

AIX-MARSEILLE UNIVERSITE
FACULTE DE PHARMACIE DE MARSEILLE
ECOLE DOCTORALE : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

THESE

Présentée et publiquement soutenue devant
LA FACULTE DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Le vendredi 21 décembre 2012

Par Gabrielle SARLON-BARTOLI

Née le 16 septembre 1979 à Marseille (Bouches-du-Rhône)

OUTILS DIAGNOSTIQUE ET THERAPEUTIQUE INNOVANTS DE LA DYSFONCTION VASCULAIRE AU COURS DES MALADIES ARTERIELLES PERIPHERIQUES

Pour obtenir le grade de DOCTORAT d'AIX-MARSEILLE UNIVERSITE

SPECIALITE : PHYSIOLOGIE VASCULAIRE

Membres du jury :

Pr Florence SABATIER	Directeur
Pr Pierre-Edouard MAGNAN	Président
Pr Anne LONG	Rapporteur
Pr Philippe NGUYEN	Rapporteur
Pr Françoise DIGNAT-GEORGE	Examineur
Pr Reda HASSEN-KHODJA	Examineur

TABLE DES MATIERES

1.	INTRODUCTION : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	8
1.1.	Les maladies artérielles périphériques : généralités	8
1.1.1.	Définition et épidémiologie	8
1.1.2.	Physiopathologie de l'athérosclérose	10
1.1.2.1.	Historique	10
1.1.2.2.	Artère normale	11
1.1.2.3.	Lésions d'athérosclérose	15
1.1.2.4.	Dysfonction vasculaire et dysfonction endothéliale	21
1.1.3.	Facteurs de risque cardiovasculaire	22
1.1.4.	Bases communes de la prise en charge diagnostique et thérapeutique des maladies artérielles périphériques	25
1.2.	Marqueurs de dysfonction vasculaire comme outil diagnostique innovant des sténoses carotidiennes à risque	29
1.2.1.	Sténose carotidienne : généralités	29
1.2.1.1.	Définition et épidémiologie	29
1.2.1.2.	Histoire naturelle de la sténose carotidienne : risque neurologique	31
1.2.1.3.	Traitement chirurgical : techniques et indications actuelles	34
1.2.2.	Problématique actuelle : indications de la chirurgie carotidienne chez les patients asymptomatiques 37	
1.2.3.	La plaque carotidienne instable ou vulnérable	39
1.2.3.1.	Définition et classification	39
1.2.3.2.	Marqueurs actuels biologiques et d'imagerie de la plaque carotidienne instable	43
1.2.3.2.1.	Marqueurs biologiques	43
1.2.3.2.2.	Marqueurs d'imagerie	45
1.2.4.	Microparticules leucocytaires comme biomarqueur original de la plaque carotidienne instable	49
1.2.4.1.	Définition des microparticules	49
1.2.4.2.	Les microparticules leucocytaires	52
1.2.4.3.	Microparticule leucocytaires comme effecteur de la plaque d'athérosclérose	55
1.2.4.4.	Techniques de dosage	56

1.2.4.5.	Microparticule leucocytaires comme marqueur des maladies cardiovasculaires	58
1.2.5.	Lipoprotéine Phospholipase A2 comme biomarqueur original de la plaque carotidienne instable.....	60
1.2.5.1.	Définition de la Lipoprotéine Phospholipase A2	60
1.2.5.2.	LpPLA2 comme effecteur de la plaque d'athérosclérose.....	61
1.2.5.3.	Techniques de dosage	63
1.2.5.4.	LpPLA2 comme marqueur des maladies cardiovasculaires.....	64
1.3.	La dysfonction vasculaire comme cible de stratégies thérapeutiques innovantes de l'ischémie critique des membres inférieurs.....	67
1.3.1.	Ischémie critique des membres inférieurs : généralités	67
1.3.1.1.	Définition et épidémiologie.....	67
1.3.1.2.	Etat des lieux de la prise en charge actuelle et limites	70
1.3.2.	Angiogenèse et progéniteurs endothéliaux circulants comme outils de réparation et de régénération de l'endothélium : éléments de physiopathologie.....	74
1.3.2.1.	Vasculogenèse et angiogenèse embryonnaires	74
1.3.2.2.	Concept de vasculogenèse adulte	75
1.3.2.3.	Origine des PECs	76
1.3.2.4.	Mécanismes de mobilisation et de recrutement des PECs	77
1.3.2.5.	Hétérogénéité et nomenclature des PECs.....	80
1.3.3.	Angiogenèse thérapeutique : thérapie génique et cellulaire.....	83
1.3.3.1.	Thérapie génique.....	84
1.3.3.2.	Thérapie cellulaire	86
1.3.4.	Stratégie d'optimisation de la thérapie cellulaire par PECs : la stimulation <i>ex vivo</i>	89
1.3.4.1.	Principe.....	89
1.3.4.2.	Modèles pré-cliniques	90
1.3.4.3.	Molécules pro-angiogéniques	93
2.	TRAVAUX PERSONNELS	96
2.1.	Objectifs.....	96
2.2.	Marqueurs de dysfonction vasculaire comme outil diagnostique innovant des sténoses carotidiennes à risque	98
2.2.1.	Manuscrit 1 : Le taux plasmatique de microparticules leucocytaires dépiste les plaques instables des patients asymptomatiques porteurs d'une sténose carotidienne serrée.....	98

2.2.2. Manuscrit 2 : Taux plasmatique de Lipoprotéine phospholipase A2 chez les patients porteurs d'une sténose carotidienne serrée : nouveau biomarqueur pour prédire une plaque instable.....	118
2.1. La dysfonction vasculaire comme cible de stratégies thérapeutiques innovantes de l'ischémie critique des membres inférieurs.....	127
3. DISCUSSION	144
3.1. Les microparticules leucocytaires et la lipoprotéine phospholipase A2 sont deux biomarqueurs innovants pour dépister les patients porteurs d'une sténose carotidienne à risque.	144
3.2. Le prétraitement des progéniteurs endothéliaux tardifs par de l'érythropoïétine augmente leur potentiel angiogénique dans un modèle murin d'ischémie de patte.	149
4. PERSPECTIVES.....	153
4.1. La sténose carotidienne à risque du sujet asymptomatique	153
4.2. L'optimisation de la thérapie cellulaire dans l'ischémie critique des membres inférieurs.....	157

ABBREVIATIONS

ACAS : The **A**symptomatic **C**arotid **A**therosclerosis **S**tudy

ACST : **A**symptomatic **C**arotid **S**urgery **T**rial

AHA : **A**merican **H**eart **A**ssociation

AOMI : **A**rtériopathie **o**blitérante des **m**embres **i**nférieurs

AP-HM : **A**ssistance **P**ublique **H**ôpitaux de **M**arseille

AVC : **A**ccident **v**asculaire **c**érébral

CAC : **C**irculating **A**ngiogenic **C**ells

CAM : **M**olécule d'adhésion **c**ellulaire

CECs : **C**irculating **E**ndothelial **C**ells

CML : **C**ellules **m**usculaires **l**isses

CFU-EC : **C**olony-**F**orming **U**nit-**E**ndothelial **C**ells

CRP-us : **C**-**R**eactive **P**rotein ultrasensible

CSM : **C**ellules **S**ouches **M**ésenchymateuses

ECFCs : **E**ndothelial **C**olony **F**orming **C**ells

EC-like cells : **E**ndothelial **C**ells-like cells **EOCs** (**E**ndothelial **O**utgrowth **C**ells)

ECST : **E**uropean **C**arotid **S**ymptomatic **T**rial

EOCs : **E**ndothelial **O**utgrowth **C**ells

EPO : **E**rythropoïétine

EPOR : **EPO** **R**eceptor

FDRCV : **F**acteurs de risque **c**ardio**v**asculaire

FGF : **F**ibroblast **G**rowth **F**actor

G-CSF : **G**ranulocyte-**C**olony **S**timulating **F**actor

GSM : **G**ayscale **M**edian

HTA : **H**ypertension **a**rtérielle

ICAM-1 : Molécule d'Adhésion InterCellulaire

IL : Interleukine

ISTH : International Society of Thrombosis and Hemostasis

LDL : Low Density Lipoprotein

Lp-PLA2 : Lipoprotéine Phospholipase A2

Lyso PC : Lysophosphatidylcholine

MAPC : Multipotent Adult Progenitor Cells

MMP : Métalloprotéase matricielle

MP : Microparticules

MPL : Microparticules Leucocytaires

NASCET : North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial

PAF : Platelet Activating Factor

PAF-AH : Platelet Activating Factor-Acetylhydrolase

PAPP-A : Pregnancy-Associated Plasma Protein A

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells

PEC : Progéniteurs endothéliaux circulants

REACH : Reduction of Atherothrombosis for Continued Health

SDF-1 : Stroma cell-Derived Factor-1

SRA : Système Rénine-Angiotensine-aldostérone

TASC : TransAtlantic Inter-Society Consensus

TIMP : Tissue Inhibitor of Metalloprotease

TNF : Tumor Necrosis Factor

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR2 : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2

RESUME

Les maladies artérielles périphériques athéromateuses sont fréquentes et graves. Elles engagent le pronostic fonctionnel et vital des patients : l'atteinte des troncs supra-aortiques est à risque d'accident vasculaire cérébral et l'atteinte des artères des membres inférieurs est à risque d'amputation et de décès cardiovasculaire. Le développement de stratégies innovantes capables d'optimiser le diagnostic précoce et la prise en charge thérapeutique de ces maladies est ainsi un enjeu considérable.

Dans ce travail, nous montrons une corrélation entre deux biomarqueurs inflammatoires, les microparticules leucocytaires et la lipoprotéine phospholipase A2, et l'instabilité de la plaque carotidienne définie histologiquement, dans une population de patients porteurs d'une sténose carotidienne serrée avec ou sans symptômes neurologiques. Les microparticules leucocytaires sont élevées de façon significative et indépendante y compris chez les patients asymptomatiques porteurs d'une sténose carotidienne serrée instable. Ainsi, le taux circulant de microparticules leucocytaires pourrait être un outil dans l'avenir pour sélectionner les meilleurs candidats à une chirurgie carotidienne préventive parmi les patients ayant une sténose carotidienne serrée asymptomatique.

Deuxièmement, nous montrons que l'administration *ex vivo* d'érythropoïétine améliore les capacités proangiogéniques des progéniteurs endothéliaux circulants tardifs *in vitro* et *in vivo* sur un modèle d'ischémie de patte de souris nude. Ces effets semblent médiés par la sous-unité CD131 du récepteur à l'érythropoïétine. Si ces résultats se confirment chez l'homme, l'érythropoïétine pourrait être utilisée pour améliorer les capacités de revascularisation des progéniteurs endothéliaux circulants tardifs circulants humains avant réinjection autologue comme produit de thérapie cellulaire chez des patients atteints d'ischémie critique des membres inférieurs.

ABSTRACT

Atherosclerotic peripheral arterial diseases are frequent and severe. They undertake the functional and vital prognosis of patients: lesions of supra-aortic trunks are at risk of stroke and lesions of lower limb arteries are at risk of amputation and cardiovascular death. The development of innovative strategies that optimize early diagnosis and therapeutic management of these diseases is thus a considerable challenge.

In this work, we show a correlation between inflammatory biomarkers, leukocyte microparticles and lipoprotein phospholipase A2, and carotid plaque instability defined histologically, in a population of patients with tight carotid stenosis with or without neurological symptoms. Leukocyte microparticles are elevated significantly and independently including asymptomatic patients with tight unstable carotid stenosis. Thus, the circulating levels of leukocyte microparticles could be a tool in the future to select the best candidates for carotid surgery among patients with asymptomatic carotid stenosis tight.

Second, we show that *ex vivo* administration of erythropoietin improves the proangiogenic capacity of late circulating endothelial progenitor *in vitro* and *in vivo* in a mouse model of hindlimb ischemia. These effects appear mediated by CD131 subunit of the receptor for erythropoietin. If these results are confirmed in humans, erythropoietin could be used to improve the revascularization capacity of late circulating endothelial progenitor before reinjection as autologous cell therapy product in patients with critical ischemia of the lower limbs.

1. INTRODUCTION : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Les maladies artérielles périphériques : généralités

1.1.1. Définition et épidémiologie

On regroupe sous le terme de « maladies cardiovasculaires » : les atteintes coronaires et les atteintes artérielles périphériques, liées à l'athérosclérose. Ainsi, les maladies artérielles périphériques sont définies comme toute pathologie artérielle athéromateuse non coronaire (1).

Elles regroupent :

- Les artériopathies des troncs supra-aortiques et les artériopathies oblitérantes des membres inférieurs (AOMI), qui sont les plus fréquentes et qui seront abordées dans ce travail
- Plus rarement : les artériopathies des membres supérieurs, et les artériopathies digestives et rénales

Les maladies cardiovasculaires restent aujourd'hui un enjeu majeur de santé publique de par leur fréquence, leur gravité et leur poids économique important. Leur incidence est très difficile à quantifier à l'échelle internationale et nationale du fait de leur diversité et de leur expression longtemps infraclinique, mais elle est en augmentation dans tous les pays y compris les pays en voie de développement. Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de décès dans le monde (17,3 millions en 2008) et la deuxième cause de décès en France après les cancers (2). En effet en France en 2004, 152 708 décès étaient dus à des tumeurs (soit 30% des décès) et 147 323 étaient dus aux maladies cardiovasculaires (soit 28,9%). Parmi les maladies cardiovasculaires, les maladies

artérielles périphériques étaient responsables de 73% des décès (soit 21% de l'ensemble des décès de la population française) avec une prédominance masculine (ratio homme/femme 1,4). Comme le montre le registre REACH "Reduction of Atherothrombosis for Continued Health", la moitié des patients ayant une maladie cardiovasculaire présente une atteinte artérielle périphérique. Il s'agit d'un registre international de 44 pays qui a étudié le devenir de plus de 68000 patients âgés de plus de 45 ans ayant une maladie cardiovasculaire avérée ou plus de 3 facteurs de risque cardiovasculaires. En France, 713 médecins investigateurs ont sélectionné 3 514 patients (3). Parmi ces patients, 2 373 (68 %) avaient une maladie coronaire documentée, 778 (22 %) avaient une maladie ischémique cérébrovasculaire et 923 (26 %) avaient une AOMI documentée. Toujours d'après REACH, la gravité des maladies cardiovasculaires augmente avec le nombre de localisations athéromateuses. Un quart des coronariens, un tiers des patients avec atteinte cérébrovasculaire et la moitié des artéritiques avaient une autre localisation athérothrombotique. Le taux de décès cardiovasculaire à 1 an était fonction du nombre de localisations athérothrombotiques : 1,8 % s'il existait une seule localisation athérothrombotique et 4,1 % s'il y avait 2 ou 3 localisations athérothrombotiques. Ainsi, la maladie athéromateuse est une maladie multifocale dont le site le plus fréquemment atteint sont les artères coronaires, dont le site de plus mauvais pronostic sont les artères des membres inférieurs, et dont la gravité augmente avec le nombre de sites artériels touchés.

De part cette fréquence et l'allongement de la durée de vie, les maladies cardiovasculaires ont un cout financier important. Pour illustrer cela, une étude récente issue du registre REACH a colligé et comparé le cout à deux ans des hospitalisations pour évènements cardiovasculaires et pour procédures de revascularisation, dans deux pays européen, la France et l'Allemagne, et ceux en fonction du territoire artériel touché (4). Il en est ressorti que le groupe de patient avec le cout le

plus élevé est celui des AOMI (3182,1 euros en France et 2724,4 euros en Allemagne) et que le groupe de patient avec le cout le plus bas est celui des patients aux facteurs de risque cardiovasculaire multiples mais sans maladies cardiovasculaires avérées (749,1 euros en France et 503,3 euros en Allemagne). Ainsi non seulement le cout financier est élevé mais il augmente en fonction du type d'atteinte artérielle, l'atteinte des membres inférieurs étant la plus grave et témoignant d'une diffusion avancée de la maladie athéroscléreuse.

