapeutique et synergique accru?
- 5- Quels sont les effets des «*early*» et «*late*» EPCs dans un modèle *in vivo* de souris sauvages et déficientes en CD40 (CD40^{-/-})? Est-ce que en présence de CD40L, la fonction des EPCs est accrue ou réduite *in vivo*?
- 6- Est-ce que la modification génétique des EPCs pourrait améliorer leur fonction thérapeutique? Par exemple : bloquer ou induire l'expression de certains TRAFs et/ou le CD40, augmenter la production de la PGI₂ et du NO et inhiber la production des ROS.
- 7- Comment peut-on compenser les effets néfastes des niveaux élevés de sCD40L chez les patients souffrant de maladies cardiovasculaires avec un profil thérapeutique accru des EPCs?

Les résultats qui découleront de ces études pourront largement contribuer aux connaissances dans le domaine de la biologie des EPCs et leur potentiel thérapeutique. La compréhension de l'influence du sCD40L sur la fonction des EPCs chez les individus qui souffrent de maladies cardiovasculaires permettrait de planifier des études cliniques plus appropriées, puisque nos études démontrent que l'efficacité des EPCs pourrait être

compromise par la présence du sCD40L. Or, il serait certes important de mener de plus amples études afin d'optimiser les conditions utilisées dans l'application clinique des EPCs.

Bibliographie

1. WHO. World Health Organization. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. 2011:
http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241564373_eng.pdf.
2. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011;473:317-325.
3. North BJ, Sinclair DA. The intersection between aging and cardiovascular disease. *Circ Res* 2012;110:1097-1108.
4. Lawton JS. Sex and gender differences in coronary artery disease. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2011;23:126-130.
5. Risau W, Sariola H, Zerwes HG, Sasse J, Eklblom P, Kemler R, *et al.* Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* 1988;102:471-478.
6. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995;11:73-91.
7. Patel-Hett S, D'Amore PA. Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis. *Int J Dev Biol* 2011;55:353-363.
8. Flamme I, Frolich T, Risau W. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol* 1997;173:206-210.
9. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000;6:389-395.
10. Encyclopædia Britannica Online, s. v. "bone marrow," accessed April 01, 2012, <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/72944/bone-marrow>.
11. Bonnet D. Biology of human bone marrow stem cells. *Clinical and experimental medicine* 2003;3:140-149.
12. Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies. *J Cell Physiol* 1963;62:327-336.
13. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001;19:180-192.
14. Bianchi G, Muraglia A, Daga A, Corte G, Cancedda R, Quarto R. Microenvironment and stem properties of bone marrow-derived mesenchymal cells. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 2001;9:460-466.
15. Hattori K, Dias S, Heissig B, Hackett NR, Lyden D, Tateno M, *et al.* Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 2001;193:1005-1014.
16. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, *et al.* Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995;376:62-66.
17. Haigh JJ. Role of VEGF in organogenesis. *Organogenesis* 2008;4:247-256.
18. Gerber HP, Ferrara N. The role of VEGF in normal and neoplastic hematopoiesis. *Journal of molecular medicine* 2003;81:20-31.
19. Kowanetz M, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin Cancer Res* 2006;12:5018-5022.

20. Parker RC. The Development of Organized Vessels in Cultures of Blood Cells. *Science* 1933;77:544-546.
21. White JF, Parshley MS. Growth in vitro of blood vessels from bone marrow of adult chickens. *Am J Anat* 1951;89:321-345.
22. Mackenzie JR, Hackett M, Topuzlu C, Tibbs DJ. Origin of arterial prosthesis lining from circulating blood cells. *Archives of surgery* 1968;97:879-885.
23. Scott SM, Barth MG, Gaddy LR, Ahl ET, Jr. The role of circulating cells in the healing of vascular prostheses. *J Vasc Surg* 1994;19:585-593.
24. Wu MH, Shi Q, Wechezak AR, Clowes AW, Gordon IL, Sauvage LR. Definitive proof of endothelialization of a Dacron arterial prosthesis in a human being. *J Vasc Surg* 1995;21:862-867.
25. Asahara T, Bauters C, Pastore C, Kearney M, Rossow S, Bunting S, *et al.* Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation* 1995;91:2793-2801.
26. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964-967.
27. Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, *et al.* Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998;92:362-367.
28. Masuda H, Asahara T. Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration. *Cardiovasc Res* 2003;58:390-398.
29. Kalka C, Asahara T, Krone W, Isner JM. [Angiogenesis and vasculogenesis. Therapeutic strategies for stimulation of postnatal neovascularization]. *Herz* 2000;25:611-622.
30. Rumpold H, Wolf D, Koeck R, Gunsilius E. Endothelial progenitor cells: a source for therapeutic vasculogenesis? *J Cell Mol Med* 2004;8:509-518.
31. George AL, Bangalore-Prakash P, Rajoria S, Suriano R, Shanmugam A, Mittelman A, *et al.* Endothelial progenitor cell biology in disease and tissue regeneration. *Journal of hematology & oncology* 2011;4:24.
32. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, *et al.* Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:3422-3427.
33. Madeddu P. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for tissue regeneration. *Exp Physiol* 2005;90:315-326.
34. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 2004;95:343-353.
35. Gonzalez MA, Bernad A. Characteristics of adult stem cells. *Adv Exp Med Biol* 2012;741:103-120.
36. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood cells* 1978;4:7-25.
37. Stocum DL. Stem cells in regenerative biology and medicine. *Wound Repair Regen* 2001;9:429-442.
38. Young HE. Existence of reserve quiescent stem cells in adults, from amphibians to humans. *Current topics in microbiology and immunology* 2004;280:71-109.
39. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, *et al.* Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal

- vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999;85:221-228.
40. Asahara T, Kawamoto A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:C572-579.
 41. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 2002;109:337-346.
 42. Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Dernbach E, Zeiher AM, Dimmeler S. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation* 2003;108:2511-2516.
 43. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003;107:1164-1169.
 44. Fernandez Pujol B, Lucibello FC, Gehling UM, Lindemann K, Weidner N, Zuzarte ML, *et al.* Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes. *Differentiation; research in biological diversity* 2000;65:287-300.
 45. Romagnani P, Annunziato F, Liotta F, Lazzeri E, Mazzinghi B, Frosali F, *et al.* CD14+CD34^{low} cells with stem cell phenotypic and functional features are the major source of circulating endothelial progenitors. *Circ Res* 2005;97:314-322.
 46. Zhang SJ, Zhang H, Wei YJ, Su WJ, Liao ZK, Hou M, *et al.* Adult endothelial progenitor cells from human peripheral blood maintain monocyte/macrophage function throughout in vitro culture. *Cell Res* 2006;16:577-584.
 47. Rookmaaker MB, Vergeer M, van Zonneveld AJ, Rabelink TJ, Verhaar MC. Endothelial progenitor cells: mainly derived from the monocyte/macrophage-containing CD34⁻ mononuclear cell population and only in part from the hematopoietic stem cell-containing CD34⁺ mononuclear cell population. *Circulation* 2003;108:e150; author reply e150.
 48. Tamaki T, Akatsuka A, Ando K, Nakamura Y, Matsuzawa H, Hotta T, *et al.* Identification of myogenic-endothelial progenitor cells in the interstitial spaces of skeletal muscle. *J Cell Biol* 2002;157:571-577.
 49. Bompais H, Chagraoui J, Canron X, Crisan M, Liu XH, Anjo A, *et al.* Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood* 2004;103:2577-2584.
 50. Zhang R, Yang H, Li M, Yao Q, Chen C. Acceleration of endothelial-like cell differentiation from CD14⁺ monocytes in vitro. *Exp Hematol* 2005;33:1554-1563.
 51. Romagnani P, Lasagni L, Romagnani S. Peripheral blood as a source of stem cells for regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther* 2006;6:193-202.
 52. Segal MS, Bihorac A, Koc M. Circulating endothelial cells: tea leaves for renal disease. *American journal of physiology Renal physiology* 2002;283:F11-19.
 53. Ingram DA, Krier TR, Mead LE, McGuire C, Prater DN, Bhavsar J, *et al.* Clonogenic endothelial progenitor cells are sensitive to oxidative stress. *Stem cells* 2007;25:297-304.
 54. Witkowski S, Jenkins NT, Hagberg JM. Enhancing treatment for cardiovascular disease: exercise and circulating angiogenic cells. *Exercise and sport sciences reviews* 2011;39:93-101.

55. Kovacic JC, Moore J, Herbert A, Ma D, Boehm M, Graham RM. Endothelial progenitor cells, angioblasts, and angiogenesis--old terms reconsidered from a current perspective. *Trends Cardiovasc Med* 2008;18:45-51.
56. Kawamoto A, Losordo DW. Endothelial progenitor cells for cardiovascular regeneration. *Trends Cardiovasc Med* 2008;18:33-37.
57. Case J, Mead LE, Bessler WK, Prater D, White HA, Saadatzaheh MR, *et al.* Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Experimental hematology* 2007;35:1109-1118.
58. Kita K, Lee JO, Finnerty CC, Herndon DN. Cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells: current challenges in engraftment, infection, and ex vivo expansion. *Stem cells international* 2011;2011:276193.
59. Fan CL, Li Y, Gao PJ, Liu JJ, Zhang XJ, Zhu DL. Differentiation of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood CD 34+ cells in vitro. *Acta Pharmacol Sin* 2003;24:212-218.
60. Zhai QL, Qiu LG, Li Q, Meng HX, Han JL, Herzig RH, *et al.* Short-term ex vivo expansion sustains the homing-related properties of umbilical cord blood hematopoietic stem and progenitor cells. *Haematologica* 2004;89:265-273.
61. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1185-1189.
62. Jin F, Zhai Q, Qiu L, Meng H, Zou D, Wang Y, *et al.* Degradation of BM SDF-1 by MMP-9: the role in G-CSF-induced hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Bone Marrow Transplant* 2008;42:581-588.
63. Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension* 2005;45:321-325.
64. Fujiyama S, Amano K, Uehira K, Yoshida M, Nishiwaki Y, Nozawa Y, *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* 2003;93:980-989.
65. Liu L, Yu Q, Lin J, Lai X, Cao W, Du K, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1alpha is essential for hypoxia-induced mesenchymal stem cell mobilization into the peripheral blood. *Stem Cells Dev* 2011;20:1961-1971.
66. Zhu LL, Wu LY, Yew DT, Fan M. Effects of hypoxia on the proliferation and differentiation of NSCs. *Mol Neurobiol* 2005;31:231-242.
67. Sovalat H, Scrofani M, Eidenschenk A, Pasquet S, Rimelen V, Henon P. Identification and isolation from either adult human bone marrow or G-CSF-mobilized peripheral blood of CD34(+)/CD133(+)/CXCR4(+)/ Lin(-)CD45(-) cells, featuring morphological, molecular, and phenotypic characteristics of very small embryonic-like (VSEL) stem cells. *Exp Hematol* 2011;39:495-505.
68. Fadini GP, Avogaro A. Cell-based methods for ex vivo evaluation of human endothelial biology. *Cardiovasc Res* 2010;87:12-21.
69. Awad O, Dedkov EI, Jiao C, Bloomer S, Tomanek RJ, Schatteman GC. Differential healing activities of CD34+ and CD14+ endothelial cell progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:758-764.
70. Sen S, McDonald SP, Coates PT, Bonder CS. Endothelial progenitor cells: novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease. *Clinical science* 2011;120:263-283.

71. Steurer M, Kern J, Zitt M, Amberger A, Bauer M, Gastl G, *et al.* Quantification of circulating endothelial and progenitor cells: comparison of quantitative PCR and four-channel flow cytometry. *BMC research notes* 2008;1:71.
72. Asahara T, Kawamoto A, Masuda H. Concise review: Circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine. *Stem Cells* 2011;29:1650-1655.
73. Ingram DA, Caplice NM, Yoder MC. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood* 2005;106:1525-1531.
74. Fadini GP, Baesso I, Albiero M, Sartore S, Agostini C, Avogaro A. Technical notes on endothelial progenitor cells: ways to escape from the knowledge plateau. *Atherosclerosis* 2008;197:496-503.
75. Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, Chatterjee S, Shah V, Vile RG, *et al.* Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Circ Res* 2003;93:1023-1025.
76. Harraz M, Jiao C, Hanlon HD, Hartley RS, Schattman GC. CD34- blood-derived human endothelial cell progenitors. *Stem Cells* 2001;19:304-312.
77. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, *et al.* Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000;95:952-958.
78. Sato N, Sawada K, Koizumi K, Tarumi T, Ieko M, Yasukouchi T, *et al.* In vitro expansion of human peripheral blood CD34+ cells. *Blood* 1993;82:3600-3609.
79. Untergasser G, Koeck R, Wolf D, Rumpold H, Ott H, Debbage P, *et al.* CD34+/CD133- circulating endothelial precursor cells (CEP): characterization, senescence and in vivo application. *Exp Gerontol* 2006;41:600-608.
80. Yoon CH, Hur J, Park KW, Kim JH, Lee CS, Oh IY, *et al.* Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation* 2005;112:1618-1627.
81. Shantsila E, Watson T, Tse HF, Lip GY. New insights on endothelial progenitor cell subpopulations and their angiogenic properties. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:669-671.
82. Fadini GP, Losordo D, Dimmeler S. Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circ Res* 2012;110:624-637.
83. Marsboom G, Janssens S. Endothelial progenitor cells: new perspectives and applications in cardiovascular therapies. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2008;6:687-701.
84. He T, Lu T, d'Uscio LV, Lam CF, Lee HC, Katusic ZS. Angiogenic function of prostacyclin biosynthesis in human endothelial progenitor cells. *Circ Res* 2008;103:80-88.
85. Sieveking DP, Buckle A, Celermajer DS, Ng MK. Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: insights from a novel human angiogenesis assay. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:660-668.
86. Medina RJ, O'Neill CL, Sweeney M, Guduric-Fuchs J, Gardiner TA, Simpson DA, *et al.* Molecular analysis of endothelial progenitor cell (EPC) subtypes reveals two distinct cell populations with different identities. *BMC Med Genomics* 2010;3:18.