1.1.2. Physiopathologie de l'athérosclérose

1.1.2.1. Historique

Les premières descriptions anatomopathologiques détaillées et explicatives de la lésion artérielle responsable d'une nécrose myocardique datent du milieu de XIX^{ème} siècle par Carl von Rokitansky (Vienne) et Rudolf Virchow (Berlin), ils établirent définitivement la distinction entre plaque coronaire et coronarite syphilitique. La lésion fut d'abord dénommée athérome (*Atheroma*) à cause de sa ressemblance avec un abcès (du grec *athéré*, bouillie). Beaucoup plus tard en 1904, Felix Marchand utilisa le terme athérosclérose (*Athéroskléros*) qui est aujourd'hui consacré car il fait explicitement référence aux deux composantes de la plaque d'athérome, le « cœur lipidique », enchâssé dans une gangue fibreuse, la « chape fibreuse » (du grec *skléros*, dur). En 1957, l'athérosclérose fut définie par l'Organisation Mondiale de la Santé comme une « association variable de remaniements de l'intima des artères, de complexes glucidiques, de sang et de produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôts calciques, l'ensemble associé à des modifications de la média ».

Les conceptions étiopathogéniques de l'athérosclérose, bien qu'elles n'aient toujours pas été résolues entièrement, gagnent à être considérées sous leur angle historique. L'effraction endothéliale comme *primum movens* de l'athérogenèse a été introduite par Russel Ross en 1976 : il proposait pour la première fois la notion de traumatisme endothélial avec thrombose réactionnelle comme point de départ obligé du développement de la plaque d'athérome et ce dogme a vécu pendant de longues années (5). D'autres théories se sont succédées : la théorie lipidique selon laquelle le cholestérol est l'agent causal majeur de l'athérosclérose, la théorie infectieuse selon laquelle des phénomènes infectieux notamment une bactérie, *Chlamydiae pneumoniae*, puissent jouer un rôle moteur dans l'évolution tardive de la maladie coronaire, et même la théorie tumorale selon laquelle les cellules de la plaque seraient les cellules filles d'une même cellule mère monoclonale qui aurait subi une mutation permettant sa prolifération. Ces théories ont peu à peu convergé vers la notion d'activation endothéliale en référence à l'activation macrophagique, qui souligne l'importance de la réaction inflammatoire dans les processus athéromateux (6). En effet, des preuves expérimentales fortes ont été apportées pour penser que le processus athéromateux démarre par l'activation des cellules endothéliales avec expression de chimiokines et de molécules d'adhérence leucocytaire à l'origine de la margination et du recrutement des monocytes circulants (7).

1.1.2.2. Artère normale

Le système artériel permet de transporter le flux sanguin pulsatile à haute pression en provenance du cœur, en un flux régulier à basse pression destiné aux artères de gros, moyen et petit calibre jusqu'aux capillaires. La structure des artères est de deux types : élastique pour l'aorte et l'origine des gros troncs, et musculaire pour les artères plus distales.

- Structure :

La paroi est organisée en trois tuniques concentriques morphologiquement distinctes dénommées respectivement de la lumière vers l'extérieur des artères : intima, média et adventice (**Figure 1**) :

1. **L'intima** est une monocouche de cellules endothéliales directement en contact avec le flux sanguin et étroitement jointes reposant sur une couche sous-endothéliale. Cette dernière est constituée d'une matrice extracellulaire acellulaire chez le nouveau-né qui s'épaissit au cours du vieillissement artériel pour comporter des macrophages et des lymphocytes. L'intima est séparée de la média par **la limitante élastique interne** faite de fibres élastiques.
2. **La média** est constituée de cellules musculaires lisses (CML) situées dans une matrice extracellulaire faite de collagènes, d'élastine et de protéoglycanes. Elle assure les propriétés hémodynamiques de la paroi artérielle de contraction et de dilatation. La média est séparée de l'adventice par **la limitante élastique externe**.
3. **L'adventice** est formée d'un tissu conjonctif lâche fait de fibroblastes et de protéoglycanes. Elle a pour rôle de fixer l'artère aux organes environnants. Elle contient des nerfs et des vaisseaux nourriciers, les vasa vasorum, qui irriguent la partie externe de la média.

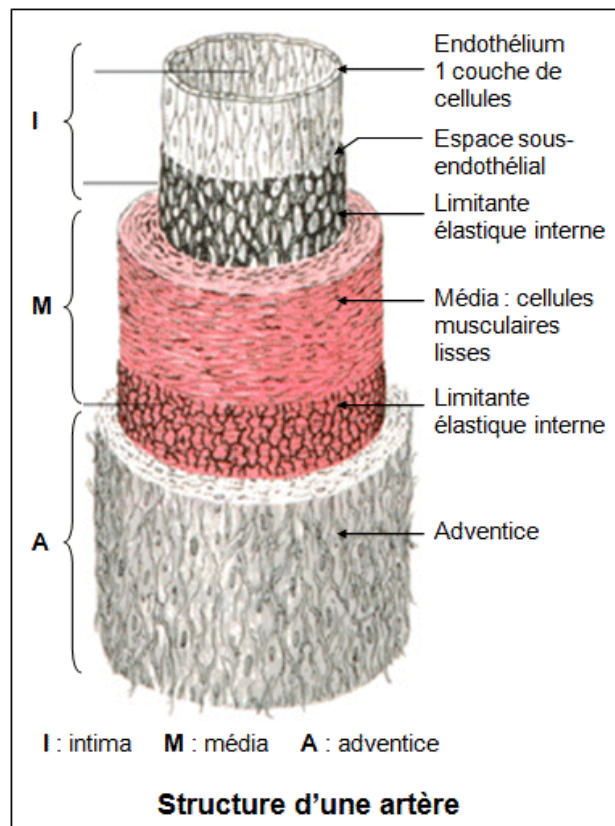


Figure 1 : structure de la paroi artérielle normale, d'après l'ouvrage de J. Léoni intitulé « Physiopathologie de l'athérosclérose »

- Composants cellulaires :

Les cellules endothéliales et les CML sont les principaux types cellulaires de la paroi artérielle (8). Elles participent à la synthèse des différents composants de la matrice extracellulaire : collagènes, élastine, protéoglycanes et glycoprotéines.

1. Les cellules endothéliales ont un rôle majeur dans les échanges et le maintien de l'homéostasie artérielle. L'endothélium à l'état quiescent est ainsi perméable à divers nutriments et macromolécules plasmatiques, par exemple : les lipoprotéines, les immunoglobulines, le fibrinogène... Les cellules endothéliales assurent aussi une activité antithrombotique : la surface luminale est recouverte de

glycocalix dont les charges électronégatives limitent l'adhésion des monocytes et des plaquettes. Elles inhibent aussi l'activation et l'agrégation plaquettaire en synthétisant la prostacycline, l'EDRF « Endothelium-Derived Relaxing Factor » et l'adénosine diphosphate. Elles expriment et synthétisent des inhibiteurs de la coagulation telle que la thrombomoduline. Enfin elles sont capables de sécréter de nombreuses cytokines en réaction à une agression inflammatoire ou immune.

2. Les CML assurent le tonus vasculaire et entretiennent la composition de la matrice extracellulaire. Elles existent sous deux phénotypes : contractile ou sécrétoire. Les CML sécrétoires ont l'apparence de fibroblastes et synthétisent les composants nombreux de la matrice extracellulaire ainsi que des facteurs de croissance et des cytokines. Au cours du développement, la média des artères fœtales est tout d'abord très riche en CML de type sécrétoire puis évoluent vers un phénotype contractile. Elles sont alors riches en myofilaments et, en se contractant, régulent la pression artérielle.
3. Les macrophages sont distribués de façon irrégulière dans l'intima des artères. Ils synthétisent de nombreuses molécules (métalloprotéases, facteurs de croissance, facteurs chimiotactiques et certains constituants de la matrice). Ils interviennent dans le métabolisme des lipoprotéines et jouent un rôle protecteur d'« éboueur » en phagocytant les cellules mortes, les LDL (Low Density Lipoprotein) modifiées, les thrombi muraux et les bactéries. Enfin, ils ont un rôle déterminant dans la réponse immunitaire et inflammatoire.

- **Matrice extracellulaire :**

Elle constitue le milieu que vont traverser tous les éléments nutritifs et les cellules en migration. C'est aussi un lieu d'accumulation des produits de sécrétion et des débris cellulaires. Elle est constituée de quatre types de protéine sécrétées par les cellules endothéliales et les CML : le collagène renforce la résistance des parois vasculaires, les glycoprotéines assurent la cohésion entre les cellules et les composants matriciels, les protéoglycanes participent à la cohésion et régulent l'équilibre ionique de l'intima, et l'élastine qui assure la solidité et la souplesse de l'artère. Le renouvellement et la restructuration de la matrice sont assurés par des enzymes sécrétées en partie par les macrophages, les métalloprotéases, qui assurent un équilibre entre synthèse et dégradation de la matrice extracellulaire.

1.1.2.3. Lésions d'athérosclérose

Les processus clés de l'athérosclérose sont représentés par l'épaississement de l'intima et l'accumulation intinale de lipides entraînant des plaques athéromateuses caractéristiques (9). Ces plaques font saillie dans la lumière et fragilisent la média sous-jacente. Elle touche surtout les artères élastiques (l'aorte, les artères carotides et iliaques) et les grosses et moyennes artères musculaires (artères coronaires et poplitées). La maladie débute dans l'enfance mais les symptômes cliniques ne deviennent évidents qu'à l'âge adulte.

- Stries lipidiques (**Figure 2**) :

Elles sont les précurseurs du développement de plaque d'athérosclérose. Elles débutent sous formes de points jaunes aplatis de moins de 1mm de diamètre dont la coalescence entraîne la formation de véritables stries allongées de 1cm ou plus. Elles sont composées de macrophages chargés en lipides dits « spumeux » et de lymphocytes T. Elles font une petite saillie dans la lumière artérielle mais n'entraînent pas d'anomalies du flux sanguin. Elles apparaissent chez certains avant l'âge de un an et sont présentes chez tous les enfants de plus de dix ans quelle que soit leur origine géographique, leur origine ethnique, leur sexe et leur condition environnementale.

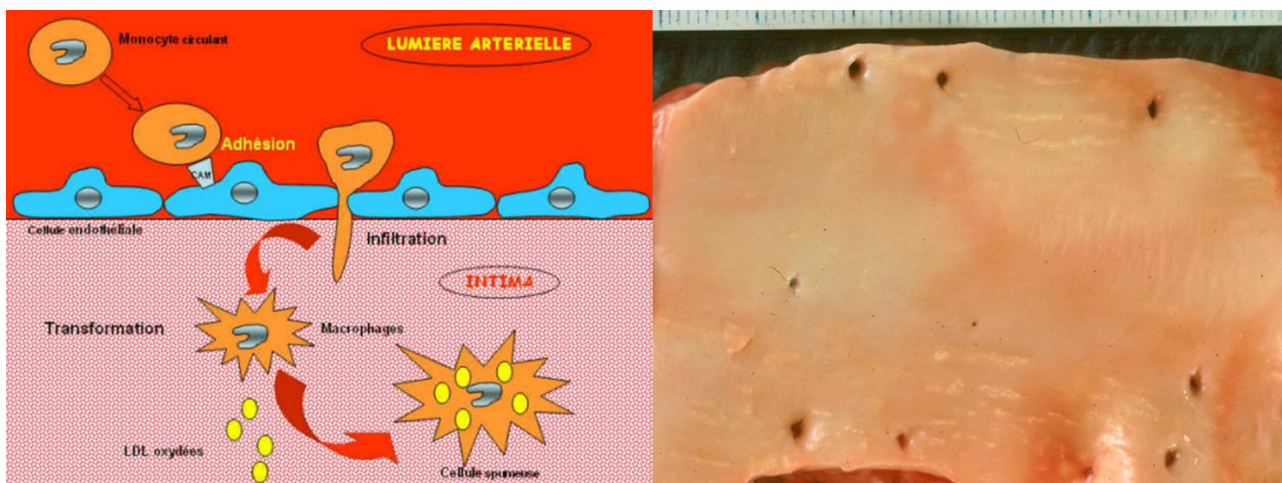


Figure 2 : stries lipidiques : à droite, l'aspect macroscopique sur la face luminale de l'artère d'après une photographie du Pr P. Bruneval ; à gauche, le schéma de l'oxydation des LDL et de la dysfonction endothéliale responsable du passage des monocytes dans l'espace sous-endothélial d'après l'ouvrage du Collège des Enseignants de Médecine Vasculaire « Polycopié de préparation à l'examen national classant ». CAM : Molécule d'adhésion cellulaire.

- Plaque d'athérosclérose :

La formation de la plaque est un phénomène lent et progressif. De nombreux facteurs participent à sa constitution avec un rôle déterminant joué par les lipoprotéines plasmatiques, notamment les LDL. La plaque est composée de trois éléments : les cellules (CML, macrophages et lymphocytes), la matrice extracellulaire de tissu conjonctif, et les dépôts lipidiques intra et extra cellulaires. Les étapes de la formation de la plaque sont les suivantes :

1. La pénétration et l'accumulation du LDL-cholestérol dans l'espace sous-endothélial est la première phase. Il s'agit d'un phénomène passif d'autant plus important que les concentrations plasmatiques en LDL-cholestérol sont élevées.
2. Les particules de LDL-cholestérol subissent des modifications oxydatives avec formation de LDL oxydées.
3. La présence des LDL oxydées dans l'intima participe à l'activation de l'endothélium appelée aussi « dysfonction » et qui se manifeste par l'expression de molécule d'adhésion leucocytaire. Les monocytes sanguins adhèrent ainsi à l'endothélium, s'accumulent dans l'espace sous-endothélial et sous l'effet de différentes cytokines se transforment en macrophages. Ces macrophages captent les particules de LDL oxydées et forment des cellules spumeuses (**Figure 2**).
4. Les cellules spumeuses et les dépôts lipidiques extracellulaires s'accumulent et s'organisent par confluence en un centre lipidique. Parallèlement s'individualise une structure superficielle, la chape fibreuse, composée de CML issues de la média et de tissu conjonctif dense (**Figure 3**). Ces CML ont subi dans la média un changement de phénotype pour devenir sécrétoire, migrent vers l'espace sous-endothélial, y prolifèrent et y produisent de grandes quantités de matrice extracellulaire. La chape

fibreuse joue ainsi un rôle critique dans la solidité de la plaque en isolant du courant sanguin les éléments thrombogènes du cœur lipidique. En fonction de l'importance de la chape fibreuse et du cœur lipidique, on parle de plaque fibreuse, fibrolipidique ou lipidique.

Ainsi formée, la plaque soulève l'intima et fait saillie dans la lumière artérielle. La localisation des plaques d'athérome est caractéristique chez l'homme, elles prédominent au niveau de l'aorte abdominale et au niveau des bifurcations des artères de gros et moyens calibres. Les plaques atteignent généralement qu'une partie de la circonférence artérielle et sont dispersées de façon variable sur l'ensemble de l'arbre artériel.

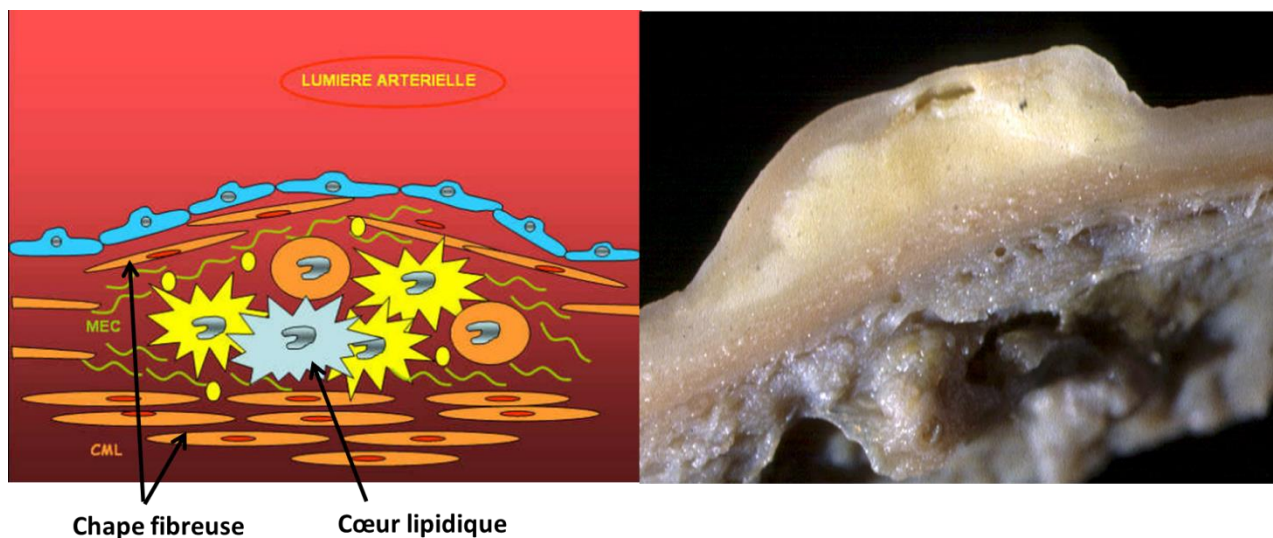


Figure 3 : plaque d'athérosclérose : à droite, l'aspect macroscopique d'une plaque d'athérosclérose sur une section transversale d'une artère pathologique d'après une photographie du Pr P. Bruneval ; à gauche, le schéma de la plaque avec une cœur lipidique fait de LDL oxydées, de macrophages et de cellule spumeuses, et une chape fibreuse faite de cellules musculaires lisses et de matrice extracellulaire d'après l'ouvrage du Collège des Enseignants de Médecine Vasculaire

« Polycopié de préparation à l'examen national classant ». CAM : Molécule d'adhésion cellulaire.

CML : cellule musculaire lisse ; MEC : matrice extracellulaire.

- Classification des lésions d'athéroscléroses (cf paragraphe 1.2.3.1)

- Croissance de la plaque et remodelage vasculaire :

L'infiltration progressive des LDL oxydées, la réaction de sclérose avec prolifération des CML, la production de matrice extracellulaire, et la réaction inflammatoire chronique vont lentement faire croître le volume de la plaque. Il existe aussi des phases de croissance par à-coups qui correspondent à des réactions thrombotiques à bas bruit avec incorporation silencieuse de plusieurs strates de thrombus d'âges différents. Par le phénomène de remodelage vasculaire (**Figure 4**), il n'existe pas de parallélisme entre l'augmentation de volume de la plaque et le retentissement sur la lumière artérielle (10). En effet, un remodelage excentrique de la paroi de l'artère peut compenser l'augmentation de volume de la plaque. Au début, la croissance de la plaque est totalement compensée par l'augmentation du calibre du vaisseau et aucun rétrécissement de la lumière n'est détectable. A un certain stade, le phénomène de remodelage vasculaire est dépassé et l'augmentation de la plaque provoque un rétrécissement de la lumière. Il peut exister aussi d'emblée un remodelage concentrique qui pour une plaque même minime pourra provoquer une sténose de l'artère du fait du rétrécissement excessif de la paroi artérielle en réponse à l'infiltration athéromateuse.

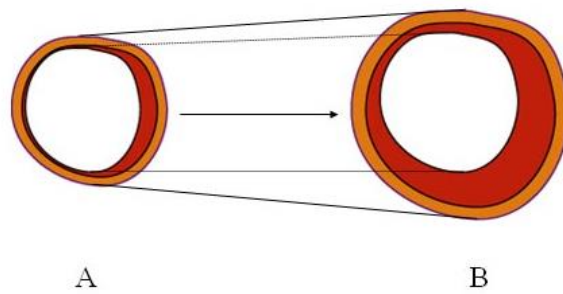


Figure 4 : remodelage vasculaire excentrique ou positif : A : artère normale ; B : remodelage excentrique avec augmentation du calibre de l'artère pour compenser l'augmentation du volume de la plaque, le calibre de la lumière est identique entre les deux, d'après l'ouvrage du Collège des Enseignants de Cardiologie et Maladies Vasculaires.

- Complications :

A un moment donné de l'évolution de la plaque vont pouvoir se produire une hémorragie intraplaque ou une vraie ulcération qui fragilisent la plaque et conduisent à une rupture de la chape fibreuse protectrice (11). Les éléments du centre lipidique sont ainsi en contact direct avec le courant sanguin. Le processus de thrombose s'initie et donne lieu soit à une croissance de la plaque avec sténose de l'artère si la thrombose est partielle, soit à une vraie occlusion si la thrombose est totale. La thrombose peut libérer des débris dans le courant sanguin et provoquer aussi des embolies. Cette cascade d'événements donne lieu à une manifestation clinique sous la forme d'un accident aigu athérothrombotique.

1.1.2.4. Dysfonction vasculaire et dysfonction endothéliale

Longtemps considéré comme une monocouche de cellules tapissant l'arbre vasculaire, l'endothélium est reconnu aujourd'hui comme une interface dynamique, capable de répondre à des contraintes physiques mais aussi à des stimulations autocrines ou paracrine résultant d'interactions avec des cellules et des molécules circulantes. Cette capacité de l'endothélium à s'adapter aux conditions physiologiques le rend aussi particulièrement sensible aux modifications pathologiques. Ainsi, selon la théorie de la réponse à la lésion de Russel Ross, les atteintes mécaniques ou l'exposition chronique de l'endothélium à des facteurs de risque altèrent les propriétés de régulation de l'endothélium, qui va progressivement évoluer vers une activation pro-inflammatoire, une sénescence et une apoptose (7). Ainsi, l'endothélium stimulé s'engage dans un spectre complexe de réponses délétères regroupées sous le terme de « dysfonction endothéliale » qui participent à la perte de son intégrité et à qui correspond à l'étape la plus précoce du développement de l'athérosclérose.

La dysfonction vasculaire est un terme plus général et correspond à une anomalie de fonctionnement de l'ensemble de la paroi vasculaire : les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les macrophages, la matrice extra-cellulaire.

1.1.3. Facteurs de risque cardiovasculaire

D'une façon générale, le risque de développer une maladie cardiovasculaire donnée peut varier en fonction de la présence ou de l'absence de caractéristiques individuelles (âge, sexe, profil biologique et génétique...) et socio-économiques ou environnementales (12). Ces facteurs de risque cardiovasculaire (FDRCV) sont variés et leur contrôle est devenu la pierre angulaire de la prise en charge des maladies athéromateuses grâce à l'institution d'actions de prévention tant primaire (dans la population générale) que secondaire (chez les patients à risque au décours d'une manifestation clinique). La découverte de FDRCV découle d'enquêtes transversales observationnelles, et rétrospectives. Des enquêtes prospectives ont aussi été réalisées en particulier en tentant de modifier les FDRCV par la thérapeutique et/ou la nutrition. Des mesures de dépistage ont été entreprises sous l'égide des sociétés savantes avec pour conséquence de pratiquer un dépistage biologique systématique selon l'âge et le sexe, et plus précocement pour les familles et sujets à haut risque (FDRCV génétiques transmissibles).

Les FDRCV prédisposants non modifiables reconnus actuellement sont au nombre de trois (13) :

- L'âge : l'incidence des maladies cardiovasculaires augmente avec l'âge de façon quasi exponentielle. La plupart des décès par maladies cardiovasculaires surviennent chez les personnes âgées.
- Le sexe : le sexe masculin prédispose aux maladies cardiovasculaires; les femmes seraient protégées jusqu'à la ménopause. Les œstrogènes sont des agents protecteurs, peut-être par un effet direct sur l'intima des artères atténuant la progression de l'athérosclérose ; c'est d'ailleurs un des effets recherchés par la thérapeutique hormonale substitutive post-

ménopause, à condition d'en respecter les contre-indications. À l'inverse, la contraception oestro-progestative augmente le risque en diminuant les concentrations d'œstrogènes.

En combinant âge et sexe, le risque de faire un accident cardiovasculaire augmente à partir de 50 ans chez l'homme et 60 ans chez la femme.

- Les antécédents familiaux de maladies cardiovasculaires : l'hérédité cardiovasculaire est définie par le développement précoce d'une atteinte cardiovasculaire chez au moins un parent du 1er degré, avant 55 ans chez un homme et 65 ans chez une femme ; ces relations parentales mettent en évidence des caractères génétiques de prédisposition.

Les autres FDRCV sont des paramètres modifiables car ils associent des caractères physiologiques à des paramètres physiques ou biologiques mesurables :

- L'hypercholestérolémie : elle est d'origine mixte génétique et alimentaire (régime riche en graisses animales ou végétales). Le LDL-cholestérol est la lipoprotéine la plus athérogène.
- L'hypertension artérielle (HTA) : c'est le premier FDR d'accident vasculaire cérébral (AVC), c'est aussi un FDR d'insuffisance rénale, évolution tardive de l'HTA mal traitée.
- Le diabète de type 2, et dans une moindre mesure l'insulino-résistance et le diabète de type 1 : chez le diabétique avéré, le bon contrôle glycémique limite le risque cardiovasculaire. Chez un individu non diabétique, le contrôle de l'insulino-résistance empêche l'apparition du diabète, d'où l'intérêt d'un dépistage précoce des états pré-diabétiques. L'augmentation pandémique du diabète de type 2 amène à prendre en compte son incidence croissante et son rôle délétère dans la survenue de nouveaux cas de maladies cardiovasculaires. Le diabète multiplie par 2 à 3 chez l'homme, et par 3 à 5 chez la femme, le risque relatif de maladie coronaire et d'AVC ischémique, et de 4 à 6 celui d'AOMI. La protection naturelle féminine avant la ménopause disparaît avec le diabète. Enfin, associé à une HTA, le diabète

augmente le risque d'insuffisance rénale, d'insuffisance cardiaque, de maladie coronaire et d'AVC.

- Le tabagisme actif : c'est un FDR de la maladie coronaire et plus encore de l'AOMI et des AVC ischémiques. Dans la population d'hommes âgés de plus de 40 ans dans laquelle la proportion de fumeurs est de 60 %, on observe un taux de décès par maladies cardiovasculaires de 5 % contre 2 % dans une population non fumeuse, soit un risque relatif de 2,5.

La Haute Autorité de Santé a édité les FDRCV que tout médecin doit intégrer dans son estimation du risque cardiovasculaire global, et résumés ici sous forme de tableau (**Tableau I**).

Facteurs de risque cardiovasculaires	
Âge	> 50 ans chez l'homme et > 60 ans chez la femme
Antécédents familiaux d'accident cardio-vasculaire précoce	
Dyslipidémie	LDL-cholestérol $\geq 1,60$ g/l - HDL-cholestérol $\leq 0,40$ g/l quel que soit le sexe
Hypertension artérielle	PAS ≥ 140 mmHg et/ou PAD ≥ 90 mmHg
Diabète (diabète traité ou non traité)	Glycémie à jeun $\geq 1,26$ g/l
Tabagisme	Tabagisme actuel ou arrêté depuis moins de 3 ans

Tableau I : facteurs de risque cardiovasculaire de la maladie athéromateuse (13).

1.1.4. Bases communes de la prise en charge diagnostique et thérapeutique des maladies artérielles périphériques

Les maladies artérielles périphériques ont une base physiopathologique commune, l'athérosclérose, et sont ainsi abordées par le clinicien sous un angle identique en termes de sémiologie, d'imagerie et de prise en charge médicale.

- Sémiologie vasculaire : les symptômes vasculaires en relation avec une atteinte des artères des troncs supra-aortiques sont : des signes neurologiques ou ophtalmologiques focaux (trouble visuel monoculaire transitoire, déficit moteur hémicorporel, troubles phasiques...) ce qui fait alors évoquer un accident vasculaire ischémique cérébral ou rétinien. Les symptômes vasculaires en relation avec une atteinte des artères des membres inférieurs sont :
 1. Ischémie d'effort ou claudication intermittente : il s'agit d'une douleur d'un ou des deux membres survenant à la marche pour un certain périmètre de marche à type de crampe cédant rapidement à l'arrêt de l'effort et réapparaissant pour le même périmètre
 2. Ischémie de repos ou ischémie critique : il s'agit de douleur de repos au niveau du membre voire de troubles trophiques ou de gangrène. C'est le stade le plus tardif et le plus grave de l'AOMI mettant en jeu le membre concerné.

L'interrogatoire est suivi d'un examen clinique systématique qui consiste en une inspection précise des téguments et de l'aspect d'un trouble trophique, la palpation et l'auscultation de l'ensemble des trajets artériels à la recherche de souffle ou d'abolition des poulx. L'examen

se termine par la prise de l'Index de Pression Systolique à la cheville (IPS) qui est le rapport entre la pression systolique mesurée à la cheville et celle mesurée au niveau huméral à l'aide d'une sonde doppler. Les valeurs normales sont situées entre 0,9 et 1,3. Plus l'IPS est bas et plus l'AOMI est à un stade avancé.

- Imagerie vasculaire : elle est indispensable pour le dépistage de lésions infracliniques, pour réaliser une cartographie artérielle complète et pour définir les options thérapeutiques chirurgicale ou endovasculaire. Le choix du type d'imagerie dépend des effets secondaires potentiels et des contre-indications éventuelles. Chaque technique a ses avantages et ses inconvénients qui sont résumées dans le **tableau II**.
- Prise en charge médicale : elle est commune à l'ensemble des maladies cardiovasculaires athéromateuses. Elle passe tout d'abord par l'équilibre des FRCV modifiables : sevrage tabagique complet, équilibre du diabète ($HbA1C < 6,5\%$), équilibre de la pression artérielle ($< 140/90$ mmHg), équilibre d'une hypercholestérolémie (LDL-cholestérol < 1 g/l), activité physique régulière pour lutter contre la sédentarité, réduction pondérale en cas d'obésité. Cela s'associe systématiquement à la prescription de médicaments appelés « Best Medical Therapy » qui limitent la progression de la maladie athéromateuse et diminuent la mortalité cardiovasculaire. Selon les dernières recommandations européennes (1), ce traitement est constitué d'un antiplaquettaire, d'une statine quel que soit le niveau de base de LDL-cholestérol et un bloqueur du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRA). Le traitement antiplaquettaire se justifie par l'importance de l'agrégation plaquettaire dans la survenue de l'accident thrombotique aigu. Une méta-analyse récente colligeant les données

de 16 études a retrouvé que l'utilisation de l'aspirine en prévention secondaire réduit les évènements coronaires majeurs de 20%, les AVC ischémiques de 22% et les évènements cardiovasculaires fatals ou non de 19% (14). L'étude CAPRIE « Clopidogrel versus Aspirin in Patients at Risk of Ischaemic Events » avait montré un bénéfice discrètement supérieur du clopidogrel versus l'aspirine dans la prévention des évènements cardiovasculaires dans l'AOMI (4,9% versus 3,7% ; 19185 patients) (15). Le traitement par statines est systématique depuis l'étude HPS « Heart Protection Study » qui a montré que, chez le patients à haut risque cardiovasculaire, la simvastatine à 40 mg/jour versus placebo améliorée la morbimortalité cardiovasculaire (16). Dans le sous-groupe de patient avec une AOMI (6748 patients), les évènements cardiovasculaires majeurs à 5 ans étaient réduits de 25%. L'objectif cible de LDL-cholestérol est < 1 g/l voire $< 0,7$ g/l si possible (1). Enfin, le traitement par bloqueur du SRA se justifie depuis l'étude HOPE « Heart Outcomes Prevention Evaluation » qui comparait le traitement par perindopril versus placebo chez les patients atteints de pathologie cardiovasculaire (17). Le traitement par perindopril a permis de réduire le risque d'infarctus du myocarde, d'AVC et de décès cardiovasculaire de 25% chez les patients avec AOMI.

Type d'imagerie	Avantages	Inconvénients
Echo-doppler	Technique de dépistage Non invasive, facile d'accès Faible cout Données hémodynamiques Surveillance après traitement chirurgical	Demande du temps Opérateur-dépendant Sites profonds difficiles d'accès Artères de petit calibre mal visualisées Calcifications gênant la diffusion des ultrasons
Angioscanner	Facile d'accès Données morphologiques précises et complètes Examen de référence (TSAo)	Irradiations Allergie à l'iode Néphrotoxicité Calcifications gênant l'interprétation Artères jambières et sténoses intrastent mal visualisées
Angiographie par résonance magnétique ARM	Données morphologiques précises et complètes	Faible disponibilité Demande du temps Surestimation des lésions Contre-indications (matériel métallique, insuffisance rénale) Artéfacts induits par les stents
Angiographie	Données morphologiques précises et complètes Examen de référence (AOMI)	Invasive Irradiations Allergie à l'iode Néphrotoxicité

Tableau II : résumé des avantages et inconvénients des quatre types d'imagerie vasculaire disponibles.