87. Moubarik C, Guillet B, Youssef B, Codaccioni JL, Piercecchi MD, Sabatier F, *et al.* Transplanted late outgrowth endothelial progenitor cells as cell therapy product for stroke. *Stem Cell Rev* 2011;7:208-220.
88. Grant DS, Kleinman HK, Leblond CP, Inoue S, Chung AE, Martin GR. The basement-membrane-like matrix of the mouse EHS tumor: II. Immunohistochemical quantitation of six of its components. *Am J Anat* 1985;174:387-398.
89. Hirase T, Node K. Endothelial dysfunction as a cellular mechanism for vascular failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012;302:H499-505.
90. Caiado F, Dias S. Endothelial progenitor cells and integrins: adhesive needs. *Fibrogenesis & tissue repair* 2012;5:4.
91. Verloop RE, Koolwijk P, van Zonneveld AJ, van Hinsbergh VW. Proteases and receptors in the recruitment of endothelial progenitor cells in neovascularization. *European cytokine network* 2009;20:207-219.
92. Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, *et al.* Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 2002;109:625-637.
93. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, *et al.* Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 2003;9:1370-1376.
94. Leone AM, Valgimigli M, Giannico MB, Zaccone V, Perfetti M, D'Amario D, *et al.* From bone marrow to the arterial wall: the ongoing tale of endothelial progenitor cells. *Eur Heart J* 2009;30:890-899.
95. Christopherson KW, 2nd, Uralil SE, Porecha NK, Zabriskie RC, Kidd SM, Ramin SM. G-CSF- and GM-CSF-induced upregulation of CD26 peptidase downregulates the functional chemotactic response of CD34+CD38- human cord blood hematopoietic cells. *Exp Hematol* 2006;34:1060-1068.
96. Wang CH, Verma S, Hsieh IC, Chen YJ, Kuo LT, Yang NI, *et al.* Enalapril increases ischemia-induced endothelial progenitor cell mobilization through manipulation of the CD26 system. *J Mol Cell Cardiol* 2006;41:34-43.
97. Selleri C, Montuori N, Ricci P, Visconte V, Baiano A, Carriero MV, *et al.* In vivo activity of the cleaved form of soluble urokinase receptor: a new hematopoietic stem/progenitor cell mobilizer. *Cancer Res* 2006;66:10885-10890.
98. Tjwa M, Sidenius N, Moura R, Jansen S, Theunissen K, Andolfo A, *et al.* Membrane-anchored uPAR regulates the proliferation, marrow pool size, engraftment, and mobilization of mouse hematopoietic stem/progenitor cells. *J Clin Invest* 2009;119:1008-1018.
99. Basire A, Sabatier F, Ravet S, Lamy E, Mialhe A, Zabouo G, *et al.* High urokinase expression contributes to the angiogenic properties of endothelial cells derived from circulating progenitors. *Thromb Haemost* 2006;95:678-688.
100. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Gordon R, Tepper O, Gravereaux E, *et al.* Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ Res* 2000;86:1198-1202.
101. Moore MA, Hattori K, Heissig B, Shieh JH, Dias S, Crystal RG, *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* 2001;938:36-45; discussion 45-37.

102. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, *et al.* Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 2007;131:324-336.
103. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, *et al.* Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 2004;118:149-161.
104. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002;110:673-687.
105. Watson AR, Pitchford SC, Reynolds LE, Direkze N, Brittan M, Alison MR, *et al.* Deficiency of bone marrow beta3-integrin enhances non-functional neovascularization. *J Pathol* 2010;220:435-445.
106. Amano K, Okigaki M, Adachi Y, Fujiyama S, Mori Y, Kosaki A, *et al.* Mechanism for IL-1 beta-mediated neovascularization unmasked by IL-1 beta knock-out mice. *J Mol Cell Cardiol* 2004;36:469-480.
107. Shen L, Gao Y, Qian J, Sun A, Ge J. A novel mechanism for endothelial progenitor cells homing: The SDF-1/CXCR4-Rac pathway may regulate endothelial progenitor cells homing through cellular polarization. *Medical hypotheses* 2011;76:256-258.
108. Hristov M, Zernecke A, Bidzhekov K, Liehn EA, Shagdarsuren E, Ludwig A, *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* 2007;100:590-597.
109. Vajkoczy P, Blum S, Lamparter M, Mailhammer R, Erber R, Engelhardt B, *et al.* Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis. *J Exp Med* 2003;197:1755-1765.
110. Foubert P, Silvestre JS, Souttou B, Barateau V, Martin C, Ebrahimian TG, *et al.* PSGL-1-mediated activation of EphB4 increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells. *J Clin Invest* 2007;117:1527-1537.
111. Lev EI, Estrov Z, Aboulfatova K, Harris D, Granada JF, Alviar C, *et al.* Potential role of activated platelets in homing of human endothelial progenitor cells to subendothelial matrix. *Thromb Haemost* 2006;96:498-504.
112. Massberg S, Konrad I, Schurzinger K, Lorenz M, Schneider S, Zohlnhoefer D, *et al.* Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *J Exp Med* 2006;203:1221-1233.
113. Stellos K, Langer H, Daub K, Schoenberger T, Gauss A, Geisler T, *et al.* Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human CD34+ cells to endothelial progenitor cells. *Circulation* 2008;117:206-215.
114. Stellos K, Gnerlich S, Kraemer B, Lindemann S, Gawaz M. Platelet interaction with progenitor cells: vascular regeneration or inquiry? *Pharmacol Rep* 2008;60:101-108.
115. Dernbach E, Randriamboavonjy V, Fleming I, Zeiher AM, Dimmeler S, Urbich C. Impaired interaction of platelets with endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk factors. *Basic Res Cardiol* 2008;103:572-581.
116. de Boer HC, Hovens MM, van Oeveren-Rietdijk AM, Snoep JD, de Koning EJ, Tamsma JT, *et al.* Human CD34+/KDR+ cells are generated from circulating CD34+ cells after immobilization on activated platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:408-415.

117. Abou-Saleh H, Yacoub D, Theoret JF, Gillis MA, Neagoe PE, Labarthe B, *et al.* Endothelial progenitor cells bind and inhibit platelet function and thrombus formation. *Circulation* 2009;120:2230-2239.
118. Leshem-Lev D, Omelchenko A, Perl L, Kornowski R, Battler A, Lev EI. Exposure to platelets promotes functional properties of endothelial progenitor cells. *J Thromb Thrombolysis* 2010;30:398-403.
119. Laubli H, Borsig L. Selectins promote tumor metastasis. *Seminars in cancer biology* 2010;20:169-177.
120. Kawabe J, Yuhki K, Okada M, Kanno T, Yamauchi A, Tashiro N, *et al.* Prostaglandin I₂ promotes recruitment of endothelial progenitor cells and limits vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:464-470.
121. Qin G, Ii M, Silver M, Wecker A, Bord E, Ma H, *et al.* Functional disruption of alpha4 integrin mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitors and augments ischemic neovascularization. *J Exp Med* 2006;203:153-163.
122. Angelos MG, Brown MA, Satterwhite LL, Levering VW, Shaked NT, Truskey GA. Dynamic adhesion of umbilical cord blood endothelial progenitor cells under laminar shear stress. *Biophysical journal* 2010;99:3545-3554.
123. Wary KK, Vogel SM, Garrean S, Zhao YD, Malik AB. Requirement of alpha(4)beta(1) and alpha(5)beta(1) integrin expression in bone-marrow-derived progenitor cells in preventing endotoxin-induced lung vascular injury and edema in mice. *Stem Cells* 2009;27:3112-3120.
124. Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, *et al.* Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation* 2002;105:3017-3024.
125. Smadja DM, Bieche I, Helley D, Laurendeau I, Simonin G, Muller L, *et al.* Increased VEGFR2 expression during human late endothelial progenitor cells expansion enhances in vitro angiogenesis with up-regulation of integrin alpha(6). *Journal of cellular and molecular medicine* 2007;11:1149-1161.
126. Bouvard C, Gafsou B, Dizier B, Galy-Fauroux I, Lokajczyk A, Boisson-Vidal C, *et al.* alpha6-integrin subunit plays a major role in the proangiogenic properties of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:1569-1575.
127. Kokubo T, Uchida H, Choi ET. Integrin alpha(v)beta(3) as a target in the prevention of neointimal hyperplasia. *J Vasc Surg* 2007;45 Suppl A:A33-38.
128. Di Santo S, Diehm N, Ortmann J, Volzmann J, Yang Z, Keo HH, *et al.* Oxidized low density lipoprotein impairs endothelial progenitor cell function by downregulation of E-selectin and integrin alpha(v)beta5. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;373:528-532.
129. Wu Y, Ip JE, Huang J, Zhang L, Matsushita K, Liew CC, *et al.* Essential role of ICAM-1/CD18 in mediating EPC recruitment, angiogenesis, and repair to the infarcted myocardium. *Circ Res* 2006;99:315-322.
130. Chavakis E, Aicher A, Heeschen C, Sasaki K, Kaiser R, El Makhfi N, *et al.* Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *J Exp Med* 2005;201:63-72.
131. Wijelath ES, Rahman S, Murray J, Patel Y, Savidge G, Sobel M. Fibronectin promotes VEGF-induced CD34 cell differentiation into endothelial cells. *Journal of*

- vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter* 2004;39:655-660.
132. Everaert BR, Van Craenenbroeck EM, Hoymans VY, Haine SE, Van Nassauw L, Conraads VM, *et al.* Current perspective of pathophysiological and interventional effects on endothelial progenitor cell biology: focus on PI3K/AKT/eNOS pathway. *Int J Cardiol* 2010;144:350-366.
 133. Hanjaya-Putra D, Yee J, Ceci D, Truitt R, Yee D, Gerecht S. Vascular endothelial growth factor and substrate mechanics regulate in vitro tubulogenesis of endothelial progenitor cells. *J Cell Mol Med* 2010;14:2436-2447.
 134. Smadja DM, Bieche I, Uzan G, Bompais H, Muller L, Boisson-Vidal C, *et al.* PAR-1 activation on human late endothelial progenitor cells enhances angiogenesis in vitro with upregulation of the SDF-1/CXCR4 system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2321-2327.
 135. Hiesinger W, Frederick JR, Atluri P, McCormick RC, Marotta N, Muenzer JR, *et al.* Spliced stromal cell-derived factor-1alpha analog stimulates endothelial progenitor cell migration and improves cardiac function in a dose-dependent manner after myocardial infarction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010;140:1174-1180.
 136. Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Sasaki K, Bruhl T, Farhadi MR, *et al.* Cathepsin L is required for endothelial progenitor cell-induced neovascularization. *Nat Med* 2005;11:206-213.
 137. Urbich C, Dernbach E, Rossig L, Zeiher AM, Dimmeler S. High glucose reduces cathepsin L activity and impairs invasion of circulating progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol* 2008;45:429-436.
 138. Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood* 2005;106:1901-1910.
 139. Wang L, Zhang ZG, Zhang RL, Gregg SR, Hozeska-Solgot A, LeTourneau Y, *et al.* Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 secreted by erythropoietin-activated endothelial cells promote neural progenitor cell migration. *J Neurosci* 2006;26:5996-6003.
 140. Hildbrand P, Cirulli V, Prinsen RC, Smith KA, Torbett BE, Salomon DR, *et al.* The role of angiopoietins in the development of endothelial cells from cord blood CD34+ progenitors. *Blood* 2004;104:2010-2019.
 141. Frederick JR, Fitzpatrick JR, 3rd, McCormick RC, Harris DA, Kim AY, Muenzer JR, *et al.* Stromal cell-derived factor-1alpha activation of tissue-engineered endothelial progenitor cell matrix enhances ventricular function after myocardial infarction by inducing neovascularogenesis. *Circulation* 2010;122:S107-117.
 142. Schmeisser A, Garlich CD, Zhang H, Eskafi S, Graffy C, Ludwig J, *et al.* Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovasc Res* 2001;49:671-680.
 143. Janowska-Wieczorek A, Marquez LA, Dobrowsky A, Ratajczak MZ, Cabuhat ML. Differential MMP and TIMP production by human marrow and peripheral blood CD34(+) cells in response to chemokines. *Exp Hematol* 2000;28:1274-1285.
 144. Mendelson K, Swendeman S, Saftig P, Blobel CP. Stimulation of platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFRbeta) activates ADAM17 and promotes

- metalloproteinase-dependent cross-talk between the PDGFRbeta and epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathways. *J Biol Chem* 2010;285:25024-25032.
145. Miyata T, Iizasa H, Sai Y, Fujii J, Terasaki T, Nakashima E. Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) induces differentiation of bone marrow endothelial progenitor cell-derived cell line TR-BME2 into mural cells, and changes the phenotype. *J Cell Physiol* 2005;204:948-955.
 146. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 2008;16:585-601.
 147. Urbich C, Aicher A, Heeschen C, Dernbach E, Hofmann WK, Zeiher AM, *et al.* Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2005;39:733-742.
 148. Suh W, Kim KL, Kim JM, Shin IS, Lee YS, Lee JY, *et al.* Transplantation of endothelial progenitor cells accelerates dermal wound healing with increased recruitment of monocytes/macrophages and neovascularization. *Stem Cells* 2005;23:1571-1578.
 149. Rossig L, Urbich C, Bruhl T, Dernbach E, Heeschen C, Chavakis E, *et al.* Histone deacetylase activity is essential for the expression of HoxA9 and for endothelial commitment of progenitor cells. *J Exp Med* 2005;201:1825-1835.
 150. Guo Y, Chan R, Ramsey H, Li W, Xie X, Shelley WC, *et al.* The homeoprotein Hex is required for hemangioblast differentiation. *Blood* 2003;102:2428-2435.
 151. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, *et al.* Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 2003;102:1340-1346.
 152. Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, *et al.* Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation* 2003;107:3059-3065.
 153. Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, Landry AL, Hertel B, Duckert T, *et al.* Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood* 2004;103:921-926.
 154. Imanishi T, Kobayashi K, Hano T, Nishio I. Effect of estrogen on differentiation and senescence in endothelial progenitor cells derived from bone marrow in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 2005;28:763-772.
 155. Imanishi T, Hano T, Nishio I. Estrogen reduces angiotensin II-induced acceleration of senescence in endothelial progenitor cells. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 2005;28:263-271.
 156. Iwakura A, Luedemann C, Shastry S, Hanley A, Kearney M, Aikawa R, *et al.* Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury. *Circulation* 2003;108:3115-3121.
 157. Iwakura A, Shastry S, Luedemann C, Hamada H, Kawamoto A, Kishore R, *et al.* Estradiol enhances recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-mediated activation of matrix metalloproteinase-9. *Circulation* 2006;113:1605-1614.