1.2. Marqueurs de dysfonction vasculaire comme outil diagnostique innovant des sténoses carotidiennes à risque

1.2.1. Sténose carotidienne : généralités

1.2.1.1. Définition et épidémiologie

On désigne par sténose carotidienne les lésions athéromateuses de la bifurcation carotidienne située entre la fin de l'artère carotide commune et l'origine de l'artère carotide interne ou bulbe carotidien. Il s'agit de la localisation athéromateuse la plus fréquente au niveau des artères des troncs supra-aortiques. Une sténose est un rétrécissement du calibre d'une artère responsable de perturbations hémodynamiques, ce qui correspond à un rétrécissement d'au moins 50% lors d'une mesure en diamètre (70% en surface). Une sténose carotidienne est qualifiée de symptomatique ou d'asymptomatique suivant qu'elle est ou non considérée comme responsable d'un accident ischémique cérébral ou rétinien récent homolatéral. Une sténose carotidienne est symptomatique en cas de déficit hémisphérique focalisé ou de cécité monoculaire transitoire considéré comme ischémique dans le territoire carotidien homolatéral et survenu dans les 3 à 6 mois précédant la découverte de la lésion artérielle. En dehors de ces situations, la sténose carotidienne est considérée comme asymptomatique. Les mécanismes physiopathologiques impliqués sont : le plus fréquemment une origine embolique avec ulcération de la sténose carotidienne et libération de dépôts thrombotiques, plus rarement une origine hémodynamique due à une sténose sévère responsable d'une insuffisance d'apport sanguin cérébral. Un AVC est défini comme le développement rapide de signes cliniques localisés de déficit ou dysfonction cérébral durant plus de 24h sans autre cause apparente qu'une origine vasculaire. Les AVC sont hémorragiques ou

ischémiques. Les AVC ischémiques représentent 80% de l'ensemble des AVC et sont le témoin d'un infarctus cérébral. L'athérome carotidien et vertébrobasilaire est responsable de 20% des AVC ischémiques.

Les AVC sont la deuxième cause de décès dans le monde (9% des décès), la première cause de handicap acquis non traumatique et la deuxième cause de démence (18). En France, l'incidence des AVC est pour la période 2000-2006 de 113/100 000 habitants par an soit 130 000 cas par an. Cette incidence est fortement liée à l'âge, le risque d'AVC double à chaque décennie à partir de 55 ans. Elle est plus élevée chez les hommes mais du fait de l'espérance de vie plus élevée chez la femme le nombre absolu d'AVC est identique entre les deux sexes. L'HTA est un FDR majeur d'AVC, suivie du tabagisme. La réduction récente d'incidence et de mortalité des AVC observées dans les pays développés est essentiellement due au meilleur équilibre de ces deux FDRCV majeurs (HTA et tabagisme), et à la meilleure prise en charge de l'AVC en phase aigüe.

En population générale, la prévalence des sténoses carotidiennes extracrâniennes asymptomatiques $\geq 50\%$ en diamètre varie en fonction de l'âge, de moins de 1% avant 50 ans jusqu'à plus de 8% après 80 ans (19).

1.2.1.2. Histoire naturelle de la sténose carotidienne : risque neurologique

La gravité d'une sténose carotidienne est liée au risque de survenue ou de récurrence d'un AVC imputable à cette sténose. Ce risque neurologique dépend du caractère symptomatique ou non de la sténose comme précédemment défini, et du degré de sténose. La quantification du degré de sténose a été établie sur des mesures angiographiques lors des deux grands essais thérapeutiques menés dans les années 1990 qui ont évalué le bénéfice de la chirurgie carotidienne prophylactique après AVC sur sténose carotidienne, le premier Nord-Américain NASCET « North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial » (20, 21), et le deuxième européen ECST « European Carotid Symptomatic Trial » (22). Le degré de sténose correspond au pourcentage du diamètre de la lumière résiduelle du vaisseau occupé par la lésion rapporté au diamètre natif du vaisseau. La méthode NASCET compare le diamètre de l'artère carotide interne sténosée avec le diamètre « normal » de l'artère carotide interne distale. Cette méthode a l'avantage de permettre une mesure objective mais elle sous-estime les sténoses. La méthode ECST compare le diamètre de la sténose de l'artère carotide interne avec le diamètre supposé du bulbe carotidien. Cette méthode donne une mesure plus réelle de la sténose mais nécessite une reconstitution de la paroi de l'artère carotide qui manque d'objectivité. La corrélation des deux méthodes montre qu'une sténose de 75% ECST correspond à une sténose de 50% NASCET (**Figure 5**).

Pour les sténoses carotidiennes symptomatiques, le risque neurologique de récurrence d'AVC homolatéral est élevé d'autant plus que le degré de sténose est important et que l'épisode neurologique est récent. Il a été estimé grâce aux études NASCET et ECST (20, 22). Le risque de récurrence est de 5 à 6% par an pour les sténoses entre 50% et 69% en réduction de diamètre NASCET,

de 10% par an pour les sténoses entre 70% et 79%, de 14% pour les sténoses entre 80% et 89% et de 17% pour les sténoses entre 90% et 99%. Le risque de récurrence est étroitement corrélé au délai écoulé depuis l'AVC, maximal les 15 premiers jours pour tendre vers le risque d'une sténose asymptomatique à partir de 12 semaines.

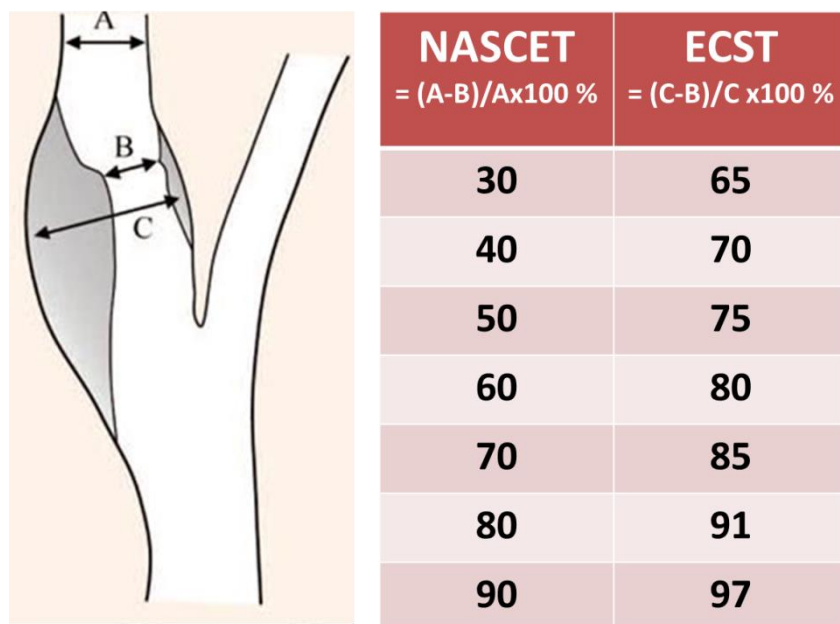


Figure 5 : évaluation du degré de sténose carotidienne selon les méthodes NASCET et ECST et correspondance entre les deux.

Pour les sténoses carotidiennes asymptomatiques, l'estimation du risque neurologique spontané est beaucoup plus discutée dans la littérature. Il a été initialement estimé lors des deux grands essais réalisés pour valider la chirurgie carotidienne chez des sujets asymptomatiques, ACAS « The Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study » (23) et ACST « Asymptomatic Carotid Surgery Trial » (24). Le risque neurologique sous traitement médical d'une sténose de plus de 60% en réduction de

diamètre NASCET était de 2,2% par an dans ACAS (834 patients) et 2,3% par an dans ACST (1560 patients), sur un suivi de 5 ans. Dans ces deux études, à partir de 60% de degré de sténose en réduction de diamètre NASCET, le risque annuel n'augmente pas avec la sévérité du degré de sténose. Le traitement médical de l'époque était la prescription systématique d'antiplaquettaire et l'équilibre des FDRCV, le traitement par statine n'était pas présent dans l'étude ACAS et était prescrit dans les dernières années de l'étude ACST (17% entre 1993 et 2000 et 58% entre 2000 et 2003). Les résultats à 10 ans de l'étude ACST ont été publiés en 2010 et retrouvent une diminution discrète du risque neurologique spontané d'autant plus qu'un traitement par statines était prescrit : 1,79% par an sur l'ensemble de la cohorte et 1,45% par an chez les patients sous statines (25). D'autres résultats ont été publiés en faveur d'un risque spontané annuel beaucoup plus faible que les chiffres précédents mais portant sur des études au nombre de patients beaucoup plus petit : dans la cohorte de Toronto composée de 106 patients porteurs d'une sténose carotidienne asymptomatique le risque annuel était de 0,6% pour les sténoses inférieures à 50% (48 patients) et 0,9% pour les sténoses supérieures à 50% (58 patients ; sténose entre 50% et 69% : 23 patients et sténose supérieure à 70% : 35 patients) (26). Plus récemment, une étude a rapporté le suivi de 101 patients issus de l'Oxford Vascular Study : patients ayant présenté un AVC et qui étaient suivis pour une sténose carotidienne asymptomatique dépistée lors de l'AVC (27). Le traitement médical était intensif : 91% des patients étaient sous antiplaquettaires et 81% sous statines après deux ans de suivi. Sur 101 patients, 69 avaient une sténose entre 50% et 69% et 32 avaient une sténose entre 70% et 99%. Le risque annuel d'AVC ipsilatéral était de 0,34% sur un suivi de 3 ans. En résumé, le risque neurologique spontané annuel d'une sténose carotidienne asymptomatique varie dans la littérature de 0,34% à 2,3% en fonction des auteurs, du nombre de patients inclus et du traitement médical prescrit.

1.2.1.3. Traitement chirurgical : techniques et indications actuelles

Le principe de la chirurgie est de retirer la sténose à risque pour éviter la survenue d'un AVC. La première technique est l'endartériectomie longitudinale : après l'exposition et le clampage de la bifurcation carotidienne, le chirurgien réalise une artériotomie à cheval sur l'artère carotide primitive et l'artère carotide interne (**Figure 6-A**). L'endartériectomie est menée dans un plan de clivage qui se situe dans la partie externe de la média et s'arrête en pente douce vers l'aval. La fermeture se fait à l'aide d'un patch veineux ou prothétique pour éviter les resténoses. Cette technique est fréquemment associée à la mise en place d'un shunt qui permet de maintenir une circulation cérébrale pendant la chirurgie. La deuxième technique est l'endartériectomie par éversion (**Figure 6-B**). Après section oblique du bulbe carotidien, la paroi artérielle est retroussée, libérant le cylindre interne ou séquestre, la partie la plus distale de l'endartériectomie se faisant sous contrôle de la vue. L'artère carotide interne est ensuite réanastomosée. Cette technique a l'avantage de permettre de suivre le séquestre jusqu'à sa limite la plus distale et de traiter lorsqu'elle existe l'association lésionnelle d'une sténose athéroscléreuse et d'un excès de longueur.

Le but des quatre essais (NASCET, ECST, ACAS, AVST) menés chez les patients porteurs d'une sténose carotidienne était d'évaluer le bénéfice de la chirurgie carotidienne prophylactique pour une catégorie de patients donnée. Ils ont comparé après randomisation, la diminution du risque de survenue d'événements neurologiques et/ou de décès chez des patients traités soit médicalement avec la correction des facteurs de risque cardiovasculaire et la mise sous traitement antiagrégant plaquettaire soit bénéficiant d'une chirurgie carotidienne en plus du traitement médical optimum. Pour être indiquée, il a fallu montrer que le bénéfice de la chirurgie (éviter la survenue ou la

récidive d'un AVC) était supérieur au risque de la chirurgie évalué par le taux cumulé de morbidimortalité (TCMM) péri-opératoire à 30 jours.

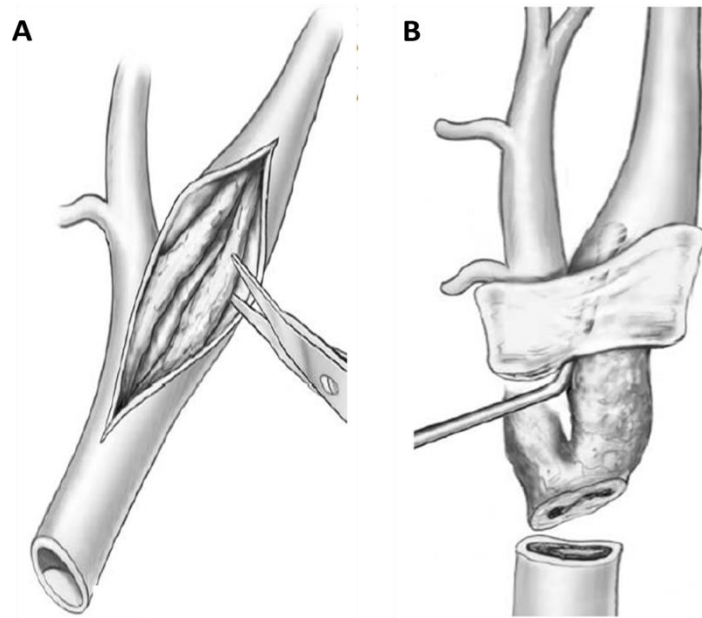


Figure 6 : techniques chirurgicales d'endartériectomie carotidienne. A : endartériectomie longitudinale ; B : endartériectomie par éversion, d'après le chapitre de 2004 de l'Encyclopédie Médicale Chirurgicale écrit par Pr A. Branchereau.

Pour les sténoses carotidiennes symptomatiques, la chirurgie carotidienne est indiquée dans les conditions suivantes (28, 29):

- pour les sténoses symptomatiques comprises entre 70 et 99 %, la compilation des résultats des études NASCET et ECST a montré que la chirurgie est indiquée avec un bénéfice important et équivalent pour les hommes et les femmes

- pour les sténoses comprises entre 50 et 69 %, la chirurgie peut être indiquée, mais avec un moindre bénéfice en particulier chez les femmes
- la chirurgie carotidienne n'est pas utile pour les sténoses inférieures à 50 %, et elle est délétère, et ne doit pas être réalisée pour les sténoses inférieures à 30 %
- pour les patients atteints d'accidents ischémiques transitoires, il existe un bénéfice à réaliser au plus tôt (< 2 semaines) la chirurgie carotidienne par rapport à un traitement différé
- les patients âgés de plus de 75 ans tirent un plus grand bénéfice de la chirurgie carotidienne que les patients de moins de 65 ans, ce d'autant plus qu'il s'agit de patients de sexe masculin.

Pour les sténoses carotidiennes asymptomatiques, les indications opératoires émanent des études ACAS et ACST (23, 24, 29). Une indication opératoire est retenue en cas de sténose supérieure à 60% en réduction de diamètre NASCET sous condition que le risque opératoire de l'équipe chirurgicale (TCMM) soit inférieur à 3% et d'une espérance de vie du patient supérieure à 5 ans. Dans l'étude ACST, le risque neurologique était à 5 ans de 11,8% (2,3% par an) sous traitement médical et de 6,4% (1,3% par an) après endartériectomie ($p < 0,0001$) (24). Les résultats à 10 ans retrouvent toujours un bénéfice de la chirurgie même si les pourcentages sont plus faibles du fait de l'amélioration du traitement médical (groupe des patients sous antiplaquettaire et statine : risque neurologique sous traitement médical de 14,5% (1,45% par an) versus 9,6% (0,96% par an) après chirurgie ($p = 0,01$) (25). Il n'a pas été montré de bénéfices chez les femmes à 5 ans mais le bénéfice apparaît après 10 ans de suivi.

1.2.2. Problématique actuelle : indications de la chirurgie carotidienne chez les patients asymptomatiques

Les recommandations françaises (29) et internationales (1) se basent sur les résultats des essais ACAS et ACST pour justifier une chirurgie carotidienne chez les patients avec une sténose supérieure à 60% NASCET par des équipes dont le TCMM à 30 jours est inférieur à 3%. Ces études ont été menées il y a plus de 15 ans, la principale critique faite par certaines équipes est que le traitement médical a depuis évolué et que le risque spontané d'une sténose carotidienne devient très faible quasiment identique au risque induit par la chirurgie.

En 2009, Anne Abbott publie une revue au titre provocateur : « Medical (nonsurgical) intervention alone is now best for prevention of stroke associated with asymptomatic severe carotid stenosis » (30). Dans cette analyse de 11 articles, elle a étudié le taux annuel d'AVC et d'accidents ischémiques transitoires ipsilatéraux à une sténose carotidienne supérieure à 50% asymptomatique. Elle a trouvé : une réduction significative de 7% du taux annuel d'AVC et d'accidents transitoires homolatéraux entre 1985 et 2005, et un taux annuel d'AVC homolatéraux spontanés identique au risque chirurgical d'ACAS à partir de l'année 2005. Elle a rapporté aussi une intensification nette du traitement médical du patient polyvasculaire. Entre 1985 et 2007, le nombre de patients sous antiplaquettaires a augmenté de 22% ($p < 0,01$). Seules 3 études avaient recueilli les données sur le traitement hypolipémiant : 10% des patients en 1998 versus 45% des patients en 2007. Enfin, elle a calculé les coûts annuels du traitement médical seul versus le traitement chirurgical combiné au traitement médical et estime une réduction des coûts de 3 à 8 fois en faveur du traitement médical. Les deux critiques de cette revue sont : qu'elle a exclu les résultats du plus grand essai publié sur la chirurgie des sténoses carotidiennes asymptomatiques, ACST, car les données sur les accidents transitoires n'étaient pas disponibles, et qu'elle a inclut des

études avec patients ayant des sténoses supérieures à 50% et a comparé les résultats de ces études à ceux obtenus pour des patients ayant une sténose supérieure à 60% dans ACAS. Une autre étude a récemment publié des chiffres extrêmement bas sur le risque neurologique spontané d'une sténose carotidienne supérieure à 50%. Elle a étudié le suivi de 101 patients issus de l'Oxford Vascular Study : patients ayant présenté un AVC et qui étaient suivis pour une sténose carotidienne asymptomatique supérieure à 50% dépistée lors de l'AVC (27). Sur 101 patients, 69 avaient une sténose entre 50% et 69% et 32 avaient une sténose entre 70% et 99%. Le risque annuel d'AVC ipsilatéral était de 0,34% sur un suivi de 3 ans.

La critique majeure de ces deux études est qu'elles comparent des populations différentes : des sténoses supérieures à 50% à des sténoses supérieures à 60% qui ont forcément un risque neurologique évolutif différent (31, 32). Ainsi, malgré ces publications qui montrent une réduction du risque neurologique spontané induit par une sténose carotidienne, la chirurgie préventive reste une recommandation de niveau A au niveau national et international (1, 29). Ce niveau de preuve est renforcé par la publication récente des résultats à 10 ans d'ACST qui montre une persistance à 10 ans du bénéfice en faveur du traitement chirurgical, y compris chez les patients sous traitement médical optimal (25). Ceci s'explique par le fait que la réduction du risque neurologique est aussi obtenue dans le groupe chirurgie car les patients étaient aussi sous traitement médical, et que le TCMM des équipes a nettement diminué actuellement autour de 1% (31, 32).

En résumé, le bénéfice de la chirurgie carotidienne systématique est présent mais très proche de celui du traitement médical optimal. Seule une étude randomisée comparant un groupe « traitement médical optimal actuel » versus un groupe « traitement chirurgical et traitement médical actuel » avec le TCMM actuel des équipes chirurgicales permettraient de répondre à la question du réel bénéfice mais cette étude poserait des problèmes éthiques. En effet, on prendrait

ainsi le risque de laisser évoluer vers un AVC des patients avec une sténose carotidienne serrée à risque. Ainsi, cela souligne l'importance de disposer de marqueurs utiles à l'identification des patients asymptomatiques porteurs d'une sténose carotidienne à haut risque neurologique et de les corrélés à l'instabilité de la plaque athéromateuse.

1.2.3. La plaque carotidienne instable ou vulnérable

1.2.3.1. Définition et classification

La notion de plaque athéromateuse « instable » ou « vulnérable » est née dans les années 1990 (33, 34). Elle regroupe les plaques athéromateuses asymptomatiques mais à haut risque d'induire un évènement clinique cardiovasculaire du fait de caractéristiques histologiques particulières. Cette définition repose sur l'idée qu'un accident cardiovasculaire aigu est dû à une thrombose aiguë d'une artère suite à des remaniements intraplaques et non à une réduction progressive du calibre d'une artère par une croissance lente de la plaque. Les caractéristiques histologiques de la plaque instable sont un cœur lipidique abondant et une chape fibreuse fine donc fragile qui peut se rompre à tout moment et déclencher ainsi un accident thrombotique.

La classification histologique de référence mais un peu ancienne de la plaque instable a été publiée par Stary en 1995 (9). Elle est fondée sur la genèse et l'évolution naturelle de la plaque athéromateuse résumées sur la **figure 7**. Cette évolution histologique de la plaque d'athérome a été définie essentiellement grâce à des études autopsiques. La plaque athéromateuse adulte stable

est le type V de la classification de Stary : cœur lipidique fin et chape fibreuse dense, elle aussi appelée fibro-athérome (**Figure 8A**). La plaque instable ou vulnérable sont les types IV et VI de Stary (**Figure 8B**). Le type IV regroupe les anomalies histologiques suivantes : cœur lipidique abondant et une chape fibreuse fine. Le type VI est le stade le plus à risque d'évènements cliniques : dénudation endothéliale, hémorragie ou hématome intraplaque, thrombus luminal. Il s'agit cependant d'une classification purement descriptive sans éléments quantitatifs ou semi-quantitatifs.

Type histologique	Progression	Mécanisme de croissance	Age de début	Clinique
Type I : Macrophages spumeux isolés	I II III	Accumulation de lipides	Dés 10 ans	Asymptomatique
Type II : Strie lipidique				
Type III : Accumulation de lipides extra-cellulaires			Dés 30 ans	
Type IV : Centre lipidique sans fibrose	IV	Augmentation du collagène et des cellules musculaires lisses	Dés 40 ans	Asymptomatique ou symptomatique
Type V : Fibro-athérome : chape fibreuse +/- calcifications	V			
Type VI : Plaque compliquée	VI	Rupture, thrombose...		

Figure 7 : classification AHA (American Heart Association) des lésions d'athérome par Stary *et coll.* en 1995 (9). Type IV et VI: plaque instable ; type V : plaque stable.

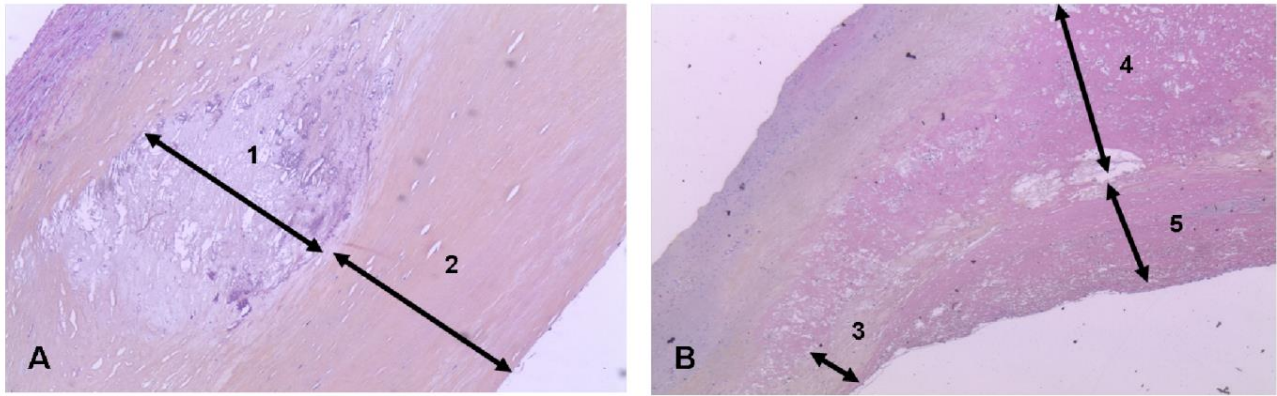


Figure 8 : exemples histologiques de plaque stable et instable selon la classification de Stary. A : Plaque stable (type V), 1 = cœur lipidique, 2 = chape fibreuse épaisse. B : Plaque instable (type VI), 3 = chape fibreuse fine, 4 = cœur lipidique dense, 5 = thrombus luminal. D'après l'article de Sarlon-Bartoli *et coll.* (35).

Cette classification a été précisée en 2003 par Naghavi *et coll.* (36). Les auteurs ont réuni les critères de plaque IV et VI, et ont rajouté des critères inflammatoires. Ils ont ainsi proposé des critères majeurs et mineurs de plaque instable, mais cette classification reste descriptive. Les critères majeurs sont : inflammation active (monocyte/macrophage voire lymphocyte T), chape fibreuse fine avec un cœur lipidique large, dénudation endothéliale, plaque fissurée et sténose supérieure à 90%. Les critères mineurs sont : nodule calcifié superficiel, hémorragie intraplaque et dysfonction endothéliale. La dysfonction endothéliale est analysée par des tests fonctionnels comme la vasoréactivité de l'artère brachiale.

En 2006, Redgrave *et coll.* ont proposé une nouvelle classification avec des critères semi-quantitatifs inflammatoires, résumés dans le **tableau III** (37). Le but des auteurs était de standardiser et d'harmoniser la définition de l'instabilité de la plaque, mais la principale critique émise est que la quantification est très variable en fonction de la zone de coupe de la plaque et que les résultats sont ainsi peu reproductibles. Ainsi, la classification de Stary affinée par Naghavi reste actuellement la référence pour diagnostiquer une plaque instable ou stable.

Score d'inflammation	Lymphocytes (CD3)	Macrophages (CD68)
0	Aucun	Aucun
+	Quelques cellules dispersées ou 1 groupe > 20 cell	Quelques cellules dispersées ou 1 groupe > 50 cell
Infiltration marquée		
++	Quelques groupes (<5) de > 20 cell	Quelques groupes (<5) de > 50 cell
+++	Plusieurs groupes (>5) de > 20 cell ou 1 groupe de > 100 cell	Plusieurs groupes (>5) de > 50 cell ou 1 groupe de > 500 cell
Classification		
Plaque stable	Chape fibreuse prédominante, épaisse, intacte	
Majoritairement stable	Chape fibreuse épaisse mais quelques éléments d'instabilité → score d'inflammation : +	
Instable avec chape intacte	Chape fibreuse fine et cœur lipidique abondant	
Instable avec chape rompue	Rupture de la plaque ou thrombus	

Tableau III : classification de Redgrave incluant des critères semi-quantitatifs inflammatoires pour définir la plaque stable et instable.

1.2.3.2. Marqueurs actuels biologiques et d'imagerie de la plaque carotidienne instable

L'objectif de nombreuses équipes est d'essayer d'identifier, parmi les patients porteurs d'une sténose carotidienne serrée asymptomatique, ceux à haut risque neurologique porteur d'une plaque instable et qui bénéficierait le plus de la chirurgie carotidienne préventive. Le dépistage d'une plaque instable peut s'envisager à l'aide de marqueurs biologiques et/ou radiologiques. Les avantages d'un marqueur biologique sont : la simplicité de réalisation y compris en urgence, la reproductibilité, et le coût ; l'inconvénient principal est le caractère systémique du résultat ne permettant pas de cibler réellement une plaque ou une autre. Un marqueur radiologique a lui comme avantage de cibler la plaque supposée instable ; les inconvénients sont : la disponibilité, la lourdeur de l'examen et le coût. Que ce soit pour l'un ou l'autre type de marqueur, il doit être comparé à une référence qui diffère selon les équipes : l'instabilité peut être définie par la clinique (patient symptomatique ou non) ou par l'analyse histologique de la plaque.

1.2.3.2.1. Marqueurs biologiques

Un biomarqueur est défini par le National Institute of Health comme « une caractéristique mesurée objectivement (c'est-à-dire avec une précision et une reproductibilité suffisantes) et évaluée comme indicateur de processus physiologique ou pathologique, ou de l'action des médicaments ». Dans le cas de la pathologie carotidienne, un biomarqueur aura des taux plasmatiques corrélés à l'instabilité de la plaque clinique ou histologique. Le biomarqueur idéal sera corrélé de façon significative et indépendante statistiquement à l'instabilité de la plaque. Une douzaine de

biomarqueurs ont été testés dans cette indication et les résultats sont résumés dans le **tableau IV** (38-44). Il s'agit de protéines de la matrice extracellulaire (PAPP-A (Pregnancy-Associated Plasma Protein A), métalloprotéases (MMP) 1-2-7-8-9, inhibiteur tissulaire des MMP (TIMP) 1), des protéines inflammatoires (TNF alpha (Tumor Necrosis Factor), interleukine (IL) 8, néoptérine, CRP (C-Reactive Protein) ultrasensible) et des produits de la fibrinolyse (d-dimères). Seuls deux biomarqueurs sont retrouvés élevés dans la plaque instable de façon significative et indépendante après analyse statistique multivariée : la néoptérine (plaque instable définie en échographie) (40) et la MMP-9 (plaque instable définie en histologie selon la classification AHA (43).

Auteurs et année	N patients	Biomarqueur	Référence	Résultats	Analyse multivariée
Heider, 2010	44	PAPP-A	Histologie Critères AHA	Plaques instables : 0.10+/-0.06 vs plaques stables : 0.07+/-0.04 microg/ml (p=0.047)	Non
Pelisek, 2009	101	MMP-1 et -7 TIMP-1 TNF alpha IL-8	Histologie Critères AHA	Taux sériques plus élevés dans les plaques instables de façon significative	Non
Sugioka, 2009	102	Neopterin	Echographie	Taux sériques plus élevés dans les plaques complexes de façon significative	Oui
Papas, 2008	88	CRP ultrasensible	Symptômes Et Histologie Critères AHA	Taux sériques plus élevés dans les plaques instables et chez les patients symptomatiques de façon significative	Non
Krupinski, 2007	206	D-dimères MMP-8	Symptômes Et Histologie Critères AHA	D-dimère élevé chez les patients symptomatiques D-dimère et MMP-8 élevés dans les plaques instables	Non
Alvarez, 2004	42	MMP-2 MMP-9	Symptômes Et Histologie Critères AHA	MMP-2 et -9 élevées chez les patients symptomatiques MMP-9 élevée dans les plaques instables	Oui (MMP-9)
Alvarez, 2003	62	CRP ultrasensible	Symptômes Et Histologie Critères AHA	Taux sériques plus élevés dans les plaques instables et chez les patients symptomatiques de façon significative	Non

Tableau IV : marqueurs biologiques plasmatiques corrélés à la plaque carotidienne instable. PAPP-A : Pregnancy-Associated Plasma Protein A, MMP : métalloprotéases matricielles, TIMP : inhibiteur tissulaire des MMP, TNF alpha : Tumor Necrosis Factor, IL : interleukine, CRP : C-Reactive Protein.

D'un point de vue physiopathologique, ces marqueurs biologiques ont un lien avec la genèse de la plaque d'athérome et son caractère instable. La PAPP-A est une métalloprotéinase de haut poids moléculaire initialement identifiée dans le plasma de femmes enceintes et qui est sécrétée par les cellules endothéliales et les CML de la plaque d'athérome d'autant plus que celle-ci est instable (38). Les MMP et le TIMP sont synthétisés par les CML de la plaque de par l'acquisition d'un phénotype sécrétoire et vont participer à l'évolution vers l'instabilité par des phénomènes de protéolyse (39, 43). La néoptérine est une protéine produite par les macrophages activés par l'interféron γ issu des lymphocytes T et peut participer à la phase inflammatoire de la plaque d'athérome (40). La CRP est une protéine inflammatoire qui interagit avec des récepteurs membranaires pour favoriser la phagocytose et active la cascade du complément, elle pourrait ainsi être impliquée dans l'apparition de la plaque instable (41, 44).