158. Lonnqvist F, Arner P, Nordfors L, Schalling M. Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects. *Nat Med* 1995;1:950-953.
159. Wolk R, Deb A, Caplice NM, Somers VK. Leptin receptor and functional effects of leptin in human endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis* 2005;183:131-139.
160. Verma S, Kuliszewski MA, Li SH, Szmitko PE, Zucco L, Wang CH, *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* 2004;109:2058-2067.
161. Nan JL, Li JJ, He JG. C-reactive protein decreases interleukin-8 production in human endothelial progenitor cells by inhibition of p38 MAPK pathway. *Chin Med J (Engl)* 2009;122:1922-1928.
162. Chen TG, Zhong ZY, Sun GF, Zhou YX, Zhao Y. Effects of tumour necrosis factor-alpha on activity and nitric oxide synthase of endothelial progenitor cells from peripheral blood. *Cell proliferation* 2011;44:352-359.
163. Zhang Y, Herbert BS, Rajashekhar G, Ingram DA, Yoder MC, Clauss M, *et al.* Premature senescence of highly proliferative endothelial progenitor cells is induced by tumor necrosis factor-alpha via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *FASEB J* 2009;23:1358-1365.
164. Xu S, Zhao Y, Yu L, Shen X, Ding F, Fu G. Rosiglitazone attenuates endothelial progenitor cell apoptosis induced by TNF-alpha via ERK/MAPK and NF-kappaB signal pathways. *Journal of pharmacological sciences* 2011;117:265-274.
165. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, *et al.* Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 2001;103:2885-2890.
166. Pirro M, Schillaci G, Romagno PF, Mannarino MR, Bagaglia F, Razzi R, *et al.* Influence of short-term rosuvastatin therapy on endothelial progenitor cells and endothelial function. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics* 2009;14:14-21.
167. Landmesser U, Engberding N, Bahlmann FH, Schaefer A, Wiencke A, Heineke A, *et al.* Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2004;110:1933-1939.
168. Dzau VJ, Gnechi M, Pachori AS, Morello F, Melo LG. Therapeutic potential of endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases. *Hypertension* 2005;46:7-18.
169. Wojakowski W, Landmesser U, Bachowski R, Jadczyk T, Tendera M. Mobilization of stem and progenitor cells in cardiovascular diseases. *Leukemia* 2012;26:23-33.
170. Spyridopoulos I, Haendeler J, Urbich C, Brummendorf TH, Oh H, Schneider MD, *et al.* Statins enhance migratory capacity by upregulation of the telomere repeat-binding factor TRF2 in endothelial progenitor cells. *Circulation* 2004;110:3136-3142.
171. Urbich C, Dimmeler S. Risk factors for coronary artery disease, circulating endothelial progenitor cells, and the role of HMG-CoA reductase inhibitors. *Kidney international* 2005;67:1672-1676.

172. Butzal M, Loges S, Schweizer M, Fischer U, Gehling UM, Hossfeld DK, *et al.* Rapamycin inhibits proliferation and differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Exp Cell Res* 2004;300:65-71.
173. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, *et al.* Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005;353:999-1007.
174. Bahlmann FH, de Groot K, Mueller O, Hertel B, Haller H, Fliser D. Stimulation of endothelial progenitor cells: a new putative therapeutic effect of angiotensin II receptor antagonists. *Hypertension* 2005;45:526-529.
175. Chang EI, Chang EI, Thangarajah H, Hamou C, Gurtner GC. Hypoxia, hormones, and endothelial progenitor cells in hemangioma. *Lymphatic research and biology* 2007;5:237-243.
176. Kopp HG, Ramos CA, Rafii S. Contribution of endothelial progenitors and proangiogenic hematopoietic cells to vascularization of tumor and ischemic tissue. *Curr Opin Hematol* 2006;13:175-181.
177. Li Calzi S, Neu MB, Shaw LC, Kielczewski JL, Moldovan NI, Grant MB. EPCs and pathological angiogenesis: when good cells go bad. *Microvasc Res* 2010;79:207-216.
178. Jiang M, Wang B, Wang C, He B, Fan H, Guo TB, *et al.* Inhibition of hypoxia-inducible factor-1alpha and endothelial progenitor cell differentiation by adenoviral transfer of small interfering RNA in vitro. *J Vasc Res* 2006;43:511-521.
179. Foresta C, De Toni L, Ferlin A, Di Mambro A. Clinical implication of endothelial progenitor cells. *Expert review of molecular diagnostics* 2010;10:89-105.
180. Giannotti G, Doerries C, Mocharla PS, Mueller MF, Bahlmann FH, Horvath T, *et al.* Impaired endothelial repair capacity of early endothelial progenitor cells in prehypertension: relation to endothelial dysfunction. *Hypertension* 2010;55:1389-1397.
181. Loomans CJ, de Koning EJ, Staal FJ, Rookmaaker MB, Verseyden C, de Boer HC, *et al.* Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes* 2004;53:195-199.
182. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, *et al.* Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* 2002;106:2781-2786.
183. Cubbon RM, Kahn MB, Wheatcroft SB. Effects of insulin resistance on endothelial progenitor cells and vascular repair. *Clin Sci (Lond)* 2009;117:173-190.
184. Petrelli A, Di Fenza R, Carvello M, Gatti F, Secchi A, Fiorina P. Strategies to reverse endothelial progenitor cell dysfunction in diabetes. *Experimental diabetes research* 2012;2012:471823.
185. Oikawa A, Siragusa M, Quaini F, Mangialardi G, Katare RG, Caporali A, *et al.* Diabetes mellitus induces bone marrow microangiopathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:498-508.
186. Chen YH, Lin SJ, Lin FY, Wu TC, Tsao CR, Huang PH, *et al.* High glucose impairs early and late endothelial progenitor cells by modifying nitric oxide-related but not oxidative stress-mediated mechanisms. *Diabetes* 2007;56:1559-1568.

187. Hamed S, Brenner B, Roguin A. Nitric oxide: a key factor behind the dysfunctionality of endothelial progenitor cells in diabetes mellitus type-2. *Cardiovasc Res* 2011;91:9-15.
188. Segal MS, Shah R, Afzal A, Perrault CM, Chang K, Schuler A, *et al.* Nitric oxide cytoskeletal-induced alterations reverse the endothelial progenitor cell migratory defect associated with diabetes. *Diabetes* 2006;55:102-109.
189. Rosso A, Balsamo A, Gambino R, Dentelli P, Falcioni R, Cassader M, *et al.* p53 Mediates the accelerated onset of senescence of endothelial progenitor cells in diabetes. *J Biol Chem* 2006;281:4339-4347.
190. Kim KA, Shin YJ, Kim JH, Lee H, Noh SY, Jang SH, *et al.* Dysfunction of endothelial progenitor cells under diabetic conditions and its underlying mechanisms. *Archives of pharmacal research* 2012;35:223-234.
191. Loomans CJ, van Haperen R, Duijs JM, Verseyden C, de Crom R, Leenen PJ, *et al.* Differentiation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells is shifted into a proinflammatory phenotype by hyperglycemia. *Mol Med* 2009;15:152-159.
192. Endtmann C, Ebrahimian T, Czech T, Arfa O, Laufs U, Fritz M, *et al.* Angiotensin II impairs endothelial progenitor cell number and function in vitro and in vivo: implications for vascular regeneration. *Hypertension* 2011;58:394-403.
193. van Zonneveld AJ, Rabelink TJ. Endothelial progenitor cells: biology and therapeutic potential in hypertension. *Current opinion in nephrology and hypertension* 2006;15:167-172.
194. Di Stefano R, Barsotti MC, Felice F, Vlachopoulos C, Balbarini A. Endothelial progenitor cells in prehypertension. *Curr Pharm Des* 2011;17:3002-3019.
195. Fadini GP, Avogaro A, Ferraccioli G, Agostini C. Endothelial progenitors in pulmonary hypertension: new pathophysiology and therapeutic implications. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2010;35:418-425.
196. Watson T, Goon PK, Lip GY. Endothelial progenitor cells, endothelial dysfunction, inflammation, and oxidative stress in hypertension. *Antioxidants & redox signaling* 2008;10:1079-1088.
197. Demarco VG, Whaley-Connell AT, Sowers JR, Habibi J, Dellsperger KC. Contribution of oxidative stress to pulmonary arterial hypertension. *World journal of cardiology* 2010;2:316-324.
198. Cacciatore F, Bruzzese G, Vitale DF, Liguori A, de Nigris F, Fiorito C, *et al.* Effects of ACE inhibition on circulating endothelial progenitor cells, vascular damage, and oxidative stress in hypertensive patients. *European journal of clinical pharmacology* 2011;67:877-883.
199. Asosingh K, Aldred MA, VasANJI A, Drazba J, Sharp J, Farver C, *et al.* Circulating angiogenic precursors in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Pathol* 2008;172:615-627.
200. Wang X, Chen J, Tao Q, Zhu J, Shang Y. Effects of ox-LDL on number and activity of circulating endothelial progenitor cells. *Drug and chemical toxicology* 2004;27:243-255.
201. Chen JZ, Zhang FR, Tao QM, Wang XX, Zhu JH, Zhu JH. Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)* 2004;107:273-280.

202. Imanishi T, Hano T, Matsuo Y, Nishio I. Oxidized low-density lipoprotein inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial progenitor cell differentiation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003;30:665-670.
203. Imanishi T, Hano T, Sawamura T, Nishio I. Oxidized low-density lipoprotein induces endothelial progenitor cell senescence, leading to cellular dysfunction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004;31:407-413.
204. Haddad P, Dussault S, Groleau J, Turgeon J, Maingrette F, Rivard A. Nox2-derived reactive oxygen species contribute to hypercholesterolemia-induced inhibition of neovascularization: effects on endothelial progenitor cells and mature endothelial cells. *Atherosclerosis* 2011;217:340-349.
205. Ma FX, Zhou B, Chen Z, Ren Q, Lu SH, Sawamura T, *et al.* Oxidized low density lipoprotein impairs endothelial progenitor cells by regulation of endothelial nitric oxide synthase. *J Lipid Res* 2006;47:1227-1237.
206. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, *et al.* HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest* 2001;108:391-397.
207. Noor R, Shuaib U, Wang CX, Todd K, Ghani U, Schwindt B, *et al.* High-density lipoprotein cholesterol regulates endothelial progenitor cells by increasing eNOS and preventing apoptosis. *Atherosclerosis* 2007;192:92-99.
208. Di Stefano R, Barsotti MC, Felice F, Magera A, Lekakis J, Leone A, *et al.* Smoking and endothelial progenitor cells: a revision of literature. *Curr Pharm Des* 2010;16:2559-2566.
209. Ludwig A, Jochmann N, Kertesz A, Kuhn C, Mueller S, Gericke C, *et al.* Smoking decreases the level of circulating CD34+ progenitor cells in young healthy women--a pilot study. *BMC women's health* 2010;10:20.
210. Michaud SE, Dussault S, Haddad P, Groleau J, Rivard A. Circulating endothelial progenitor cells from healthy smokers exhibit impaired functional activities. *Atherosclerosis* 2006;187:423-432.
211. Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, Numaguchi Y, Kobayashi K, Iino S, *et al.* Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1442-1447.
212. Cardinale A, Nastrucci C, Cesario A, Russo P. Nicotine: specific role in angiogenesis, proliferation and apoptosis. *Critical reviews in toxicology* 2012;42:68-89.
213. Mayhan WG, Sharpe GM. Effect of cigarette smoke extract on arteriolar dilatation in vivo. *J Appl Physiol* 1996;81:1996-2003.
214. Mandraffino G, Sardo MA, Riggio S, D'Ascola A, Loddo S, Alibrandi A, *et al.* Smoke exposure and circulating progenitor cells: evidence for modulation of antioxidant enzymes and cell count. *Clinical biochemistry* 2010;43:1436-1442.
215. Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC, Wesseling G, Wouters EF. Systemic effects of smoking. *Chest* 2007;131:1557-1566.
216. Neunteufl T, Heher S, Kostner K, Mitulovic G, Lehr S, Khoschsorur G, *et al.* Contribution of nicotine to acute endothelial dysfunction in long-term smokers. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:251-256.

217. Puls M, Schroeter MR, Steier J, Stijohann L, Hasenfuss G, Konstantinides S, *et al.* Effect of smoking cessation on the number and adhesive properties of early outgrowth endothelial progenitor cells. *Int J Cardiol* 2011;152:61-69.
218. Lenk K, Uhlemann M, Schuler G, Adams V. Role of endothelial progenitor cells in the beneficial effects of physical exercise on atherosclerosis and coronary artery disease. *J Appl Physiol* 2011;111:321-328.
219. Moebius-Winkler S, Schuler G, Adams V. Endothelial progenitor cells and exercise-induced redox regulation. *Antioxidants & redox signaling* 2011;15:997-1011.
220. MacEaney OJ, Kushner EJ, Van Guilder GP, Greiner JJ, Stauffer BL, DeSouza CA. Endothelial progenitor cell number and colony-forming capacity in overweight and obese adults. *Int J Obes (Lond)* 2009;33:219-225.
221. Wang Y, Hu G. Individual and joint associations of obesity and physical activity on the risk of heart failure. *Congestive heart failure* 2010;16:292-299.
222. Tobler K, Freudenthaler A, Baumgartner-Parzer SM, Wolzt M, Ludvik B, Nansalmaa E, *et al.* Reduction of both number and proliferative activity of human endothelial progenitor cells in obesity. *Int J Obes (Lond)* 2010;34:687-700.
223. Hoetzer GL, Van Guilder GP, Irmiger HM, Keith RS, Stauffer BL, DeSouza CA. Aging, exercise, and endothelial progenitor cell clonogenic and migratory capacity in men. *J Appl Physiol* 2007;102:847-852.
224. Van Craenenbroeck EM, Conraads VM. Endothelial progenitor cells in vascular health: focus on lifestyle. *Microvasc Res* 2010;79:184-192.
225. Silva JF, Rocha NG, Nobrega AC. Mobilization of endothelial progenitor cells with exercise in healthy individuals: a systematic review. *Arquivos brasileiros de cardiologia* 2012;98:182-191.
226. Tao J, Wang Y, Yang Z, Tu C, Xu MG, Wang JM. Circulating endothelial progenitor cell deficiency contributes to impaired arterial elasticity in persons of advancing age. *J Hum Hypertens* 2006;20:490-495.
227. Heiss C, Keymel S, Niesler U, Ziemann J, Kelm M, Kalka C. Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1441-1448.
228. Rivard A, Berthou-Soulie L, Principe N, Kearney M, Curry C, Branellec D, *et al.* Age-dependent defect in vascular endothelial growth factor expression is associated with reduced hypoxia-inducible factor 1 activity. *J Biol Chem* 2000;275:29643-29647.
229. Cooke JP, Losordo DW. Nitric oxide and angiogenesis. *Circulation* 2002;105:2133-2135.
230. Hoffmann J, Haendeler J, Aicher A, Rossig L, Vasa M, Zeiher AM, *et al.* Aging enhances the sensitivity of endothelial cells toward apoptotic stimuli: important role of nitric oxide. *Circ Res* 2001;89:709-715.
231. Qi Y, Qian L, Sun B, Liu L, Wu P, Sun L. Inhaled NO Contributes to Lung Repair in Piglets with Acute Respiratory Distress Syndrome via Increasing Circulating Endothelial Progenitor Cells. *PLoS One* 2012;7:e33859.
232. Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont PJ, Davis BH, Wang T, Gregg D, Ramaswami P, *et al.* Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. *Circulation* 2003;108:457-463.