1.2.3.2.2. Marqueurs d'imagerie

Les techniques développées dans l'imagerie de la plaque instable carotidienne sont : l'échographie sous plusieurs modalités, l'IRM (Imagerie de Résonance Magnétique) et l'imagerie nucléaire par pet-scanner. Les avantages et inconvénients de ces imageries sont résumés dans le **tableau V**. Le scanner est peu utilisé dans cette indication car les calcifications créent des artéfacts et gênent l'interprétation des composants de la plaque.

Technique	Avantages	Inconvénients
Echographie	Disponibilité Simplicité Cout	Reproductibilité Score semi-quantitatif
IRM	Reproductibilité	Durée Artéfacts Disponibilité Simplicité Cout Score semi-quantitatif
Pet-scanner	Aspect métabolique	Durée Disponibilité Simplicité Cout

Tableau V : Avantages et inconvénients des différentes techniques d'imagerie de la plaque athéromateuse carotidienne.

- Echographie de la plaque carotidienne :

L'échographie permet de détecter facilement certaines caractéristiques de la plaque carotidienne orientant vers le caractère instable : une surface irrégulière ou ulcérée qui témoigne de la dénudation de l'endothélium, l'hypoéchogénicité qui reflète l'abondance du cœur lipidique ou la présence d'hémorragies intraplaques, l'hétérogénéité qui témoigne de calcifications ou d'hémorragies intraplaques (45). Ces anomalies descriptives ont été résumées dans la classification de Geroulakos : plaque de type I = homogène et hypoéchogène, type II = hétérogène avec des plages hypoéchogènes supérieures à 50%, type III = hétérogène avec des plages hyperéchogènes supérieures à 50%, type IV = homogène et hyperéchogène, type V = calcifiée. Sur une série de 105 patients asymptomatiques porteurs d'une sténose carotidienne serrée supérieure à 70% NASCET, Geroulakos *et coll.* ont montré que les plaques de type I

étaient significativement plus associées à des accidents ischémiques silencieux dépistés par scanner que les plaques de type II, III, IV et V (46). Pour améliorer la détection des composants de la plaque, la quantification de l'échogénicité a été ensuite développée par l'intermédiaire de niveaux de gris médian (Grayscale Median : GSM). Les mesures GSM sont issues d'images échographiques numérisées et normalisées au score GSM du sang (GSM 0-5) et de l'adventice (GSM 180 à 200). Par la suite, l'échogénicité dans la région d'intérêt est exprimée dans une des 256 teintes de gris, un GSM à 0 est codé noir et un GSM à 255 est codé blanc. Une corrélation a été trouvée entre le score GSM et la composition de la plaque en histologie (47). Le score GSM a aussi été corrélé au nombre de FDRCV, au nombre d'ischémies cérébrales silencieuses et à la plaque carotidienne de patients symptomatiques (48). Cette technique est certes intéressante mais a une sensibilité faible de 50% (49). Enfin, la technique échographique la plus récente est l'utilisation d'un produit de contraste intravasculaire capable de rehausser la plaque si elle est présente des néovaisseaux. Cette néoangiogenèse intraplaque est un signe d'instabilité. Les résultats sont pour l'instant séduisants mais il n'existe pas encore de score quantitatif permettant de standardiser cette technique (50).

- IRM de la plaque carotidienne :

Le principal avantage de l'IRM est sa haute résolution qui assure une bonne détection du cœur lipidique, des hémorragies intraplaques et des calcifications. Une étude française de 2007 avait montré chez 85 patients porteurs d'une sténose carotidienne une bonne reproductibilité pour quantifier la lumière et la plaque, mais la quantification des composants de la plaque était moins reproductible (51). L'IRM a une meilleure sensibilité (96% versus 75%) et spécificité (93% versus 63%) que l'échographie pour détecter les plaques à risque (45, 52). Cependant elle est

limitée par la durée (30 minutes) (53) et la lourdeur de l'examen, les nombreux artéfacts induits par la déglutition et l'absence de score quantitatif d'instabilité.

- Pet-scanner de la plaque carotidienne :

L'imagerie nucléaire par pet-scanner au 18 fluoro-déoxy-glucose est aussi étudiée pour caractériser la plaque instable carotidienne avec de bons résultats en comparaison à l'histologie (54), mais il s'agit d'une technique longue et couteuse qui semble difficile d'utilisation en pratique quotidienne pour dépister les plaques à risque.

En résumé, plusieurs marqueurs biologiques et d'imageries sont étudiés pour essayer de dépister les plaques carotidiennes à risque. La MMP-9 est le biomarqueur le plus robuste car il est corrélé significativement et de façon indépendante à la plaque instable définie en histologie. L'IRM est la technique d'imagerie la plus aboutie dans la détection des composants de la plaque mais reste une modalité lourde et couteuse. Ainsi, malgré ces résultats prometteurs, il est intéressant de continuer à chercher un marqueur simple et reproductible pour dépister les plaques instables.

1.2.4. Microparticules leucocytaires comme biomarqueur original de la plaque carotidienne instable

1.2.4.1. Définition des microparticules

Les microparticules (MP) sont des microvésicules membranaires complexes de petite taille (entre 0,1 et 1 μm) libérées par des cellules activées ou en apoptose et retrouvées dans la circulation sanguine (55). Une cellule devient activée sous l'action de stimuli biologiques, physiques ou infectieux. L'apoptose est un processus d'élimination cellulaire non-inflammatoire permettant le renouvellement tissulaire, mais il est également un mode suicidaire de réponse à une agression observée dans des conditions pathologiques notamment lors de la formation de plaques d'athérome.

La génération de MP est liée à des remaniements de la membrane plasmique. Il existe dans les membranes plasmiques des cellules non stimulées une asymétrie de distribution des phospholipides, les aminophospholipides étant séquestrés dans le feuillet interne de la membrane plasmique (56). Cette asymétrie de répartition est un processus actif, consomme de l'énergie et est sous la dépendance de trois acteurs principaux. Une aminophospholipide translocase, « flippase » est spécifique du transport vers le feuillet interne de la membrane des aminophospholipides, la « floppase » permet leur externalisation, la « scramblase » permettant un transport aspécifique bidirectionnel (**Figure 9**). L'apoptose et l'activation cellulaire s'accompagnent d'une augmentation du calcium cytosolique aboutissant à la protéolyse du cytosquelette. Parallèlement, l'activité « flippase » est inhibée alors que les activités « floppase » et « scramblase » augmentent. Les aminophospholipides procoagulants (phosphatidylsérine) sont transloqués dans le feuillet externe de la membrane plasmique. Sous l'effet de cette surcharge phospholipidique, la membrane

bourgeonne et libère dans les fluides biologiques des MP caractéristiques de la cellule émettrice. En fonction de leur origine cellulaire et du stimulus cellulaire initial, elles transportent des clusters de différenciation, des cytoadhésines, des lipides actifs et le facteur tissulaire.

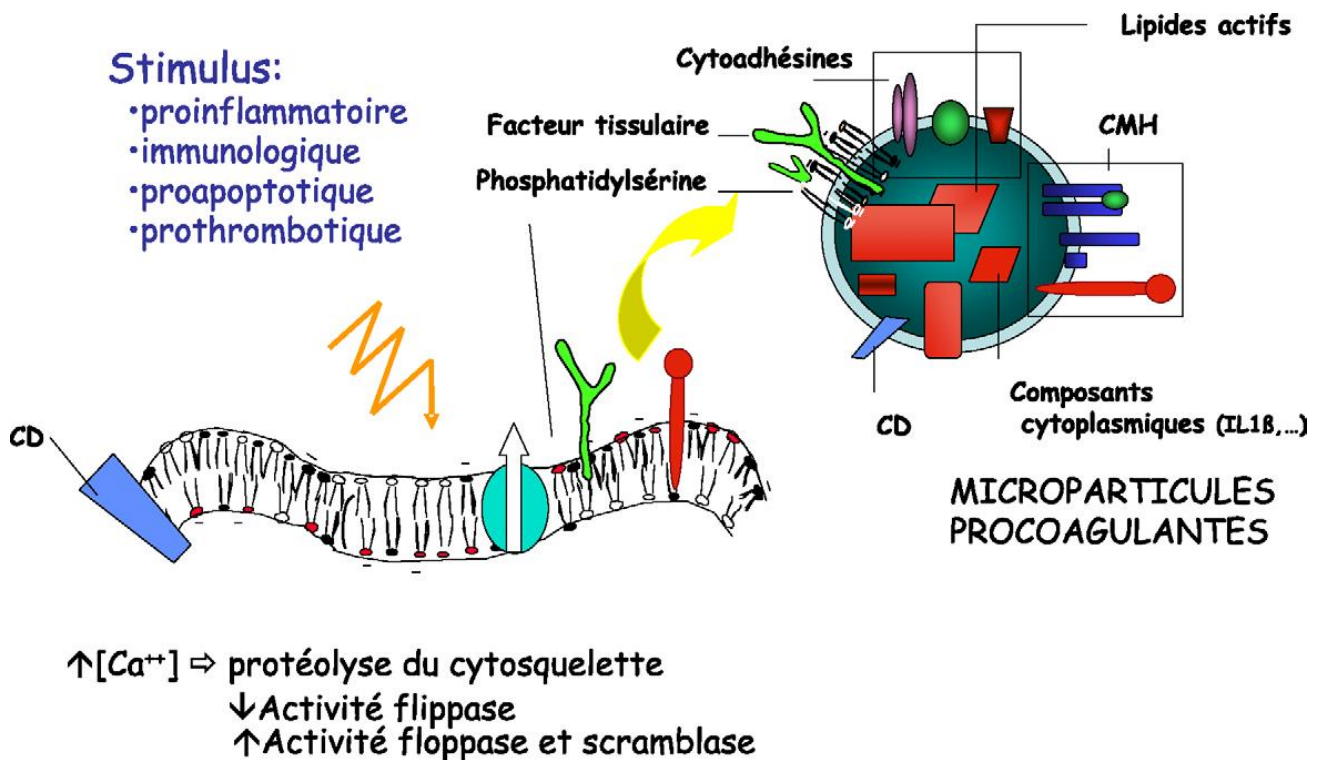


Figure 9 : remaniement de la membrane plasmique et génération de MP, d'après Morel *et coll.*

(56).

Les MP sont composées d'une double couche de phospholipides qui expose des protéines transmembranaires et des récepteurs, et renferme des composants cytosoliques comme des enzymes, des facteurs de transcription et de l'ARN messager provenant de leurs cellules mères. Toute cellule vivante est susceptible de produire des MP, mais dans la circulation sanguine, les MP sont d'origine principalement plaquettaire mais aussi leucocytaire, érythrocytaire et endothéliale

(57, 58). C'est la présence de glycoprotéines membranaires spécifiques de la cellule parentale qui permet l'identification de leur origine cellulaire et aussi d'associer la présence de certaines MP à des situations pathologiques spécifiques.

Les MP circulantes sont procoagulantes et jouent ainsi un rôle majeur l'hémostase et la thrombose (56). Les MP circulantes, principalement d'origine plaquettaire, fournissent dans le compartiment vasculaire des surfaces phospholipidiques additionnelles, riches en phosphatidylsérine, permettant l'assemblage des complexes enzymatiques de la coagulation « tenase » et « prothrombinase » et la génération de thrombine. A la surface des MP et des cellules stimulées, la phosphatidylsérine augmente considérablement l'activité procoagulante du facteur tissulaire initiateur cellulaire majeur de la coagulation. Les MP constituent la quasi-totalité de l'activité facteur tissulaire circulante. Les MP et la thrombine générée participent à l'amplification de la réponse hémostatique en activant les différentes lignées cellulaires du compartiment vasculaire. Par le biais de MP, les cellules stimulées disséminent dans le flux des protéines membranaires fonctionnelles et des protéines adhésives ou cytoplasmiques. Ces caractéristiques membranaires favorisent la capture à distance du foyer d'émission par le biais d'interaction ligand-récepteurs expliquant la formation de MP hybrides par multiples fusions membranaires. Les cellules stimulées notamment par la thrombine sont capables d'augmenter la synthèse de cytokines et de protéines membranaires comme les sélectines. Dans le cas des cellules endothéliales, les MP dérivées portent le facteur tissulaire. La P-sélectine soluble libérée de la membrane par protéolyse est provésiculante. Par liaison avec son ligand PSGL-1, elle permet de recruter les MPL porteuses de facteur tissulaire au sein du thrombus.

Les MP sont aussi impliqués dans d'autres différents phénomènes physiopathologiques : la modulation du tonus vasculaire, la modulation du statut inflammatoire, la réponse immune et la croissance tumorale (56).

1.2.4.2. Les microparticules leucocytaires

Les MP leucocytaires (MPL) sont issues des polynucléaires neutrophiles, des monocytes ou des lymphocytes (59). Leurs rôles physiopathologiques et leurs interactions cellulaires sont résumées dans la **figure 10**. Elles jouent ainsi un rôle dans les processus inflammatoires et thrombotiques. De plus, elles participent à des phases clés de la formation de la plaque d'athérome et à sa vulnérabilité notamment via les MPL monocytaires, et c'est pour cette raison que notre travail a ciblé ce type de MP.

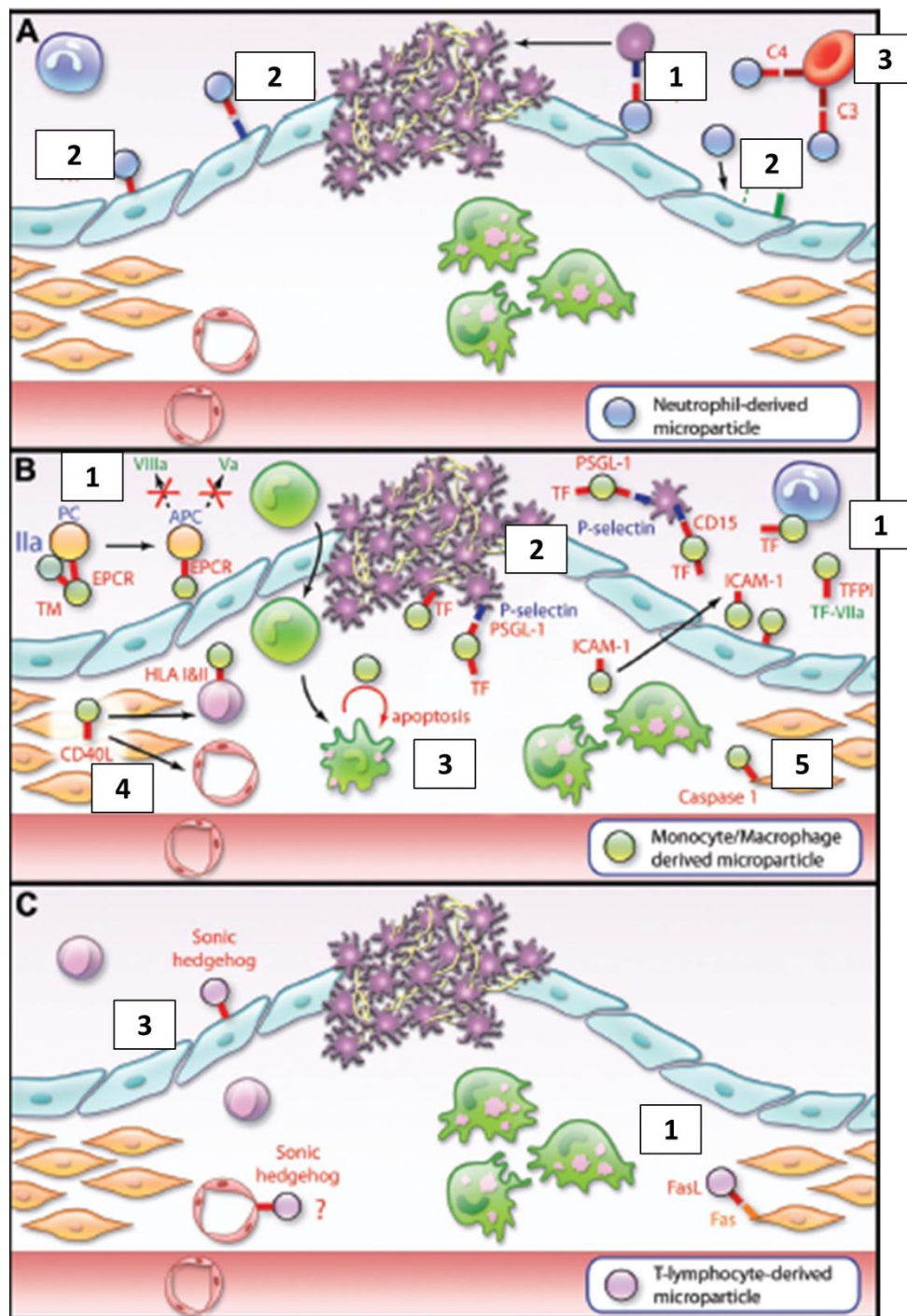


Figure 10 : rôles physiopathologiques des différentes microparticules leucocytaires. **A :** MPL dérivées des neutrophiles. 1 : Activation plaquettaire pour la formation du thrombus, 2 : interaction et activation des cellules endothéliales vers un état proinflammatoire, 3 : interaction avec les globules rouges via le complément C3 et C4 ce qui joue un rôle dans leur clairance et leurs activités