233. Mikirova NA, Jackson JA, Hunninghake R, Kenyon J, Chan KW, Swindlehurst CA, *et al.* Circulating endothelial progenitor cells: a new approach to anti-aging medicine? *J Transl Med* 2009;7:106.
234. Fleissner F, Thum T. Critical role of the nitric oxide/reactive oxygen species balance in endothelial progenitor dysfunction. *Antioxidants & redox signaling* 2011;15:933-948.
235. Ushio-Fukai M, Urao N. Novel role of NADPH oxidase in angiogenesis and stem/progenitor cell function. *Antioxidants & redox signaling* 2009;11:2517-2533.
236. Thum T, Fraccarollo D, Schultheiss M, Froese S, Galuppo P, Widder JD, *et al.* Endothelial nitric oxide synthase uncoupling impairs endothelial progenitor cell mobilization and function in diabetes. *Diabetes* 2007;56:666-674.
237. Ueda S, Masutani H, Nakamura H, Tanaka T, Ueno M, Yodoi J. Redox control of cell death. *Antioxidants & redox signaling* 2002;4:405-414.
238. Tie G, Yan J, Yang Y, Park BD, Messina JA, Raffai RL, *et al.* Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis in endothelial progenitor cells by inactivating the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *J Vasc Res* 2010;47:519-530.
239. Curatola AM, Xu J, Hendricks-Munoz KD. Cyclic GMP protects endothelial progenitors from oxidative stress. *Angiogenesis* 2011;14:267-279.
240. Wang XR, Zhang MW, Chen DD, Zhang Y, Chen AF. AMP-activated protein kinase rescues the angiogenic functions of endothelial progenitor cells via manganese superoxide dismutase induction in type 1 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;300:E1135-1145.
241. Jia F, Wu C, Chen Z, Lu G. AMP-activated protein kinase inhibits homocysteine-induced dysfunction and apoptosis in endothelial progenitor cells. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* 2011;25:21-29.
242. George J, Goldstein E, Abashidze S, Deutsch V, Shmilovich H, Finkelstein A, *et al.* Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina: association with systemic inflammation. *Eur Heart J* 2004;25:1003-1008.
243. Apple FS, Falahati A, Paulsen PR, Miller EA, Sharkey SW. Improved detection of minor ischemic myocardial injury with measurement of serum cardiac troponin I. *Clin Chem* 1997;43:2047-2051.
244. de Lemos JA, McGuire DK, Drazner MH. B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease. *Lancet* 2003;362:316-322.
245. Heeschen C, Hamm CW, Mitrovic V, Lantelme NH, White HD, Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management I. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide levels for dynamic risk stratification of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2004;110:3206-3212.
246. Surdacki A, Marewicz E, Rakowski T, Szumanska M, Szastak G, Pryjma J, *et al.* Coincidence of moderately elevated N-terminal pro-B-type natriuretic peptide, endothelial progenitor cells deficiency and propensity to exercise-induced myocardial ischemia in stable angina. *Disease markers* 2010;28:101-114.
247. Chen JZ, Zhu JH, Wang XX, Zhu JH, Xie XD, Sun J, *et al.* Effects of homocysteine on number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood. *J Mol Cell Cardiol* 2004;36:233-239.

248. Chen J, Jin J, Song M, Dong H, Zhao G, Huang L. C-reactive protein down-regulates endothelial nitric oxide synthase expression and promotes apoptosis in endothelial progenitor cells through receptor for advanced glycation end-products. *Gene* 2012;496:128-135.
249. Suh W, Kim KL, Choi JH, Lee YS, Lee JY, Kim JM, *et al.* C-reactive protein impairs angiogenic functions and decreases the secretion of arteriogenic chemokines in human endothelial progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;321:65-71.
250. Venugopal SK, Devaraj S, Jialal I. Effect of C-reactive protein on vascular cells: evidence for a proinflammatory, proatherogenic role. *Current opinion in nephrology and hypertension* 2005;14:33-37.
251. Devaraj S, Singh U, Jialal I. The evolving role of C-reactive protein in atherothrombosis. *Clin Chem* 2009;55:229-238.
252. Michowitz Y, Goldstein E, Wexler D, Sheps D, Keren G, George J. Circulating endothelial progenitor cells and clinical outcome in patients with congestive heart failure. *Heart* 2007;93:1046-1050.
253. Huang C, Zhang L, Wang Z, Pan H, Zhu J. Endothelial progenitor cells are associated with plasma homocysteine in coronary artery disease. *Acta cardiologica* 2011;66:773-777.
254. Alam MM, Mohammad AA, Shuaib U, Wang C, Ghani U, Schwindt B, *et al.* Homocysteine reduces endothelial progenitor cells in stroke patients through apoptosis. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009;29:157-165.
255. Li L, Hu BC, Gong SJ, Yan J. Homocysteine-induced caspase-3 activation by endoplasmic reticulum stress in endothelial progenitor cells from patients with coronary heart disease and healthy donors. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2011;75:1300-1305.
256. Zhu JH, Chen JZ, Wang XX, Xie XD, Sun J, Zhang FR. Homocysteine accelerates senescence and reduces proliferation of endothelial progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol* 2006;40:648-652.
257. Yang Z, von Ballmoos MW, Faessler D, Voelzmann J, Ortmann J, Diehm N, *et al.* Paracrine factors secreted by endothelial progenitor cells prevent oxidative stress-induced apoptosis of mature endothelial cells. *Atherosclerosis* 2010;211:103-109.
258. Liu P, Zhou B, Gu D, Zhang L, Han Z. Endothelial progenitor cell therapy in atherosclerosis: a double-edged sword? *Ageing research reviews* 2009;8:83-93.
259. Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, *et al.* Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascuogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:288-293.
260. Kirton JP, Xu Q. Endothelial precursors in vascular repair. *Microvasc Res* 2010;79:193-199.
261. Watt SM, Athanassopoulos A, Harris AL, Tsaknakis G. Human endothelial stem/progenitor cells, angiogenic factors and vascular repair. *J R Soc Interface* 2010;7 Suppl 6:S731-751.
262. Zampetaki A, Kirton JP, Xu Q. Vascular repair by endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res* 2008;78:413-421.

263. Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Bohm M, *et al.* Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ Res* 2003;93:e17-24.
264. Kong D, Melo LG, Gnecci M, Zhang L, Mostoslavsky G, Liew CC, *et al.* Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries. *Circulation* 2004;110:2039-2046.
265. Hu Y, Davison F, Zhang Z, Xu Q. Endothelial replacement and angiogenesis in arteriosclerotic lesions of allografts are contributed by circulating progenitor cells. *Circulation* 2003;108:3122-3127.
266. Griese DP, Ehsan A, Melo LG, Kong D, Zhang L, Mann MJ, *et al.* Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy. *Circulation* 2003;108:2710-2715.
267. Lim WH, Seo WW, Choe W, Kang CK, Park J, Cho HJ, *et al.* Stent coated with antibody against vascular endothelial-cadherin captures endothelial progenitor cells, accelerates re-endothelialization, and reduces neointimal formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:2798-2805.
268. Larsen K, Cheng C, Tempel D, Parker S, Yazdani S, den Dekker WK, *et al.* Capture of circulatory endothelial progenitor cells and accelerated re-endothelialization of a bio-engineered stent in human ex vivo shunt and rabbit denudation model. *Eur Heart J* 2012;33:120-128.
269. Asahara T. Cell therapy and gene therapy using endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *Handbook of experimental pharmacology* 2007:181-194.
270. Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, *et al.* Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 2000;105:1527-1536.
271. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, *et al.* Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001;103:634-637.
272. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, *et al.* Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001;7:430-436.
273. Dong F, Ha XQ. Effect of endothelial progenitor cells in neovascularization and their application in tumor therapy. *Chin Med J (Engl)* 2010;123:2454-2460.
274. Aguirre A, Planell JA, Engel E. Dynamics of bone marrow-derived endothelial progenitor cell/mesenchymal stem cell interaction in co-culture and its implications in angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;400:284-291.
275. Patel VB, Robbins MA, Topol EJ. C-reactive protein: a 'golden marker' for inflammation and coronary artery disease. *Cleve Clin J Med* 2001;68:521-524, 527-534.
276. Andre P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK, Phillips DR. Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease. *Circulation* 2002;106:896-899.
277. Antoniadou C, Bakogiannis C, Tousoulis D, Antonopoulos AS, Stefanadis C. The CD40/CD40 ligand system: linking inflammation with atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:669-677.

278. Chakrabarti S, Blair P, Freedman JE. CD40-40L signaling in vascular inflammation. *J Biol Chem* 2007;282:18307-18317.
279. Chakrabarti S, Rizvi M, Morin K, Garg R, Freedman JE. The role of CD40L and VEGF in the modulation of angiogenesis and inflammation. *Vascul Pharmacol* 2010;53:130-137.
280. Chakrabarti S, Rizvi M, Pathak D, Kirber MT, Freedman JE. Hypoxia influences CD40-CD40L mediated inflammation in endothelial and monocytic cells. *Immunol Lett* 2009;122:170-184.
281. Cipollone F, Chiarelli F, Davi G, Ferri C, Desideri G, Fazia M, *et al.* Enhanced soluble CD40 ligand contributes to endothelial cell dysfunction in vitro and monocyte activation in patients with diabetes mellitus: effect of improved metabolic control. *Diabetologia* 2005;48:1216-1224.
282. Ferroni P, Santilli F, Guadagni F, Basili S, Davi G. Contribution of platelet-derived CD40 ligand to inflammation, thrombosis and neoangiogenesis. *Curr Med Chem* 2007;14:2170-2180.
283. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, *et al.* CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998;391:591-594.
284. Lievens D, Eijgelaar WJ, Biessen EA, Daemen MJ, Lutgens E. The multi-functionality of CD40L and its receptor CD40 in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2009;102:206-214.
285. Santilli F, Basili S, Ferroni P, Davi G. CD40/CD40L system and vascular disease. *Intern Emerg Med* 2007;2:256-268.
286. Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 2009;78:539-552.
287. Tousoulis D, Andreou I, Antoniadis C, Tentolouris C, Stefanadis C. Role of inflammation and oxidative stress in endothelial progenitor cell function and mobilization: therapeutic implications for cardiovascular diseases. *Atherosclerosis* 2008;201:236-247.
288. Marumo T, Uchimura H, Hayashi M, Hishikawa K, Fujita T. Aldosterone impairs bone marrow-derived progenitor cell formation. *Hypertension* 2006;48:490-496.
289. Cui B, Huang L, Fang Y, Guo R, Yin Y, Zhao X. Transplantation of endothelial progenitor cells overexpressing endothelial nitric oxide synthase enhances inhibition of neointimal hyperplasia and restores endothelium-dependent vasodilatation. *Microvascular research* 2011;81:143-150.
290. Modarai B, Burnand KG, Sawyer B, Smith A. Endothelial progenitor cells are recruited into resolving venous thrombi. *Circulation* 2005;111:2645-2653.
291. Meng QY, Li XQ, Yu XB, Lei FR, Jiang K, Li CY. Transplantation of VEGF165-gene-transfected endothelial progenitor cells in the treatment of chronic venous thrombosis in rats. *Chin Med J (Engl)* 2010;123:471-477.
292. Lacroix R, Sabatier F, Mialhe A, Basire A, Pannell R, Borghi H, *et al.* Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. *Blood* 2007;110:2432-2439.
293. Jantzen AE, Lane WO, Gage SM, Jamiolkowski RM, Haseltine JM, Galinat LJ, *et al.* Use of autologous blood-derived endothelial progenitor cells at point-of-care to

- protect against implant thrombosis in a large animal model. *Biomaterials* 2011;32:8356-8363.
294. Yazdani SK, Kolodgie FD, Virmani R. Ex vivo and preclinical assessment of an endothelial progenitor cell capturing bioengineered stent. *Minerva cardioangiologica* 2012;60:11-22.
295. Kawabe-Yako R, Masaaki I, Masuo O, Asahara T, Itakura T. Cilostazol activates function of bone marrow-derived endothelial progenitor cell for re-endothelialization in a carotid balloon injury model. *PLoS One* 2011;6:e24646.
296. Shi HJ, Cao AH, Teng GJ. Seeding endothelial progenitor cells on a self-expanding metal stent: an in vitro study. *Journal of vascular and interventional radiology : JVIR* 2010;21:1061-1065.
297. Blindt R, Vogt F, Astafieva I, Fach C, Hristov M, Krott N, *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* 2006;47:1786-1795.
298. Klomp M, Beijk MA, Tijssen JG, de Winter RJ. One-year clinical outcome in an unselected patient population treated with the Genous endothelial progenitor cell capturing stent. *Catheter Cardiovasc Interv* 2011;77:809-817.
299. Silva EA, Kim ES, Kong HJ, Mooney DJ. Material-based deployment enhances efficacy of endothelial progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:14347-14352.
300. Wendel HP, Avci-Adali M, Ziemer G. Endothelial progenitor cell capture stents--hype or hope? *Int J Cardiol* 2010;145:115-117; author reply 117-118.
301. Inoue T, Taguchi I, Abe S, Toyoda S, Nakajima K, Sakuma M, *et al.* Activation of matrix metalloproteinase-9 is associated with mobilization of bone marrow-derived cells after coronary stent implantation. *Int J Cardiol* 2011;152:332-336.
302. Zhao FH, Chen YD, Jin ZN, Lu SZ. Are impaired endothelial progenitor cells involved in the processes of late in-stent thrombosis and re-endothelialization of drug-eluting stents? *Med Hypotheses* 2008;70:512-514.
303. Inoue T, Croce K, Morooka T, Sakuma M, Node K, Simon DI. Vascular inflammation and repair: implications for re-endothelialization, restenosis, and stent thrombosis. *JACC Cardiovascular interventions* 2011;4:1057-1066.
304. Pelliccia F, Cianfrocca C, Rosano G, Mercuro G, Speciale G, Pasceri V. Role of endothelial progenitor cells in restenosis and progression of coronary atherosclerosis after percutaneous coronary intervention: a prospective study. *JACC Cardiovascular interventions* 2010;3:78-86.
305. Hagensen MK, Shim J, Thim T, Falk E, Bentzon JF. Circulating endothelial progenitor cells do not contribute to plaque endothelium in murine atherosclerosis. *Circulation* 2010;121:898-905.
306. Silvestre JS, Gojova A, Brun V, Potteaux S, Esposito B, Duriez M, *et al.* Transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells in ischemic apolipoprotein E-knockout mice accelerates atherosclerosis without altering plaque composition. *Circulation* 2003;108:2839-2842.
307. George J, Afek A, Abashidze A, Shmilovich H, Deutsch V, Kopolovich J, *et al.* Transfer of endothelial progenitor and bone marrow cells influences atherosclerotic

- plaque size and composition in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2636-2641.
308. Daub K, Langer H, Seizer P, Stellos K, May AE, Goyal P, *et al.* Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells. *FASEB J* 2006;20:2559-2561.
 309. Mayr M, Zampetaki A, Sidibe A, Mayr U, Yin X, De Souza AI, *et al.* Proteomic and metabolomic analysis of smooth muscle cells derived from the arterial media and adventitial progenitors of apolipoprotein E-deficient mice. *Circ Res* 2008;102:1046-1056.
 310. Hu CH, Li ZM, Du ZM, Zhang AX, Rana JS, Liu DH, *et al.* Expanded Human Cord Blood-derived Endothelial Progenitor Cells Salvage Infarcted Myocardium in Rat with Acute Myocardial Infarction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009.
 311. Sekiguchi H, Ii M, Losordo DW. The relative potency and safety of endothelial progenitor cells and unselected mononuclear cells for recovery from myocardial infarction and ischemia. *J Cell Physiol* 2009;219:235-242.
 312. Turan RG, Bozdag TI, Ortak J, Kische S, Akin I, Schneider H, *et al.* Improved functional activity of bone marrow derived circulating progenitor cells after intra coronary freshly isolated bone marrow cells transplantation in patients with ischemic heart disease. *Stem Cell Rev* 2011;7:646-656.
 313. Lasala GP, Minguell JJ. Bone marrow-derived stem/progenitor cells: their use in clinical studies for the treatment of myocardial infarction. *Heart Lung Circ* 2009;18:171-180.
 314. Bauersachs J, Widder JD. Endothelial dysfunction in heart failure. *Pharmacol Rep* 2008;60:119-126.
 315. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;301:H2181-2190.
 316. Andreou I, Tousoulis D, Tentolouris C, Antoniadis C, Stefanadis C. Potential role of endothelial progenitor cells in the pathophysiology of heart failure: clinical implications and perspectives. *Atherosclerosis* 2006;189:247-254.
 317. Nonaka-Sarukawa M, Yamamoto K, Aoki H, Nishimura Y, Tomizawa H, Ichida M, *et al.* Circulating endothelial progenitor cells in congestive heart failure. *Int J Cardiol* 2007;119:344-348.
 318. Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, Porta MD, Soukhomovskaia O, Malagutti P, *et al.* CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation* 2004;110:1209-1212.
 319. Rehman J, Li J, Parvathaneni L, Karlsson G, Panchal VR, Temm CJ, *et al.* Exercise acutely increases circulating endothelial progenitor cells and monocyte/macrophage-derived angiogenic cells. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:2314-2318.
 320. Kelkar A, Kuo A, Frishman WH. Allopurinol as a cardiovascular drug. *Cardiology in review* 2011;19:265-271.
 321. Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest* 2005;115:572-583.
 322. Toda N. Age-related changes in endothelial function and blood flow regulation. *Pharmacol Ther* 2012;133:159-176.

323. Thorin E. Vascular disease risk in patients with hypertriglyceridemia: endothelial progenitor cells, oxidative stress, accelerated senescence, and impaired vascular repair. *Can J Cardiol* 2011;27:538-540.
324. Kushner EJ, MacEneaney OJ, Weil BR, Greiner JJ, Stauffer BL, DeSouza CA. Aging is associated with a proapoptotic endothelial progenitor cell phenotype. *J Vasc Res* 2011;48:408-414.
325. Fadini GP, Schiavon M, Avogaro A, Agostini C. The emerging role of endothelial progenitor cells in pulmonary hypertension and diffuse lung diseases. *Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases : official journal of WASOG / World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders* 2007;24:85-93.
326. Smadja DM, Basire A, Amelot A, Conte A, Bieche I, Le Bonniec BF, *et al.* Thrombin bound to a fibrin clot confers angiogenic and haemostatic properties on endothelial progenitor cells. *J Cell Mol Med* 2008;12:975-986.
327. Brugger W, Mocklin W, Heimfeld S, Berenson RJ, Mertelsmann R, Kanz L. Ex vivo expansion of enriched peripheral blood CD34+ progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1 beta (IL-1 beta), IL-6, IL-3, interferon-gamma, and erythropoietin. *Blood* 1993;81:2579-2584.
328. De Falco E, Porcelli D, Torella AR, Straino S, Iachininoto MG, Orlandi A, *et al.* SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells. *Blood* 2004;104:3472-3482.
329. Stellos K, Bigalke B, Langer H, Geisler T, Schad A, Kogel A, *et al.* Expression of stromal-cell-derived factor-1 on circulating platelets is increased in patients with acute coronary syndrome and correlates with the number of CD34+ progenitor cells. *Eur Heart J* 2009;30:584-593.
330. Zemani F, Silvestre JS, Fauvel-Lafeve F, Bruel A, Vilar J, Bieche I, *et al.* Ex vivo priming of endothelial progenitor cells with SDF-1 before transplantation could increase their proangiogenic potential. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:644-650.
331. Ozuyaman B, Ebner P, Niesler U, Ziemann J, Kleinbongard P, Jax T, *et al.* Nitric oxide differentially regulates proliferation and mobilization of endothelial progenitor cells but not of hematopoietic stem cells. *Thromb Haemost* 2005;94:770-772.
332. Smadja DM, Mauge L, Gaussem P, d'Audigier C, Israel-Biet D, Celermajer DS, *et al.* Treprostinil increases the number and angiogenic potential of endothelial progenitor cells in children with pulmonary hypertension. *Angiogenesis* 2011;14:17-27.
333. Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, Shapira OM, Perry T, Sutherland FW, *et al.* Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med* 2001;7:1035-1040.
334. Critser PJ, Kreger ST, Voytik-Harbin SL, Yoder MC. Collagen matrix physical properties modulate endothelial colony forming cell-derived vessels in vivo. *Microvasc Res* 2010;80:23-30.
335. Kuraitis D, Hou C, Zhang Y, Vulesevic B, Sofrenovic T, McKee D, *et al.* Ex vivo generation of a highly potent population of circulating angiogenic cells using a collagen matrix. *J Mol Cell Cardiol* 2011;51:187-197.
336. Bleiziffer O, Hammon M, Naschberger E, Lipnik K, Arkudas A, Rath S, *et al.* Endothelial progenitor cells are integrated in newly formed capillaries and alter

- adjacent fibrovascular tissue after subcutaneous implantation in a fibrin matrix. *J Cell Mol Med* 2011;15:2452-2461.
337. Barsotti MC, Felice F, Balbarini A, Di Stefano R. Fibrin as a scaffold for cardiac tissue engineering. *Biotechnology and applied biochemistry* 2011;58:301-310.
338. Barsotti MC, Magera A, Armani C, Chiellini F, Felice F, Dinucci D, *et al.* Fibrin acts as biomimetic niche inducing both differentiation and stem cell marker expression of early human endothelial progenitor cells. *Cell proliferation* 2011;44:33-48.
339. Kim KL, Han DK, Park K, Song SH, Kim JY, Kim JM, *et al.* Enhanced dermal wound neovascularization by targeted delivery of endothelial progenitor cells using an RGD-g-PLLA scaffold. *Biomaterials* 2009;30:3742-3748.
340. Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, Murasawa S, Masuda H, Hayashi S, *et al.* Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation* 2002;105:732-738.
341. Murasawa S, Llevadot J, Silver M, Isner JM, Losordo DW, Asahara T. Constitutive human telomerase reverse transcriptase expression enhances regenerative properties of endothelial progenitor cells. *Circulation* 2002;106:1133-1139.
342. Greenberger JS. Gene therapy approaches for stem cell protection. *Gene Ther* 2008;15:100-108.
343. Urbich C, Kuehbach A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res* 2008;79:581-588.
344. Zhao T, Li J, Chen AF. MicroRNA-34a induces endothelial progenitor cell senescence and impedes its angiogenesis via suppressing silent information regulator 1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;299:E110-116.
345. Alaiti MA, Ishikawa M, Masuda H, Simon DI, Jain MK, Asahara T, *et al.* Up-Regulation of miR-210 by Vascular Endothelial Growth Factor in Ex Vivo Expanded CD34+ Cells Enhances Cell-Mediated Angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2012.
346. Tongers J, Losordo DW, Landmesser U. Stem and progenitor cell-based therapy in ischaemic heart disease: promise, uncertainties, and challenges. *Eur Heart J* 2011;32:1197-1206.
347. Dobert N, Britten M, Assmus B, Berner U, Menzel C, Lehmann R, *et al.* Transplantation of progenitor cells after reperfused acute myocardial infarction: evaluation of perfusion and myocardial viability with FDG-PET and thallium SPECT. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 2004;31:1146-1151.
348. Zeng C, Wang X, Hu X, Chen J, Wang L. Autologous endothelial progenitor cells transplantation for the therapy of primary pulmonary hypertension. *Med Hypotheses* 2007;68:1292-1295.
349. Yamamoto K, Kondo T, Suzuki S, Izawa H, Kobayashi M, Emi N, *et al.* Molecular evaluation of endothelial progenitor cells in patients with ischemic limbs: therapeutic effect by stem cell transplantation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:e192-196.
350. Lenk K, Adams V, Lurz P, Erbs S, Linke A, Gielen S, *et al.* Therapeutical potential of blood-derived progenitor cells in patients with peripheral arterial occlusive disease and critical limb ischaemia. *Eur Heart J* 2005;26:1903-1909.

351. Fadini GP, Agostini C, Avogaro A. Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease meta-analysis and systematic review of the literature. *Atherosclerosis* 2010;209:10-17.
352. Borissoff JI, Spronk HM, ten Cate H. The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *N Engl J Med* 2011;364:1746-1760.
353. Lindemann S, Kramer B, Seizer P, Gawaz M. Platelets, inflammation and atherosclerosis. *J Thromb Haemost* 2007;5 Suppl 1:203-211.
354. May AE, Seizer P, Gawaz M. Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:s5-10.
355. Vieira-de-Abreu A, Campbell RA, Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Seminars in immunopathology* 2012;34:5-30.
356. Wagner DD, Burger PC. Platelets in inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:2131-2137.
357. Shi G, Morrell CN. Platelets as initiators and mediators of inflammation at the vessel wall. *Thrombosis research* 2011;127:387-390.
358. Semple JW, Freedman J. Platelets and innate immunity. *Cell Mol Life Sci* 2010;67:499-511.
359. Sprague DL, Elzey BD, Crist SA, Waldschmidt TJ, Jensen RJ, Ratliff TL. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity: unique delivery of CD154 signal by platelet-derived membrane vesicles. *Blood* 2008;111:5028-5036.
360. Gawaz M, Stellos K, Langer HF. Platelets modulate atherogenesis and progression of atherosclerotic plaques via interaction with progenitor and dendritic cells. *J Thromb Haemost* 2008;6:235-242.
361. Lievens D, von Hundelshausen P. Platelets in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2011;106:827-838.
362. Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med* 2007;357:2482-2494.
363. Kaplan ZS, Jackson SP. The role of platelets in atherothrombosis. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program* 2011;2011:51-61.
364. Jennings LK. Role of platelets in atherothrombosis. *Am J Cardiol* 2009;103:4A-10A.
365. Borsig L. The role of platelet activation in tumor metastasis. *Expert review of anticancer therapy* 2008;8:1247-1255.
366. Varon D, Shai E. Role of platelet-derived microparticles in angiogenesis and tumor progression. *Discovery medicine* 2009;8:237-241.
367. Kleiman NS, Freedman JE, Tracy PB, Furie BC, Bray PF, Rao SV, *et al.* Platelets: developmental biology, physiology, and translatable platforms for preclinical investigation and drug development. *Platelets* 2008;19:239-251.
368. Ni H, Freedman J. Platelets in hemostasis and thrombosis: role of integrins and their ligands. *Transfus Apher Sci* 2003;28:257-264.
369. Gawaz M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res* 2004;61:498-511.
370. Elzey BD, Tian J, Jensen RJ, Swanson AK, Lees JR, Lentz SR, *et al.* Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity* 2003;19:9-19.

371. Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res* 2007;100:1673-1685.
372. Surin WR, Barthwal MK, Dikshit M. Platelet collagen receptors, signaling and antagonism: emerging approaches for the prevention of intravascular thrombosis. *Thromb Res* 2008;122:786-803.
373. Nieuwenhuis HK, Akkerman JW, Houdijk WP, Sixma JJ. Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia. *Nature* 1985;318:470-472.
374. Samaha FF, Hibbard C, Sacks J, Chen H, Varello MA, George T, *et al.* Density of platelet collagen receptors glycoprotein VI and alpha2beta1 and prior myocardial infarction in human subjects, a pilot study. *Med Sci Monit* 2005;11:CR224-229.
375. Watson SP, Auger JM, McCarty OJ, Pearce AC. GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets. *J Thromb Haemost* 2005;3:1752-1762.
376. Nieswandt B, Bergmeier W, Eckly A, Schulte V, Ohlmann P, Cazenave JP, *et al.* Evidence for cross-talk between glycoprotein VI and Gi-coupled receptors during collagen-induced platelet aggregation. *Blood* 2001;97:3829-3835.
377. Dubois C, Panicot-Dubois L, Merrill-Skoloff G, Furie B, Furie BC. Glycoprotein VI-dependent and -independent pathways of thrombus formation in vivo. *Blood* 2006;107:3902-3906.
378. Ikeda H. Platelet membrane protein CD36. [*Hokkaido igaku zasshi*] *The Hokkaido journal of medical science* 1999;74:99-104.
379. Nergiz-Unal R, Lamers MM, Van Kruchten R, Luiken JJ, Cosemans JM, Glatz JF, *et al.* Signaling role of CD36 in platelet activation and thrombus formation on immobilized thrombospondin or oxidized low-density lipoprotein. *J Thromb Haemost* 2011;9:1835-1846.
380. Silverstein RL, Li W, Park YM, Rahaman SO. Mechanisms of cell signaling by the scavenger receptor CD36: implications in atherosclerosis and thrombosis. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 2010;121:206-220.
381. Ashraf MZ, Gupta N. Scavenger receptors: Implications in atherothrombotic disorders. *Int J Biochem Cell Biol* 2011;43:697-700.
382. Nergiz-Unal R, Rademakers T, Cosemans JM, Heemskerk JW. CD36 as a multiple-ligand signaling receptor in atherothrombosis. *Cardiovascular & hematological agents in medicinal chemistry* 2011;9:42-55.
383. Rivera J, Lozano ML, Corral J, Gonzalez-Conejero R, Martinez C, Vicente V. Platelet GP Ib/IX/V complex: physiological role. *Journal of physiology and biochemistry* 2000;56:355-365.
384. Jackson SP, Nesbitt WS, Kulkarni S. Signaling events underlying thrombus formation. *J Thromb Haemost* 2003;1:1602-1612.
385. Vanhoorelbeke K, Ulrichs H, Van de Walle G, Fontayne A, Deckmyn H. Inhibition of platelet glycoprotein Ib and its antithrombotic potential. *Current pharmaceutical design* 2007;13:2684-2697.
386. Blann AD, Nadar SK, Lip GY. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *Eur Heart J* 2003;24:2166-2179.