biologiques. **B** : MPL dérivées des monocytes. 1. Activité pro ou anti coagulante par exposition membranaire du facteur tissulaire, de l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire et de la thrombomoduline, et par activation de la protéine C. 2 : Activation plaquettaire par interaction entre le CD15 membranaire ou le PSGL-1 membranaire et la P-sélectine plaquettaire. 3 : Participation à la formation de la plaque d'athérome par exposition et transfert aux cellules endothéliales d'une molécule d'adhésion, ICAM-1, qui facilite le passage des macrophages dans l'espace sous-intimal. Ces macrophages internalisent les LDL oxydés, deviennent des cellules spumeuses et déclenchent un phénomène d'apoptose ce qui augmente le nombre de MPL dérivées des monocytes. 4 : Activation des lymphocytes de la plaque par exposition du CD40L et des molécules HLA I&II. 5 : Activation de l'apoptose des cellules musculaires lisses de la plaque d'athérome via la caspase 1. **C** : MPL dérivées des lymphocytes T. 1 : Activation des cellules musculaires lisses via l'exposition de Fas ligand. 2 : Activation des cellules endothéliales et production de NO via l'expression de Sonic hedgehog. TF : tissular factor ; TFPI : TF pathway inhibitor ; MT : thrombomodulin, PC : protein C, APC : activated protein C ; PSGL-1 : P-selectin glycoprotein 1 ; ICAM-1 : intercellular adhesion molecule 1. D'après une illustration issue de la revue de Angelillo-Scherrer (59).

1.2.4.3. Microparticule leucocytaires comme effecteur de la plaque d'athérosclérose

L'athérosclérose est un phénomène majoritairement inflammatoire secondaire à une adhésion et une perméabilité excessive des cellules endothéliales avec une diapédèse des macrophages dans l'espace sous-intimal qui phagocytent les LDL oxydées et deviennent des cellules spumeuses. Des MP ont été isolées dans la plaque d'athérome carotidienne de 26 patients, et peuvent ainsi participer à ces différentes étapes de genèse de la plaque (60). Ces MP sont issues de multiples types cellulaires dont les macrophages, les lymphocytes, les globules rouges, les CML, et les cellules endothéliales mais pas les plaquettes. Les MPL sont les plus fréquentes (55%) et sont libérées par les leucocytes de la plaque d'athérome. Les MPL d'origine monocyttaire transfèrent la molécule d'adhésion intercellulaire ICAM-1 aux cellules endothéliales ce qui favorisent la migration des macrophages depuis la circulation sanguine vers l'espace sous-intimal par transmigration (61). Les cellules spumeuses dérivées des macrophages de la plaque peuvent aussi déclencher un phénomène d'apoptose et ainsi libérer des MPL dans la plaque, ce qui augmente le nombre de MPL, active la transmigration via l'endothélium et se crée ainsi un cercle vicieux (62, 63).

Un des mécanismes responsable de l'instabilité des plaques d'athérome est l'apparition d'une néoangiogenèse dans l'intima. Les MPL monocytaires sont majoritaires dans la plaque (53% des MPL), expriment le CD40 ligand ce qui favorise la prolifération endothéliale et la néovascularisation initiale (64). En augmentant ainsi la densité de néovaisseaux intraplaques, les MPL sont directement impliquées dans la vulnérabilité d'une plaque athéroscléreuse en favorisant les hémorragies intraplaques donc la rupture de l'endothélium.

La dernière étape qui fragilise la plaque est la survenue d'une ulcération qui provoque un thrombus au contact puis une occlusion ou une embolie artérielle. Les MPL de la plaque sont très thrombogènes et aident à la formation du thrombus en activant la voie de la coagulation dépendante du facteur tissulaire et en activant les plaquettes via l'interaction avec la P-sélectine (60, 65).

Ainsi en favorisant la diapédèse et l'accumulation des macrophages dans l'intima, en activant la néoangiogenèse de la plaque et en favorisant le thrombus intimal, les MPL sont fortement impliquées dans la genèse et la vulnérabilité de la plaque d'athérome.

1.2.4.4. Techniques de dosage

L'identification très récente des MP comme nouveaux biomarqueurs en pathologie humaine explique la grande variabilité des conditions analytiques décrites dans la littérature. Une standardisation est actuellement en cours d'élaboration dans le cadre des Comités scientifiques de standardisation de biologie vasculaire de la Société internationale de Thrombose et d'Hémostase (ISTH).

- Variabilité pré-analytique : la notion importante dans l'analyse des MP circulantes est de contrôler au maximum l'activation cellulaire in vitro afin d'éviter toute agrégation artéfactuelle de MP. Les recommandations de l'ISTH sont résumées dans le **tableau VI**.

Protocole pré-analytique recommandé pour l'analyse des microparticules circulantes

Paramètres pré-analytiques	Recommandations
Nature du tube	Tubes citratés : activation cellulaire minimale
Prélèvement sanguin	Aiguille assez large (21 G minimum) et rejet des premiers millilitres de sang : éviter le recueil de la lésion vasculaire de la ponction veineuse
Délai avant la première centrifugation	≤ 2 heures sinon augmentation du taux de MP notamment les plaquettaires
Transport des tubes	Verticaux : limiter toute agitation des tubes
Protocole de centrifugation	Deux centrifugations successives : 2500 g 15 min à température ambiante
Conservation du « Platelet Free Plasma » PFP	- 80°C et décongélation rapide au bain-marie

Tableau VI : protocole pré-analytique recommandé pour l'analyse des microparticules circulantes, d'après Lacroix *et coll* (66).

- Méthodologies de détection des MP : il existe différentes méthodologies basées sur les caractéristiques des MP. Elles sont résumées dans la **figure 11** en précisant les avantages et les limites de chacune d'elles. La numération des MP et la détermination de leur activité fonctionnelle sont complémentaires, et les résultats obtenus doivent être analysés en tenant compte des limites actuelles de ces différentes méthodes. Des techniques très récentes se développent pour améliorer la détection des MP dont la cytométrie de haute sensibilité calibrée par des billes Mégamix[®].

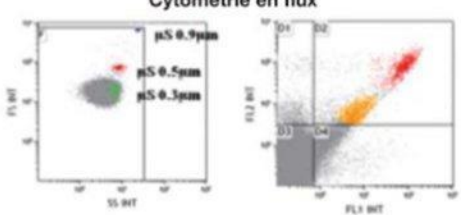
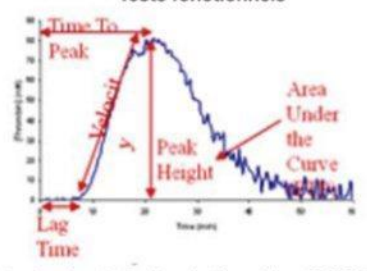
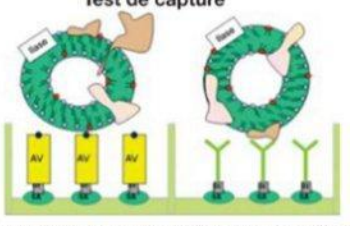
Techniques	Principe	Avantages/Limites
Cytométrie en flux  D'après Robert et al. ATVB 2012 (Gallios, Beckman Coulter)	Numération Taille < 1 μm Phosphatidylsérine (Annexine V) Origine cellulaire Antigènes (Anticorps spécifiques)	Quantification absolue Information sur l'origine cellulaire * Sensibilité limitée Expertise technologique
Tests fonctionnels  Courbe de génération de thrombine (CAT, Stago)	Potentiel procoagulant Mesure d'activité prothrombinase Test de génération de thrombine Potentiel fibrinolytique Test de génération de plasmine	Technique globale Sensible Réalisable en routine * Pas de quantification absolue Pas d'information sur l'origine cellulaire
Test de capture  D'après J.M Freyssinet (Zymuphen, Hyphen Biomed)	Origine cellulaire Phosphatidylsérine/AnnexineV ou Antigènes de la cellule d'origine/ Anticorps spécifiques Potentiel procoagulant Test de génération de thrombine	Sensible Réalisable en routine * Pas de quantification absolue Spécificité limitée

Figure 11 : techniques d'exploration des microparticules plasmatiques, d'après Balducci et coll.

(67).

1.2.4.5. Microparticule leucocytaires comme marqueur des maladies cardiovasculaires

Les MP sont impliquées dans de nombreux phénomènes physiopathologiques (68) : activation endothéliale, apoptose cellulaire, processus inflammatoires, thrombose, rupture de l'homéostasie vasculaire

Plus spécifiquement, plusieurs travaux ont retrouvés une augmentation des MPL chez des patients ayant des FDRCV :

- Hypertension artérielle : Dans une étude comparant l'effet d'un inhibiteur calcique chez 48 sujets hypertendus versus 30 sujets contrôles, les taux de MP plaquettaires et monocytaires étaient significativement plus élevés chez les hypertendus (69). Le traitement par efonidipine réduit les taux de MP plaquettaires et monocytaires dans le groupe des sujets hypertendus et diabétiques. Ainsi, les auteurs concluent que les sujets hypertendus peuvent développer des complications athéromateuses du fait de taux circulant de MP élevé, et le traitement par anticalcique peut réduire ces évènements chez les hypertendus diabétiques.
- Tabagisme : il augmente l'expression du facteur tissulaire sur la membrane des monocytes circulants (70) et sur des macrophages alvéolaires murins mis en culture (71). Il induit aussi l'expression de facteur tissulaire à la surface de macrophages humains mis en culture, ce qui déclenche une apoptose et une libération de MPL thrombogènes (72).
- Diabète : les taux de MP plaquettaires et monocytaires sont corrélés aux complications du diabète et à la gravité de la rétinopathie diabétique (73). Chez les patients hypertendus et diabétiques, le taux de MPL monocytaires baissent après administration de losartan, un antagoniste des récepteurs de l'angiotensine et encore plus après association losartan et d'une statine, la simvastatine (74). Ces résultats suggèrent que la progression des complications athéroscléreuses du diabète est ralentie par les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine et les statines.

De plus, des résultats suggèrent que les MPL sont le reflet de l'étendue infraclinique de la maladie athéromateuse. Les taux plasmatiques de MPL CD11+ sont élevés chez des patients asymptomatiques au niveau cardiovasculaire mais présentant un athérome infraclinique dépisté en

écho-doppler (75). Par contre, les MP plaquettaires et endothéliales sont élevées chez des patients ayant une coronaropathie aigue ou chronique (76, 77). Ainsi, les MPL semblent être un marqueur précoce d'athérome infraclinique, les MP plaquettaires et endothéliales des marqueurs d'apparition plus tardive et signe d'athérome symptomatique.

1.2.5. Lipoprotéine Phospholipase A2 comme biomarqueur original de la plaque carotidienne instable

1.2.5.1. Définition de la Lipoprotéine Phospholipase A2

La Lipoprotéine Phospholipase A2 (Lp-PLA2) est un membre de la superfamille des phospholipases A2 qui sont des enzymes qui hydrolysent les phospholipides (78). Elle est synthétisée par les cellules inflammatoires circulantes notamment les monocytes. Elle a été initialement découverte in vitro comme le PAF-AH (Platelet Activating Factor-Acetylhydrolase) qui dégrade le médiateur inflammatoire PAF (Platelet Activating Factor), ce qui suggérait initialement un rôle athéroprotecteur (79). Les travaux plus récents ont finalement mis en exergue un rôle proathérombotique de la Lp-PLA2 : Hakkinen *et coll.* ont démontré à l'aide d'hybridation in situ et de techniques immunohistochimiques la présence de transcrits ARN messenger de Lp-PLA2 dans les macrophages de plaque athéromateuse humaine, suggérant une synthèse locale par les macrophages de la plaque de Lp-PLA2 (80).

1.2.5.2. LpPLA2 comme effecteur de la plaque d'athérosclérose

La Lp-PLA2 se lie aux lipoprotéines circulantes principalement aux LDL, le complexe LDL-Lp-PLA2 passe alors de la lumière artérielle dans l'espace sous-intimal où les LDL sont oxydés (81). En présence de nombreux LDL oxydés, la Lp-PLA2 hydrolyse les LDL oxydés et produit des lipides bioactifs : la lysophosphatidylcholine (Lyso PC) et des acides gras oxydés (**Figure 12**). La lyso PC et les acides gras oxydés sont des médiateurs inflammatoires qui activent l'expression de molécules d'adhésion endothéliale et les macrophages circulants ce qui aboutit au recrutement de macrophages dans la plaque (82). Les macrophages phagocytent les LDL oxydés, se transforment en cellules spumeuses, s'agrègent pour former le cœur lipidique et sécrètent de la Lp-PLA2 entretenant ainsi l'inflammation de la plaque (83).

Kolodgie *et coll.* ont étudié en 2006 l'expression locale de Lp-PLA2 dans les artères coronaires de 25 patients décédés de mort subite (84). Les plaques instables avec une chape fibreuse fine ou une rupture de l'endothélium avaient un marquage important de Lp-PLA2, intense au niveau du cœur lipidique et autour des macrophages, et supérieur au marquage de plaques stables. En 2008, Manheim *et coll.* se sont eux intéressés à l'expression de Lp-PLA2 au niveau de la plaque carotidienne chez 167 patients opérés d'une endartériectomie (85). Le marquage était plus important dans les plaques de sujets symptomatiques que de sujets asymptomatiques, avec un marquage prédominant au niveau du cœur lipidique avec une colocalisation avec les macrophages et les LDL oxydés. Le marquage Lp-pLA2 était inversement corrélé au taux de collagène de la plaque, témoin de la stabilité de la plaque. Enfin, le taux de Lyso PC dans la plaque était plus important dans les plaques de sujets symptomatiques que de sujets asymptomatiques, ce qui

suggère une participation de la Lp-PLA2 dans la formation de la plaque et dans son évolution vers une plaque instable.