387. Abou-Saleh H, Theoret JF, Yacoub D, Merhi Y. Neutrophil P-selectin-glycoprotein-ligand-1 binding to platelet P-selectin enhances metalloproteinase 2 secretion and platelet-neutrophil aggregation. *Thromb Haemost* 2005;94:1230-1235.
388. Zarbock A, Muller H, Kuwano Y, Ley K. PSGL-1-dependent myeloid leukocyte activation. *J Leukoc Biol* 2009;86:1119-1124.
389. Yngen M, Ostenson CG, Hu H, Li N, Hjemdahl P, Wallen NH. Enhanced P-selectin expression and increased soluble CD40 Ligand in patients with Type 1 diabetes mellitus and microangiopathy: evidence for platelet hyperactivity and chronic inflammation. *Diabetologia* 2004;47:537-540.
390. Frenette PS, Denis CV, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel B, *et al.* P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med* 2000;191:1413-1422.
391. Massberg S, Enders G, Matos FC, Tomic LI, Leiderer R, Eisenmenger S, *et al.* Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood* 1999;94:3829-3838.
392. Khandoga A, Biberthaler P, Enders G, Axmann S, Hutter J, Messmer K, *et al.* Platelet adhesion mediated by fibrinogen-intercellular adhesion molecule-1 binding induces tissue injury in the postischemic liver in vivo. *Transplantation* 2002;74:681-688.
393. Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 1996;84:289-297.
394. Bernardo A, Ball C, Nolasco L, Moake JF, Dong JF. Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow. *Blood* 2004;104:100-106.
395. Rivera-Nieves J, Burcin TL, Olson TS, Morris MA, McDuffie M, Cominelli F, *et al.* Critical role of endothelial P-selectin glycoprotein ligand 1 in chronic murine ileitis. *J Exp Med* 2006;203:907-917.
396. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:403-412.
397. White JG, Clawson CC. The surface-connected canalicular system of blood platelets--a fenestrated membrane system. *Am J Pathol* 1980;101:353-364.
398. Yacoub D, Theoret JF, Villeneuve L, Abou-Saleh H, Mourad W, Allen BG, *et al.* Essential role of protein kinase C delta in platelet signaling, alpha IIb beta 3 activation, and thromboxane A2 release. *J Biol Chem* 2006;281:30024-30035.
399. Frojmovic MM, Milton JG. Human platelet size, shape, and related functions in health and disease. *Physiological reviews* 1982;62:185-261.
400. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood reviews* 2009;23:177-189.
401. Flad HD, Brandt E. Platelet-derived chemokines: pathophysiology and therapeutic aspects. *Cell Mol Life Sci* 2010;67:2363-2386.
402. von Hundelshausen P, Petersen F, Brandt E. Platelet-derived chemokines in vascular biology. *Thromb Haemost* 2007;97:704-713.
403. Ren Q, Ye S, Whiteheart SW. The platelet release reaction: just when you thought platelet secretion was simple. *Curr Opin Hematol* 2008;15:537-541.
404. Otterdal K, Pedersen TM, Solum NO. Release of soluble CD40 ligand after platelet activation: studies on the solubilization phase. *Thromb Res* 2004;114:167-177.

405. Totani L, Evangelista V. Platelet-leukocyte interactions in cardiovascular disease and beyond. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:2357-2361.
406. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* 2001;12:261-273.
407. Harper MT, Poole AW. Diverse functions of protein kinase C isoforms in platelet activation and thrombus formation. *J Thromb Haemost* 2010;8:454-462.
408. Mundell SJ, Jones ML, Hardy AR, Barton JF, Beaucourt SM, Conley PB, *et al.* Distinct roles for protein kinase C isoforms in regulating platelet purinergic receptor function. *Mol Pharmacol* 2006;70:1132-1142.
409. Harper MT, Sage SO. PAR-1-dependent pp60src activation is dependent on protein kinase C and increased [Ca²⁺]: evidence that pp60src does not regulate PAR-1-dependent Ca²⁺ entry in human platelets. *J Thromb Haemost* 2006;4:2695-2703.
410. Patrono C, Baigent C, Hirsh J, Roth G, American College of Chest P. Antiplatelet drugs: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest* 2008;133:199S-233S.
411. Eikelboom JW, Hirsh J, Spencer FA, Baglin TP, Weitz JI. Antiplatelet drugs: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 2012;141:e89S-119S.
412. Yokoyama S, Ikeda H, Haramaki N, Yasukawa H, Murohara T, Imaizumi T. Platelet P-selectin plays an important role in arterial thrombogenesis by forming large stable platelet-leukocyte aggregates. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1280-1286.
413. Cerletti C, de Gaetano G, Lorenzet R. Platelet - leukocyte interactions: multiple links between inflammation, blood coagulation and vascular risk. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases* 2010;2:e2010023.
414. von Bruhl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, *et al.* Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med* 2012;209:819-835.
415. van Gils JM, Zwaginga JJ, Hordijk PL. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *J Leukoc Biol* 2009;85:195-204.
416. Andrews RK, Berndt MC. Platelet physiology: in cold blood. *Curr Biol* 2003;13:R282-284.
417. Andrews RK, Berndt MC. Platelet physiology and thrombosis. *Thromb Res* 2004;114:447-453.
418. Li G, Sanders JM, Bevard MH, Sun Z, Chumley JW, Galkina EV, *et al.* CD40 ligand promotes Mac-1 expression, leukocyte recruitment, and neointima formation after vascular injury. *Am J Pathol* 2008;172:1141-1152.
419. Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1687-1693.
420. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med* 2008;359:938-949.
421. Goto S, Ikeda Y, Saldivar E, Ruggeri ZM. Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions. *J Clin Invest* 1998;101:479-486.

422. Goto S. Propagation of arterial thrombi: local and remote contributory factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:2207-2208.
423. Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost* 2002;88:186-193.
424. Conde ID, Kleiman NS. Arterial thrombosis for the interventional cardiologist: from adhesion molecules and coagulation factors to clinical therapeutics. *Catheter Cardiovasc Interv* 2003;60:236-246.
425. O'Brien JJ, Ray DM, Spinelli SL, Blumberg N, Taubman MB, Francis CW, *et al.* The platelet as a therapeutic target for treating vascular diseases and the role of eicosanoid and synthetic PPARgamma ligands. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2007;82:68-76.
426. Langer H, May AE, Daub K, Heinzmann U, Lang P, Schumm M, *et al.* Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro. *Circ Res* 2006;98:e2-10.
427. Langer HF, Gawaz M. Platelets in regenerative medicine. *Basic Res Cardiol* 2008;103:299-307.
428. Langer HF, May AE, Vestweber D, De Boer HC, Hatzopoulos AK, Gawaz M. Platelet-induced differentiation of endothelial progenitor cells. *Semin Thromb Hemost* 2007;33:136-143.
429. de Boer HC, Verseyden C, Ulfman LH, Zwaginga JJ, Bot I, Biessen EA, *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* 2006;26:1653-1659.
430. Dickfeld T, Lengyel E, May AE, Massberg S, Brand K, Page S, *et al.* Transient interaction of activated platelets with endothelial cells induces expression of monocyte-chemoattractant protein-1 via a p38 mitogen-activated protein kinase mediated pathway. Implications for atherogenesis. *Cardiovasc Res* 2001;49:189-199.
431. Stellos K, Panagiota V, Gnerlich S, Borst O, Bigalke B, Gawaz M. Expression of junctional adhesion molecule-C on the surface of platelets supports adhesion, but not differentiation, of human CD34 cells in vitro. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 2012;29:153-162.
432. Stellos K, Langer H, Gnerlich S, Panagiota V, Paul A, Schonberger T, *et al.* Junctional adhesion molecule A expressed on human CD34+ cells promotes adhesion on vascular wall and differentiation into endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:1127-1136.
433. Weber C. Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime. *Circ Res* 2005;96:612-616.
434. Lippross S, Loibl M, Hoppe S, Meury T, Benneker L, Alini M, *et al.* Platelet released growth factors boost expansion of bone marrow derived CD34(+) and CD133(+) endothelial progenitor cells for autologous grafting. *Platelets* 2011;22:422-432.
435. Sufen G, Xianghong Y, Yongxia C, Qian P. bFGF and PDGF-BB have a synergistic effect on the proliferation, migration and VEGF release of endothelial progenitor cells. *Cell biology international* 2011;35:545-551.

436. Stellos K, Seizer P, Bigalke B, Daub K, Geisler T, Gawaz M. Platelet aggregates-induced human CD34+ progenitor cell proliferation and differentiation to macrophages and foam cells is mediated by stromal cell derived factor 1 in vitro. *Semin Thromb Hemost* 2010;36:139-145.
437. Balestrieri ML, Giovane A, Milone L, Servillo L. Endothelial progenitor cells express PAF receptor and respond to PAF via Ca(2+)-dependent signaling. *Biochim Biophys Acta* 2010;1801:1123-1132.
438. Prokopi M, Pula G, Mayr U, Devue C, Gallagher J, Xiao Q, *et al.* Proteomic analysis reveals presence of platelet microparticles in endothelial progenitor cell cultures. *Blood* 2009;114:723-732.
439. Mause SF, Ritzel E, Liehn EA, Hristov M, Bidzhekov K, Muller-Newen G, *et al.* Platelet microparticles enhance the vasoregenerative potential of angiogenic early outgrowth cells after vascular injury. *Circulation* 2010;122:495-506.
440. Kleinbongard P, Weber AA. Impaired interaction between platelets and endothelial progenitor cells in diabetic patients. *Basic Res Cardiol* 2008;103:569-571.
441. Sopova K, Tatsidou P, Stellos K. Platelets and Platelet Interaction with Progenitor Cells in Vascular Homeostasis and Inflammation. *Current vascular pharmacology* 2012.
442. Feng W, Madajka M, Kerr BA, Mahabeleshwar GH, Whiteheart SW, Byzova TV. A novel role for platelet secretion in angiogenesis: mediating bone marrow-derived cell mobilization and homing. *Blood* 2011;117:3893-3902.
443. Gallagher KA, Liu ZJ, Xiao M, Chen H, Goldstein LJ, Buerk DG, *et al.* Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 alpha. *J Clin Invest* 2007;117:1249-1259.
444. Yu JX, Huang XF, Lv WM, Ye CS, Peng XZ, Zhang H, *et al.* Combination of stromal-derived factor-1alpha and vascular endothelial growth factor gene-modified endothelial progenitor cells is more effective for ischemic neovascularization. *J Vasc Surg* 2009;50:608-616.
445. Smid J, Braun-Dullaeus R, Gawaz M, Langer HF. Platelet interactions as therapeutic targets for prevention of atherothrombosis. *Future cardiology* 2009;5:285-296.
446. Schonbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:4-43.
447. Schonbeck U, Libby P. CD40 signaling and plaque instability. *Circ Res* 2001;89:1092-1103.
448. de Lemos JA, Zirlik A, Schonbeck U, Varo N, Murphy SA, Khera A, *et al.* Associations between soluble CD40 ligand, atherosclerosis risk factors, and subclinical atherosclerosis: results from the Dallas Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2192-2196.
449. Clark EA, Ledbetter JA. Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:4494-4498.
450. Paulie S, Ehlin-Henriksson B, Mellstedt H, Koho H, Ben-Aissa H, Perlmann P. A p50 surface antigen restricted to human urinary bladder carcinomas and B lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* 1985;20:23-28.
451. Hill A, Chapel H. X-linked immunodeficiency. The fruits of cooperation. *Nature* 1993;361:494.

452. Rizvi M, Pathak D, Freedman JE, Chakrabarti S. CD40-CD40 ligand interactions in oxidative stress, inflammation and vascular disease. *Trends Mol Med* 2008;14:530-538.
453. Chatzigeorgiou A, Lyberi M, Chatzilymperis G, Nezos A, Kamper E. CD40/CD40L signaling and its implication in health and disease. *Biofactors* 2009;35:474-483.
454. Fanslow WC, Srinivasan S, Paxton R, Gibson MG, Spriggs MK, Armitage RJ. Structural characteristics of CD40 ligand that determine biological function. *Semin Immunol* 1994;6:267-278.
455. Hassan GS, Rana M, Léveillé C, Nadiri A, Jundi M, Polyak M, *et al.* Implication of CD154/CD40 Interaction in Healthy and Autoimmune Responses. *Current Immunology Reviews* 2009;5:285-299.
456. van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 2000;67:2-17.
457. Anand SX, Viles-Gonzalez JF, Badimon JJ, Cavusoglu E, Marmur JD. Membrane-associated CD40L and sCD40L in atherothrombotic disease. *Thromb Haemost* 2003;90:377-384.
458. Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Lenardo MJ. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 2000;288:2351-2354.
459. Pietravalle F, Lecoanet-Henchoz S, Blasey H, Aubry JP, Elson G, Edgerton MD, *et al.* Human native soluble CD40L is a biologically active trimer, processed inside microsomes. *J Biol Chem* 1996;271:5965-5967.
460. Lutgens E, Lievens D, Beckers L, Donners M, Daemen M. CD40 and its ligand in atherosclerosis. *Trends in cardiovascular medicine* 2007;17:118-123.
461. Russo S, Bussolati B, Deambrosis I, Mariano F, Camussi G. Platelet-activating factor mediates CD40-dependent angiogenesis and endothelial-smooth muscle cell interaction. *J Immunol* 2003;171:5489-5497.
462. Melter M, Reinders ME, Sho M, Pal S, Geehan C, Denton MD, *et al.* Ligation of CD40 induces the expression of vascular endothelial growth factor by endothelial cells and monocytes and promotes angiogenesis in vivo. *Blood* 2000;96:3801-3808.
463. Hassan GS, Merhi Y, Mourad WM. CD154 and its receptors in inflammatory vascular pathologies. *Trends Immunol* 2009;30:165-172.
464. Loubaki L, Semlali A, Boisvert M, Jacques E, Plante S, Aoudjit F, *et al.* Crosstalk between T cells and bronchial fibroblasts obtained from asthmatic subjects involves CD40L/alpha 5 beta 1 interaction. *Mol Immunol* 2010;47:2112-2118.
465. Abshire MY, Thomas KS, Owen KA, Bouton AH. Macrophage motility requires distinct alpha5beta1/FAK and alpha4beta1/paxillin signaling events. *J Leukoc Biol* 2011;89:251-257.
466. Leveille C, Bouillon M, Guo W, Bolduc J, Sharif-Askari E, El-Fakhry Y, *et al.* CD40 ligand binds to alpha5beta1 integrin and triggers cell signaling. *J Biol Chem* 2007;282:5143-5151.
467. Gao JX, Issekutz AC. Mac-1 (CD11b/CD18) is the predominant beta 2 (CD18) integrin mediating human neutrophil migration through synovial and dermal fibroblast barriers. *Immunology* 1996;88:463-470.
468. Flick MJ, Du X, Witte DP, Jirouskova M, Soloviev DA, Busuttill SJ, *et al.* Leukocyte engagement of fibrin(ogen) via the integrin receptor alphaMbeta2/Mac-1 is critical for host inflammatory response in vivo. *J Clin Invest* 2004;113:1596-1606.

469. Wong CH, Heit B, Kubes P. Molecular regulators of leucocyte chemotaxis during inflammation. *Cardiovasc Res* 2010;86:183-191.
470. Zirlik A, Maier C, Gerdes N, MacFarlane L, Soosairajah J, Bavendiek U, *et al.* CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1. *Circulation* 2007;115:1571-1580.
471. Phillips DR, Law D, Scarborough RM. Glycoprotein IIb-IIIa in platelet aggregation: an emerging target for the prevention of acute coronary thrombotic occlusions. *Arch Pathol Lab Med* 1998;122:811-812.
472. Bennett JS. Platelet-fibrinogen interactions. *Ann N Y Acad Sci* 2001;936:340-354.
473. Prasad KS, Andre P, He M, Bao M, Manganello J, Phillips DR. Soluble CD40 ligand induces beta3 integrin tyrosine phosphorylation and triggers platelet activation by outside-in signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:12367-12371.
474. Lerea KM, Cordero KP, Sakariassen KS, Kirk RI, Fried VA. Phosphorylation sites in the integrin beta3 cytoplasmic domain in intact platelets. *J Biol Chem* 1999;274:1914-1919.
475. Andre P, Prasad KS, Denis CV, He M, Papalia JM, Hynes RO, *et al.* CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism. *Nat Med* 2002;8:247-252.
476. May AE, Kalsch T, Massberg S, Herouy Y, Schmidt R, Gawaz M. Engagement of glycoprotein IIb/IIIa (alpha(IIb)beta3) on platelets upregulates CD40L and triggers CD40L-dependent matrix degradation by endothelial cells. *Circulation* 2002;106:2111-2117.
477. Nannizzi-Alaimo L, Alves VL, Phillips DR. Inhibitory effects of glycoprotein IIb/IIIa antagonists and aspirin on the release of soluble CD40 ligand during platelet stimulation. *Circulation* 2003;107:1123-1128.
478. Furman MI, Krueger LA, Linden MD, Barnard MR, Frelinger AL, 3rd, Michelson AD. Release of soluble CD40L from platelets is regulated by glycoprotein IIb/IIIa and actin polymerization. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:2319-2325.
479. Bishop GA, Moore CR, Xie P, Stunz LL, Kraus ZJ. TRAF proteins in CD40 signaling. *Advances in experimental medicine and biology* 2007;597:131-151.
480. Davies CC, Mak TW, Young LS, Eliopoulos AG. TRAF6 is required for TRAF2-dependent CD40 signal transduction in nonhemopoietic cells. *Mol Cell Biol* 2005;25:9806-9819.
481. Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev* 2009;229:152-172.
482. Jabara HH, Buckley RH, Roberts JL, Lefranc G, Loiselet J, Khalil G, *et al.* Role of JAK3 in CD40-mediated signaling. *Blood* 1998;92:2435-2440.
483. Chung JY, Park YC, Ye H, Wu H. All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J Cell Sci* 2002;115:679-688.
484. Arron JR, Pewzner-Jung Y, Walsh MC, Kobayashi T, Choi Y. Regulation of the subcellular localization of tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)2 by TRAF1 reveals mechanisms of TRAF2 signaling. *J Exp Med* 2002;196:923-934.

485. Arron JR, Walsh MC, Choi Y. TRAF-mediated TNFR-family signaling. *Current protocols in immunology / edited by John E Coligan [et al]* 2002;Chapter 11:Unit 11 19D.
486. Chen Y, Chen J, Xiong Y, Da Q, Xu Y, Jiang X, *et al.* Internalization of CD40 regulates its signal transduction in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;345:106-117.
487. Sun SC. The noncanonical NF-kappaB pathway. *Immunol Rev* 2012;246:125-140.
488. Razani B, Reichardt AD, Cheng G. Non-canonical NF-kappaB signaling activation and regulation: principles and perspectives. *Immunol Rev* 2011;244:44-54.
489. Monaco C, Andreakos E, Kiriakidis S, Mauri C, Bicknell C, Foxwell B, *et al.* Canonical pathway of nuclear factor kappa B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:5634-5639.
490. Zhao C, Xiu Y, Ashton J, Xing L, Morita Y, Jordan CT, *et al.* Noncanonical NF-kappaB signaling regulates hematopoietic stem cell self-renewal and microenvironment interactions. *Stem Cells* 2012;30:709-718.
491. Hauer J, Puschner S, Ramakrishnan P, Simon U, Bongers M, Federle C, *et al.* TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:2874-2879.
492. Bradley JR, Pober JS. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* 2001;20:6482-6491.
493. Xie P, Hostager BS, Munroe ME, Moore CR, Bishop GA. Cooperation between TNF receptor-associated factors 1 and 2 in CD40 signaling. *J Immunol* 2006;176:5388-5400.
494. Pearson LL, Castle BE, Kehry MR. CD40-mediated signaling in monocytic cells: up-regulation of tumor necrosis factor receptor-associated factor mRNAs and activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Int Immunol* 2001;13:273-283.
495. Zirlik A, Bavendiek U, Libby P, MacFarlane L, Gerdes N, Jagielska J, *et al.* TRAF-1, -2, -3, -5, and -6 are induced in atherosclerotic plaques and differentially mediate proinflammatory functions of CD40L in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1101-1107.
496. Au PY, Yeh WC. Physiological roles and mechanisms of signaling by TRAF2 and TRAF5. *Advances in experimental medicine and biology* 2007;597:32-47.
497. Lee SY, Reichlin A, Santana A, Sokol KA, Nussenzweig MC, Choi Y. TRAF2 is essential for JNK but not NF-kappaB activation and regulates lymphocyte proliferation and survival. *Immunity* 1997;7:703-713.
498. Wajant H, Scheurich P. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33:19-32.
499. Deng Y, Ren X, Yang L, Lin Y, Wu X. A JNK-dependent pathway is required for TNFalpha-induced apoptosis. *Cell* 2003;115:61-70.
500. Arch RH, Gedrich RW, Thompson CB. Translocation of TRAF proteins regulates apoptotic threshold of cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;272:936-945.

501. Dupoux A, Cartier J, Cathelin S, Filomenko R, Solary E, Dubrez-Daloz L. cIAP1-dependent TRAF2 degradation regulates the differentiation of monocytes into macrophages and their response to CD40 ligand. *Blood* 2009;113:175-185.
502. Jabara HH, Weng Y, Sannikova T, Geha RS. TRAF2 and TRAF3 independently mediate Ig class switching driven by CD40. *Int Immunol* 2009;21:477-488.
503. Jabara H, Laouini D, Tsitsikov E, Mizoguchi E, Bhan A, Castigli E, *et al.* The binding site for TRAF2 and TRAF3 but not for TRAF6 is essential for CD40-mediated immunoglobulin class switching. *Immunity* 2002;17:265-276.
504. He L, Grammer AC, Wu X, Lipsky PE. TRAF3 forms heterotrimers with TRAF2 and modulates its ability to mediate NF- κ B activation. *J Biol Chem* 2004;279:55855-55865.
505. Zarnegar BJ, Wang Y, Mahoney DJ, Dempsey PW, Cheung HH, He J, *et al.* Noncanonical NF- κ B activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. *Nature immunology* 2008;9:1371-1378.
506. Vallabhapurapu S, Matsuzawa A, Zhang W, Tseng PH, Keats JJ, Wang H, *et al.* Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF- κ B signaling. *Nature immunology* 2008;9:1364-1370.
507. Zhang W, Zhang X, Wu XL, He LS, Zeng XF, Crammer AC, *et al.* Competition between TRAF2 and TRAF6 regulates NF- κ B activation in human B lymphocytes. *Chin Med Sci J* 2010;25:1-12.
508. Yacoub D, Hachem A, Theoret JF, Gillis MA, Mourad W, Merhi Y. Enhanced levels of soluble CD40 ligand exacerbate platelet aggregation and thrombus formation through a CD40-dependent tumor necrosis factor receptor-associated factor-2/Rac1/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:2424-2433.
509. Urbich C, Mallat Z, Tedgui A, Clauss M, Zeiher AM, Dimmeler S. Upregulation of TRAF-3 by shear stress blocks CD40-mediated endothelial activation. *J Clin Invest* 2001;108:1451-1458.
510. Ha YJ, Lee JR. Role of TNF receptor-associated factor 3 in the CD40 signaling by production of reactive oxygen species through association with p40phox, a cytosolic subunit of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. *Journal of immunology* 2004;172:231-239.
511. Georgopoulos NT, Steele LP, Thomson MJ, Selby PJ, Southgate J, Trejdosiewicz LK. A novel mechanism of CD40-induced apoptosis of carcinoma cells involving TRAF3 and JNK/AP-1 activation. *Cell Death Differ* 2006;13:1789-1801.
512. Regnier CH, Masson R, Keding V, Textoris J, Stoll I, Chenard MP, *et al.* Impaired neural tube closure, axial skeleton malformations, and tracheal ring disruption in TRAF4-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:5585-5590.
513. Keding V, Rio MC. TRAF4, the unique family member. *Adv Exp Med Biol* 2007;597:60-71.
514. Tong AW, Seamour B, Chen J, Su D, Ordonez G, Frase L, *et al.* CD40 ligand-induced apoptosis is Fas-independent in human multiple myeloma cells. *Leukemia & lymphoma* 2000;36:543-558.

515. Craxton A, Shu G, Graves JD, Saklatvala J, Krebs EG, Clark EA. p38 MAPK is required for CD40-induced gene expression and proliferation in B lymphocytes. *J Immunol* 1998;161:3225-3236.
516. Blaise S, Kneib M, Rousseau A, Gambino F, Chenard MP, Messadeq N, *et al.* In vivo evidence that TRAF4 is required for central nervous system myelin homeostasis. *PLoS One* 2012;7:e30917.
517. Marinis JM, Hutti JE, Homer CR, Cobb BA, Cantley LC, McDonald C, *et al.* IKKalpha Phosphorylation of TRAF4 down-regulates innate immune signaling. *Mol Cell Biol* 2012.
518. Nakano H, Sakon S, Koseki H, Takemori T, Tada K, Matsumoto M, *et al.* Targeted disruption of Traf5 gene causes defects in CD40- and CD27-mediated lymphocyte activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:9803-9808.
519. Donners MM, Beckers L, Lievens D, Munnix I, Heemskerk J, Janssen BJ, *et al.* The CD40-TRAF6 axis is the key regulator of the CD40/CD40L system in neointima formation and arterial remodeling. *Blood* 2008;111:4596-4604.
520. Lutgens E, Lievens D, Beckers L, Wijnands E, Soehnlein O, Zerneck A, *et al.* Deficient CD40-TRAF6 signaling in leukocytes prevents atherosclerosis by skewing the immune response toward an antiinflammatory profile. *J Exp Med* 2010;207:391-404.
521. Song Z, Jin R, Yu S, Rivet JJ, Smyth SS, Nanda A, *et al.* CD40 is essential in the upregulation of TRAF proteins and NF-kappaB-dependent proinflammatory gene expression after arterial injury. *PLoS One* 2011;6:e23239.
522. Song Z, Jin R, Yu S, Nanda A, Granger DN, Li G. Crucial role of CD40 signaling in vascular wall cells in neointimal formation and vascular remodeling after vascular interventions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:50-64.
523. Jundi M, Nadiri A, Al-Zoobi L, Hassan GS, Mourad W. CD40-mediated cell death requires TRAF6 recruitment. *Immunobiology* 2012;217:375-383.
524. Hanissian SH, Geha RS. Jak3 is associated with CD40 and is critical for CD40 induction of gene expression in B cells. *Immunity* 1997;6:379-387.
525. Revy P, Hivroz C, Andreu G, Graber P, Martinache C, Fischer A, *et al.* Activation of the Janus kinase 3-STAT5a pathway after CD40 triggering of human monocytes but not of resting B cells. *J Immunol* 1999;163:787-793.
526. Saemann MD, Kelemen P, Zeyda M, Bohmig G, Staffler G, Zlabinger GJ. CD40 triggered human monocyte-derived dendritic cells convert to tolerogenic dendritic cells when JAK3 activity is inhibited. *Transplantation proceedings* 2002;34:1407-1408.
527. Saemann MD, Diakos C, Kelemen P, Kriehuber E, Zeyda M, Bohmig GA, *et al.* Prevention of CD40-triggered dendritic cell maturation and induction of T-cell hyporeactivity by targeting of Janus kinase 3. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2003;3:1341-1349.
528. Inwald DP, McDowall A, Peters MJ, Callard RE, Klein NJ. CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. *Circ Res* 2003;92:1041-1048.
529. Elzey BD, Ratliff TL, Sowa JM, Crist SA. Platelet CD40L at the interface of adaptive immunity. *Thromb Res* 2011;127:180-183.

530. Leroyer AS, Rautou PE, Silvestre JS, Castier Y, Leseche G, Devue C, *et al.* CD40 ligand+ microparticles from human atherosclerotic plaques stimulate endothelial proliferation and angiogenesis a potential mechanism for intraplaque neovascularization. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:1302-1311.
531. Mach F, Schonbeck U, Fabunmi RP, Murphy C, Atkinson E, Bonnefoy JY, *et al.* T lymphocytes induce endothelial cell matrix metalloproteinase expression by a CD40L-dependent mechanism: implications for tubule formation. *Am J Pathol* 1999;154:229-238.
532. Urbich C, Dernbach E, Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species. *Circulation* 2002;106:981-986.
533. Wagner AH, Guldenzoph B, Lienenluke B, Hecker M. CD154/CD40-mediated expression of CD154 in endothelial cells: consequences for endothelial cell-monocyte interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:715-720.
534. Urban D, Thanabalasingam U, Stibenz D, Kaufmann J, Meyborg H, Fleck E, *et al.* CD40/CD40L interaction induces E-selectin dependent leukocyte adhesion to human endothelial cells and inhibits endothelial cell migration. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;404:448-452.
535. Seijkens T, Engel D, Tjwa M, Lutgens E. The role of CD154 in haematopoietic development. *Thromb Haemost* 2010;104:693-701.
536. Hristov M, Gumbel D, Lutgens E, Zerneck A, Weber C. Soluble CD40 ligand impairs the function of peripheral blood angiogenic outgrowth cells and increases neointimal formation after arterial injury. *Circulation* 2010;121:315-324.
537. Quezada SA, Jarvinen LZ, Lind EF, Noelle RJ. CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. *Annual review of immunology* 2004;22:307-328.
538. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *The Journal of experimental medicine* 1996;184:747-752.
539. Dallman C, Johnson PW, Packham G. Differential regulation of cell survival by CD40. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 2003;8:45-53.
540. Zhang X, Li L, Choe J, Krajewski S, Reed JC, Thompson C, *et al.* Up-regulation of Bcl-xL expression protects CD40-activated human B cells from Fas-mediated apoptosis. *Cell Immunol* 1996;173:149-154.
541. Lee HH, Dadgostar H, Cheng Q, Shu J, Cheng G. NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:9136-9141.
542. Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* 1996;87:565-576.
543. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995;267:1449-1456.
544. Eeva J, Ropponen A, Nuutinen U, Eeva ST, Matto M, Eray M, *et al.* The CD40-induced protection against CD95-mediated apoptosis is associated with a rapid upregulation of anti-apoptotic c-FLIP. *Mol Immunol* 2007;44:1230-1237.

545. Wu M, Li YG. The expression of CD40-CD40L and activities of matrix metalloproteinases in atherosclerotic rats. *Mol Cell Biochem* 2006;282:141-146.
546. Vanichakarn P, Blair P, Wu C, Freedman JE, Chakrabarti S. Neutrophil CD40 enhances platelet-mediated inflammation. *Thromb Res* 2008;122:346-358.
547. Hassan GS, Merhi Y, Mourad W. CD40 ligand: a neo-inflammatory molecule in vascular diseases. *Immunobiology* 2012;217:521-532.
548. Engel D, Seijkens T, Poggi M, Sanati M, Thevissen L, Beckers L, *et al.* The immunobiology of CD154-CD40-TRAF interactions in atherosclerosis. *Semin Immunol* 2009;21:308-312.
549. Pamukcu B, Lip GY, Snezhitskiy V, Shantsila E. The CD40-CD40L system in cardiovascular disease. *Annals of medicine* 2011;43:331-340.
550. Martin-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Tunon J, Munoz-Garcia B, Madrigal-Matute J, Moreno JA, *et al.* Biomarkers in cardiovascular medicine. *Rev Esp Cardiol* 2009;62:677-688.
551. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, van den Brand MJ, Boersma E, Zeiher AM, *et al.* Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2003;348:1104-1111.
552. Garlichs CD, Eskafi S, Raaz D, Schmidt A, Ludwig J, Herrmann M, *et al.* Patients with acute coronary syndromes express enhanced CD40 ligand/CD154 on platelets. *Heart* 2001;86:649-655.
553. Law CL, Grewal IS. Therapeutic interventions targeting CD40L (CD154) and CD40: the opportunities and challenges. *Adv Exp Med Biol* 2009;647:8-36.
554. Zheng X, Suzuki M, Zhang X, Ichim TE, Zhu F, Ling H, *et al.* RNAi-mediated CD40-CD154 interruption promotes tolerance in autoimmune arthritis. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R13.
555. Pluvinet R, Petriz J, Torras J, Herrero-Fresneda I, Cruzado JM, Grinyo JM, *et al.* RNAi-mediated silencing of CD40 prevents leukocyte adhesion on CD154-activated endothelial cells. *Blood* 2004;104:3642-3646.
556. Toubi E, Shoenfeld Y. The role of CD40-CD154 interactions in autoimmunity and the benefit of disrupting this pathway. *Autoimmunity* 2004;37:457-464.
557. Geraldes P, Gagnon S, Hadjadj S, Merhi Y, Sirois MG, Cloutier I, *et al.* Estradiol blocks the induction of CD40 and CD40L expression on endothelial cells and prevents neutrophil adhesion: an ERalpha-mediated pathway. *Cardiovascular research* 2006;71:566-573.
558. Pignatelli P, Sanguigni V, Paola SG, Lo Coco E, Lenti L, Violi F. Vitamin C inhibits platelet expression of CD40 ligand. *Free radical biology & medicine* 2005;38:1662-1666.
559. Varo N, de Lemos JA, Libby P, Morrow DA, Murphy SA, Nuzzo R, *et al.* Soluble CD40L: risk prediction after acute coronary syndromes. *Circulation* 2003;108:1049-1052.
560. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Avanzas P, Bosa-Ojeda F, Samimi-Fard S, Marrero-Rodriguez F, *et al.* Intracoronary versus intravenous abciximab administration in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing thrombus aspiration during primary percutaneous coronary intervention--effects on soluble CD40 ligand concentrations. *Atherosclerosis* 2009;206:523-527.

561. Yip HK, Chang LT, Sun CK, Yang CH, Hung WC, Cheng CI, *et al.* Impact of clopidogrel on suppression of circulating levels of soluble CD40 ligand in patients with unstable angina undergoing coronary stenting. *Am J Cardiol* 2006;97:192-194.
562. Kinlay S, Schwartz GG, Olsson AG, Rifai N, Sasiela WJ, Szarek M, *et al.* Effect of atorvastatin on risk of recurrent cardiovascular events after an acute coronary syndrome associated with high soluble CD40 ligand in the Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) Study. *Circulation* 2004;110:386-391.
563. Semb AG, van Wissen S, Ueland T, Smilde T, Waehre T, Tripp MD, *et al.* Raised serum levels of soluble CD40 ligand in patients with familial hypercholesterolemia: downregulatory effect of statin therapy. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:275-279.
564. Marx N, Imhof A, Froehlich J, Siam L, Ittner J, Wierse G, *et al.* Effect of rosiglitazone treatment on soluble CD40L in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease. *Circulation* 2003;107:1954-1957.
565. Boumpas DT, Furie R, Manzi S, Illei GG, Wallace DJ, Balow JE, *et al.* A short course of BG9588 (anti-CD40 ligand antibody) improves serologic activity and decreases hematuria in patients with proliferative lupus glomerulonephritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:719-727.
566. Grammer AC, Slota R, Fischer R, Gur H, Girschick H, Yarboro C, *et al.* Abnormal germinal center reactions in systemic lupus erythematosus demonstrated by blockade of CD154-CD40 interactions. *J Clin Invest* 2003;112:1506-1520.
567. Chakrabarti S, Varghese S, Vitseva O, Tanriverdi K, Freedman JE. CD40 ligand influences platelet release of reactive oxygen intermediates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2428-2434.
568. Chen C, Chai H, Wang X, Jiang J, Jamaluddin MS, Liao D, *et al.* Soluble CD40 ligand induces endothelial dysfunction in human and porcine coronary artery endothelial cells. *Blood* 2008;112:3205-3216.
569. Ghadge SK, Muhlstedt S, Ozcelik C, Bader M. SDF-1alpha as a therapeutic stem cell homing factor in myocardial infarction. *Pharmacol Ther* 2011;129:97-108.
570. Wyderka R, Wojakowski W, Jadczyk T, Maslankiewicz K, Parma Z, Pawlowski T, *et al.* Mobilization of CD34+CXCR4+ Stem/Progenitor Cells and the Parameters of Left Ventricular Function and Remodeling in 1-Year Follow-up of Patients with Acute Myocardial Infarction. *Mediators of inflammation* 2012;2012:564027.
571. Pearson JD. Endothelial progenitor cells - hype or hope? *J Thromb Haemost* 2009;7:255-262.
572. Zhang Y, Ingram DA, Murphy MP, Saadatzadeh MR, Mead LE, Prater DN, *et al.* Release of proinflammatory mediators and expression of proinflammatory adhesion molecules by endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;296:H1675-1682.
573. Miller-Kasprzak E, Jagodzinski PP. Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis* 2007;55:247-259.
574. Hostager BS, Bishop GA. Cutting edge: contrasting roles of TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2) and TRAF3 in CD40-activated B lymphocyte differentiation. *J Immunol* 1999;162:6307-6311.

575. Lu LF, Ahonen CL, Lind EF, Raman VS, Cook WJ, Lin LL, *et al.* The in vivo function of a noncanonical TRAF2-binding domain in the C-terminus of CD40 in driving B-cell growth and differentiation. *Blood* 2007;110:193-200.
576. Ahonen C, Manning E, Erickson LD, O'Connor B, Lind EF, Pullen SS, *et al.* The CD40-TRAF6 axis controls affinity maturation and the generation of long-lived plasma cells. *Nature immunology* 2002;3:451-456.
577. Chandel NS, Schumacker PT, Arch RH. Reactive oxygen species are downstream products of TRAF-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 2001;276:42728-42736.
578. Henn V, Steinbach S, Buchner K, Presek P, Kroczeck RA. The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood* 2001;98:1047-1054.
579. Karmann K, Hughes CC, Schechner J, Fanslow WC, Pober JS. CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:4342-4346.
580. Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Bourcier T, Bonnefoy JY, Pober JS, *et al.* Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:1931-1936.
581. Aoki J, Serruys PW, van Beusekom H, Ong AT, McFadden EP, Sianos G, *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* 2005;45:1574-1579.
582. Shirota T, He H, Yasui H, Matsuda T. Human endothelial progenitor cell-seeded hybrid graft: proliferative and antithrombogenic potentials in vitro and fabrication processing. *Tissue engineering* 2003;9:127-136.
583. Shirota T, Yasui H, Shimokawa H, Matsuda T. Fabrication of endothelial progenitor cell (EPC)-seeded intravascular stent devices and in vitro endothelialization on hybrid vascular tissue. *Biomaterials* 2003;24:2295-2302.
584. Co M, Tay E, Lee CH, Poh KK, Low A, Lim J, *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* 2008;155:128-132.
585. Krotz F, Sohn HY, Pohl U. Reactive oxygen species: players in the platelet game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1988-1996.
586. van Hinsbergh VW, Koolwijk P. Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovascular research* 2008;78:203-212.
587. Rao Q, Zheng GG, Lin YM, Wu KF. Production of matrix metalloproteinase-9 by cord blood CD34+ cells and its role in migration. *Ann Hematol* 2004;83:409-413.
588. Krenning G, van der Strate B, Schipper M, Gallego YvSX, Fernandes B, van Luyn M, *et al.* CD34(+) Cells Augment Endothelial Cell Differentiation of CD14(+) Endothelial Progenitor Cells in vitro. *J Cell Mol Med* 2008.
589. Chang HW, Leu S, Sun CK, Hang CL, Youssef AA, Hsieh YK, *et al.* Level and value of circulating endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction undergoing primary coronary angioplasty: in vivo and in vitro studies. *Transl Res* 2010;156:251-263.

590. Fasanaro P, Greco S, Ivan M, Capogrossi MC, Martelli F. microRNA: emerging therapeutic targets in acute ischemic diseases. *Pharmacol Ther* 2010;125:92-104.
591. Ohtani K, Dimmeler S. Control of cardiovascular differentiation by microRNAs. *Basic Res Cardiol* 2011;106:5-11.
592. Rupaimoole R, Han HD, Lopez-Berestein G, Sood AK. MicroRNA therapeutics: principles, expectations, and challenges. *Chin J Cancer* 2011;30:368-370.
593. Zhang Q, Kandic I, Kutryk MJ. Dysregulation of angiogenesis-related microRNAs in endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;405:42-46.

Publications et présentations

Liste des publications 2008-2012

1. **Bou Khzam L**, Hachem A, Zaid Y, Boulahya R, Mourad W, Merhi Y. Soluble CD40 ligand impairs the anti-platelet function of peripheral blood early outgrowth cells via increased production of reactive oxygen species. (*Accepté dans Thrombosis and Haemostasis*) (*Inclus dans le chapitre 6 de la thèse*)
2. **Bou Khzam L**, Abou Saleh H, Hachem A, Zaid Y, Boulahya R, Mourad W, Merhi Y. Soluble CD40 Ligand stimulates the pro-angiogenic function of early outgrowth cells by increasing matrix metalloproteinase 9 release via the p38 mitogen activated protein kinase pathway. (*Sera soumis à Biochemical and Biophysical Research Communication*) (*Inclus dans le chapitre 6 de la thèse*)
3. **Bou Khzam L**, Hachem A, Zaid Y, Boulahya R, Mourad W, Merhi Y. Differential phenotype and function of early and late endothelial progenitor cells (*En préparation*)
4. Abou-Saleh H, **Bou Khzam L**, Yacoub D, Théorêt JF, Gillis MA, Tabrizian M, Merhi Y. Essential Role of P-Selectin in Endothelial Progenitor Cells-Induced Inhibition of Platelet Aggregation and Thrombus Formation. (*En préparation*)
5. El Fakhry Y, Alturaihi H, Yacoub D, Liu L, Guo W, Leveillé C, Jung D, **Khzam LB**, Merhi Y, Wilkins JA, Li H, Mourad W. Functional Interaction of CD154 Protein with $\alpha 5\beta 1$ Integrin Is Totally Independent from Its Binding to $\alpha IIb\beta 3$ Integrin and CD40 Molecules. *Journal of Biological Chemistry* (2012) 287(22):18055-66
6. Haddad L, **Bou Khzam L**, Hajjar F, Merhi Y, Sirois MG. Characterization of FGF Receptors Expression on Human Neutrophils and their Contribution to Chemotaxis. *American Journal of Physiology* (2011) 301, C1036-1045
7. Ebermann I, Koenekoop RK, Lopez I, **Bou-Khzam L**, Pigeon R, Bolz HJ. An USH2A Founder Mutation is the Major Cause of Usher Syndrome Type 2 in Canadians of French Origin and Confirms Common Roots of Quebecois and Acadians. *European Journal of Human Genetics* (2009) 17, 80–84

Liste des présentations 2008-2012

1. 15^{ème} Journée de Recherche Annuelle de l'Institut de Cardiologie de Montréal (2012) (présentation par affiche):
Lara Bou Khzam, Ahmed Hachem, Younes Zaid, Walid Mourad, Yahye Merhi
Soluble CD40 Ligand Reverses the Inhibitory Effect of Early Endothelial Progenitor Cells on Platelet Aggregation
2. ATVB 2012 (Chicago, É-U) (présentation par affiche):
Lara Bou Khzam, Ahmed Hachem, Younes Zaid, Walid Mourad, Yahye Merhi
Soluble CD40 Ligand Reverses the Inhibitory Effect of Early Endothelial Progenitor Cells on Platelet Aggregation
3. ATVB 2012 (Chicago, É-U) (présentation par affiche):
Lara Bou Khzam, Haitham Abou-Saleh, Ahmed Hachem, Younes Zaid, Walid Mourad, Yahye Merhi
Soluble CD40 Ligand stimulates the Pro-Angiogenic Function of Early Endothelial Progenitor Cells by Increasing Matrix Metalloproteinase 9 Release via the p38 Mitogen Activated Protein Kinase Pathway
4. 14^{ème} Journée de Recherche Annuelle de l'Institut de Cardiologie de Montréal (2012) (présentation orale):
Lara Bou Khzam, Ahmed Hachem, Younes Zaid, Daniel Yacoub, Jean-François Théorêt, Maryam Tabrizian, Walid Mourad, Yahye Merhi
Role of the CD40L/CD40 axis in endothelial progenitor cell (EPC) function
5. Congrès Canadien sur la Santé Cardiovasculaire (Montréal 2010) (présentation par affiche):
Lara Bou Khzam, Ahmed Hachem, Daniel Yacoub, Jean-François Théorêt, Maryam Tabrizian, Walid Mourad, Yahye Merhi
Differential Responses of Early and Late Endothelial Progenitor Cells to sCD40L
6. 13^{ème} Journée de Recherche Annuelle de l'Institut de Cardiologie de Montréal (2012) (présentation par affiche):
Lara Bou Khzam, Ahmed Hachem, Daniel Yacoub, Jean-François Théorêt, Maryam Tabrizian, Walid Mourad, Yahye Merhi
Characterization and Function of the CD40/CD40L axis in Endothelial Progenitor Cells
7. Centre for Biorecognition and Biosensors (CBB) McGill University Annual General Assembly and Student Workshop 2009 (présentation par affiche):
Lara Bou Khzam, Haitham Abou Saleh, Jean-François Théorêt, Maryam Tabrizian, Yahye Merhi
Comparative Study of Different Subtypes of Peripheral Blood Circulating Mononuclear Cells and their Potential to Form Endothelial Progenitor Cells

8. 12^{ème} Journée de Recherche Annuelle de l'Institut de Cardiologie de Montréal (2012)
(présentation par affiche):

Lara Bou Khzam, Haitham Abou-Saleh, Jean-François Théorêt, Maryam Tabrizian,
Yahye Merhi

*Comparative Study of Different Subtypes of Peripheral Blood Circulating Mononuclear
Cells and their Potential to Form Endothelial Progenitor Cells*