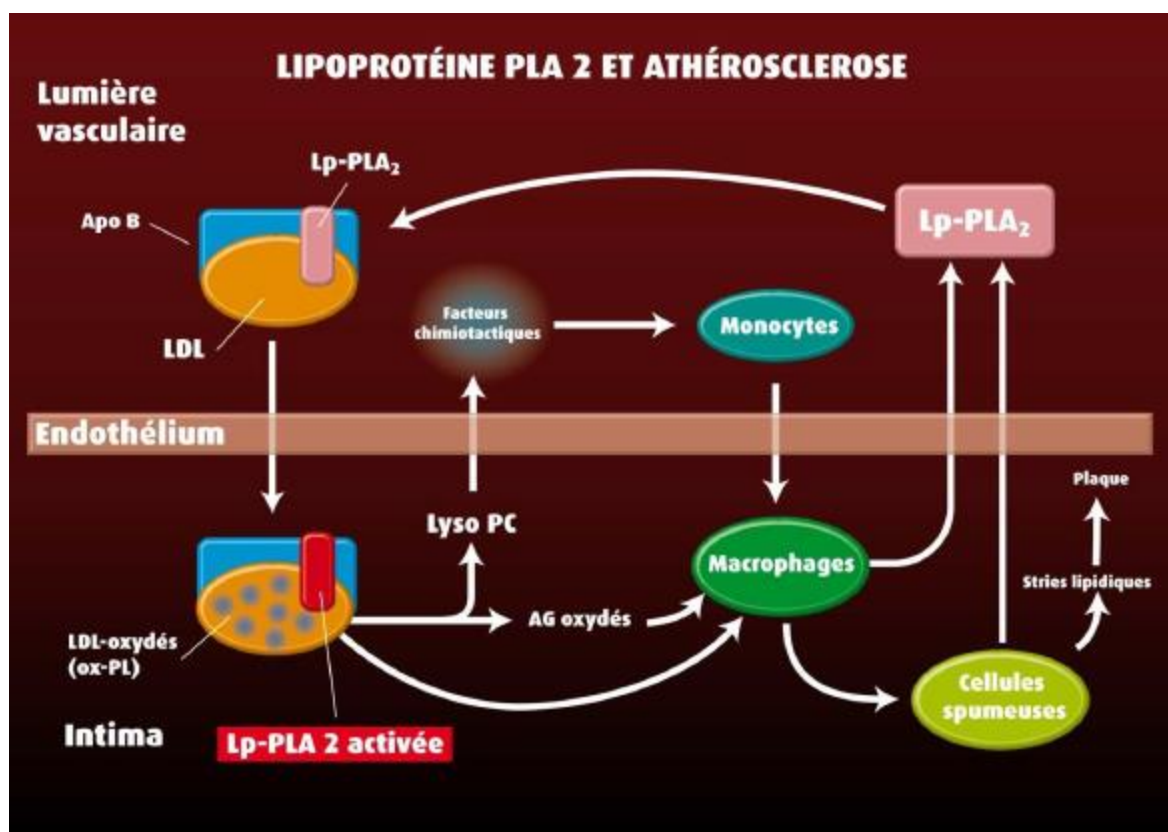


Figure 12 : rôle de la Lp-PLA2 dans la formation et la croissance de la plaque d'athérome. La Lp-PLA2 se lie aux LDL circulantes et le complexe traverse l'endothélium pour rejoindre l'espace sous-intimal. Les LDL sont oxydés ce qui active la Lp-PLA2, elle produit des médiateurs proinflammatoires : la Lyso PC (Lysophosphatidylcholine) et les acides gras oxydés (Acide gras) qui vont attirer les macrophages dans l'espace sous-intimal. Schéma tiré d'un article de la revue Cardiologie pratique 2010, n°935.

1.2.5.3. Techniques de dosage

La Lp-PLA2 est une protéine de 45 kDa composée de 441 acides aminés. Les concentrations de Lp-PLA2 peuvent être étudiées soit par activité enzymatique soit par dosage de la masse enzymatique avec une bonne corrélation entre les deux (86). Le dosage de la Lp-PLA2 n'est pas influencé par une inflammation ou une infection systémique, par contre est influencé par l'âge, le sexe et l'ethnie (87).

En pratique, le dosage du taux quantitatif de Lp-PLA2 est recommandé en première intention avant tout pour des raisons pratiques : le dosage de l'activité de la Lp-PLA2 ne fait pas l'objet d'une commercialisation et est réservé au domaine de la recherche et l'application de résultats portant sur l'activité de la Lp-PLA2 ne pourrait donc pas être réalisée rapidement en pratique clinique quotidienne. De plus, le taux et l'activité de Lp-PLA2 ont montré dans de nombreuses études la même sensibilité dans la détection du risque cardiovasculaire (88) avec une dépendance moindre entre le taux de LDL-cholestérol et la masse de Lp-PLA2 qu'entre le taux de LDL et l'activité de la Lp-PLA2 (89). Enfin, le consensus international de 2008 intégrant la Lp-PLA2 dans l'évaluation du risque de maladie cardiovasculaires utilise le dosage de la masse de Lp-PLA2 et non son activité (90).

Les prélèvements sanguins sont effectués à jeun sur des tubes de collection de plasma EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétra-acétique). Les échantillons sont conservés jusqu'à l'analyse à -70°C. La Lp-PLA2 est mesurée grâce au test de PLACTM (diaDexus, Inc., Sud San Francisco, CA, USA). Le kit ELISA PLAC®, test de diaDexus, est un dosage immunoenzymatique (ELISA) de type « sandwich » qui utilise deux anticorps monoclonaux hautement spécifiques pour la mesure directe de la concentration de Lp-PLA2 dans le plasma ou le sérum humain. Les anticorps utilisés dans cette méthode ont été précédemment décrits par Caslake (91). Des valeurs objectives ont été retenues

dans la littérature pour classer les patients en faible (Lp-PLA2 <200ng/ml), intermédiaire (Lp-PLA2 =200-235ng/ml) ou haut (Lp-PLA2 >235ng/ml) risque cardiovasculaire (90).

1.2.5.4. LpPLA2 comme marqueur des maladies cardiovasculaires

De nombreuses études et revues de la littérature suggèrent un intérêt du dosage de la Lp-PLA2 circulante pour prédire la survenue ou la récurrence d'un événement cardiovasculaire.

Les études menées en prévention primaire sont nombreuses et ont testé la corrélation entre le taux plasmatique de Lp-PLA2 et la survenue d'un accident coronaire ou d'un AVC ou d'athérome infraclinique :

- Prévention primaire et coronaropathie : la première étude qui s'est intéressée au taux de Lp-PLA2 circulante comme marqueur de risque indépendant de survenue d'une coronaropathie est l'étude WOSCPS « West of Scotland Coronary Prevention Study » (92). Les taux circulants de Lp-PLA2 chez 503 hommes hypercholestérolémiques étaient associés au risque d'événements coronariens (Infarctus non fatal, décès d'origine coronaire, revascularisation coronaire) (RR 1,20, IC 1,08-1,34, $p < 0,001$). Cette relation restait significative après ajustement des FDR cardiovasculaires et des paramètres biologiques inflammatoires. Depuis d'autres études (88, 93, 94) ont confirmé cette relation entre taux circulant de Lp-PLA2 et survenue d'un accident coronaire.
- Prévention primaire et AVC : le taux de Lp-PLA2 a été retrouvé comme marqueur indépendant de risque de survenue d'AVC (93, 95, 96) et d'accident ischémique transitoire

(96). Dans l'étude Rotterdam (93), un suivi de 7983 sujets de plus de 55 ans ont été suivis et 110 cas d'AVC ont été répertoriés. Le risque de survenue d'AVC était croissant en fonction des quartiles de Lp-PLA2, y compris en ajustant les FDR cardiovasculaires. Ces résultats ont été confirmés dans l'étude « Malmo Diet and Cancer Study » (95) et dans l'étude « Bruneck Study » (96).

- Prévention primaire et athérome infraclinique : l'association entre Lp-PLA2 et athérome infraclinique est moins claire dans la littérature. Chez 520 patients ayant bénéficié d'un dosage de la Lp-PLA2 7 ans avant la réalisation d'un scanner avec calcul du score de calcifications coronaires, il n'y avait pas de relation entre le taux de Lp-PLA2 et le score de calcification (97). De même, Campo *et coll.* n'avaient pas trouvé de relation entre les taux moyens de Lp-PLA2 et l'épaisseur intima-média carotidienne mesurée en échographie chez 190 siciliens hypercholestérolémiques (98).

De même des résultats encourageants ont été obtenus en prévention secondaire :

- Prévention secondaire et coronaropathie : le taux de Lp-PLA2 mesuré chez 3766 patients ayant une coronaropathie stable était significativement associé au risque de survenue d'un accident cardiovasculaire aigu (99). Les taux de Lp-PLA2 ont été mesurés lors de 3 grandes études menées chez des patients ayant un syndrome coronaire aigu. Deux d'entre elles ont mesuré le taux de Lp-PLA2 au moment de l'accident coronaire et n'ont pas trouvé de relation entre le taux et la récurrence à un an d'accident coronaire (100). La troisième étude a trouvé une relation entre le taux de Lp-PLA2 mesuré 30 jours après un syndrome coronaire aigu et la récurrence d'accident coronaire (101). Ces données suggèrent que le taux de Lp-PLA2

peut augmenter lors d'un accident coronaire aigu et que le dosage doit être fait à distance pour pouvoir prédire la survenue d'un accident coronaire futur.

- Prévention secondaire et AVC : En 2009, Elkind *et coll.* ont retrouvé chez 467 patients ayant présenté un AVC une augmentation du risque de récurrence à 4 ans d'AVC parallèlement au taux de Lp-PLA2 et à son activité (102). De même, Cuchirara *et coll.* ont identifié la Lp-PLA2 comme un facteur prédictif indépendant du risque à court terme (trois mois) de récurrence d'accident neurologique et de mortalité après la survenue d'un accident ischémique transitoire (103).

Pour renforcer ces données, trois méta analyses récentes ont confirmé la corrélation entre la Lp-PLA2 et le risque cardiovasculaire coronarien ou cérébrovasculaire (104-106). En 2008, un consensus américain a recommandé le dosage de la Lp-PLA2 chez des patients à risque cardiovasculaire intermédiaire c'est-à-dire 2 FDR cardiovasculaires. Pour ces patients, si le taux de LDL-cholestérol est en zone cible (inférieur à 1,6 g/l) mais le taux de Lp-PLA2 est supérieur à 235 ng/ml, alors les auteurs suggèrent une intensification du traitement hypolipémiant pour une cible de LDL inférieure à 1,3 g/l (90). Enfin, étant donné cette forte corrélation entre Lp-PLA2 et survenue d'athérome, l'industrie pharmaceutique a développé un inhibiteur sélectif de la Lp-PLA2, le darapladib (107), actuellement en phase III de deux études, l'une chez le coronarien stable « Stability – Stabilization of Atherosclerotic plaque By Initiation of darapladib Therapy » dont les résultats sont attendus pour début 2013 (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00799903>) et l'autre chez le patient après un syndrome coronaire aigu « Solid – Stabilization Of plaques using Darapladib » dont les résultats sont attendus en 2014 (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01000727>).

1.3. La dysfonction vasculaire comme cible de stratégies thérapeutiques innovantes de l'ischémie critique des membres inférieurs

1.3.1. Ischémie critique des membres inférieurs : généralités

1.3.1.1. Définition et épidémiologie

L'ischémie critique chronique des membres inférieurs est le stade ultime de l'AOMI survenant après l'ischémie d'effort, et correspondant au niveau d'ischémie qui met en danger à court terme la viabilité du membre affecté. Elle est secondaire à une oblitération des artères des membres inférieurs le plus souvent d'origine athéromateuse et survient quand le débit sanguin devient insuffisant pour assurer le métabolisme des tissus à l'état basal de repos. L'histoire naturelle de l'ischémie critique est une évolution inéluctable vers la nécrose tissulaire et l'amputation s'il n'y a pas une intervention permettant d'améliorer la perfusion artérielle. Il est donc important de la diagnostiquer avec précision ce qui n'est pas toujours simple d'autant plus que de nombreuses définitions ont été proposées. Le terme « ischémie critique chronique » est apparu dans les années 1990 pour essayer de mieux quantifier le degré d'ischémie (108). Selon les recommandations internationales TASC II (TransAtlantic Inter-Society Consensus), l'ischémie critique est une manifestation de l'AOMI regroupant des patients avec des douleurs ischémiques de repos typiques ou avec des lésions cutanées ischémiques (ulcères ou gangrènes) datant de plus de 15 jours (109). Elle regroupe les stades III et IV de la classification de Leriche et Fontaine et les stades II et III de la classification de Rutherford (**Tableau VII**). Toujours selon ces recommandations, le diagnostic est clinique mais doit être confirmé si cela est possible par des mesures objectives : les douleurs ischémiques de repos s'observent habituellement pour une pression systolique à la cheville

inférieure à 50mmHg et une pression systolique au gros orteil inférieure à 30mmHg ; les patients ayant des troubles trophiques d'origine ischémique ont généralement une pression systolique à la cheville inférieure à 70mmHg et une pression systolique au gros orteil inférieure à 50mmHg. Cette définition a été reprise récemment par les recommandations européennes de Cardiologie (1). Il faut savoir cependant que ces chiffres sont hétérogènes en fonction des recommandations et des auteurs et qu'il n'y a pas de consensus général pour définir les paramètres hémodynamiques nécessaires à établir le diagnostic d'ischémie critique. Ainsi, la Haute Autorité de Santé en France donne comme définition à l'ischémie critique, l'association de douleur de décubitus ou de troubles trophiques avec une pression systolique à la cheville inférieure à 50mmHg et une pression systolique au gros orteil inférieure à 30mmHg (110). Il faut cependant savoir que dans certaines situations, l'étiologie ischémique d'un ulcère est difficile à affirmer et on retrouve des valeurs objectives hémodynamiques plus élevées, car plusieurs causes sont intriquées : traumatique, veineuse, infectieuse, neuropathique, mais l'ulcère ne guérit pas du fait de la sévérité des lésions artérielles sous-jacentes et il faudra prendre alors le patient en charge comme une ischémie critique vraie.

LERICHE ET FONTAINE		RUTHERFORD		
STADE	CLINIQUE	GRADE	CATEGORIE	CLINIQUE
I	Asymptomatique	0	0	Asymptomatique
Ila	Claudication légère	I	1	Claudication légère
Ilb	Claudication modérée à sévère	I	2	Claudication modérée
		I	3	Claudication sévère
III	Douleur de repos	II	4	Douleur de repos
IV	Ulcère ou gangrène	III	5	Nécrose tissulaire mineure
		III	6	Nécrose tissulaire majeure

Tableau VII : classification de l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs selon Leriche et Fontaine, et Rutherford. Claudication légère : périmètre de marche > 200m ; Claudication modérée : périmètre de marche entre 100 et 200m ; Claudication serrée : périmètre de marche < 100m.

L'AOMI a une prévalence qui varie en fonction des études mais on peut l'estimer à moins de 5% avant 50 ans, autour de 10% jusqu'à 65 ans et de plus de 25% chez les personnes de plus de 80 ans. L'AOMI se révèle initialement : lors d'un examen de dépistage chez un patient asymptomatique dans 20 à 50%, par une ischémie d'effort dans 10 à 40% et comme une ischémie critique dans environ 1 à 3%. L'ischémie critique représente environ 5 à 10 patients pour 10 000 habitants dans la population européenne ou nord-américaine (109, 111). Les FDR cardiovasculaires les plus impliquées dans l'évolution vers une ischémie critique sont : le diabète (risque multiplié par 4), le

tabagisme (risque multiplié par 3) et l'âge de plus de 65 ans (risque multiplié par 2). Une atteinte athéromateuse polyartérielle est fréquente chez ces patients : dans le registre REACH portant sur 67 888 patients de plus de 45 ans avec plus de trois FDR cardiovasculaires, 4,7% des patients avaient une AOMI seule, 4,7% avaient une AOMI et une coronaropathie, 1,2% avaient une AOMI et une atteinte cérébrale et 1,6% avaient une atteinte des trois territoires artériels (112). La prise en charge initiale d'une ischémie critique se fait par amputation dans 25% des cas, par un traitement médical dans 25% des cas et par une revascularisation dans seulement 50% des cas. L'ischémie critique est une maladie grave potentiellement mortelle : à un an du diagnostic, seuls 25% sont améliorés et ne sont plus au stade d'ischémie critique, 20% présentent une ischémie critique évolutive, 30% ont subi une amputation majeure (au-dessus de la cheville) et 25% sont décédés (109).

1.3.1.2. Etat des lieux de la prise en charge actuelle et limites

Les objectifs principaux du traitement de l'ischémie critique sont : supprimer les douleurs, cicatriser les ulcères, contrôler les infections de membre, éviter une amputation, accroître l'autonomie, améliorer la qualité de vie et prolonger la survie. Pour atteindre ces objectifs, la plupart des patients ont besoin d'une procédure de revascularisation chirurgicale ou endovasculaire. En effet, le but est de restaurer un flux continu pulsatile sur au moins un axe artériel jusqu'au pied pour assurer le sauvetage du membre. La prise en charge de l'ischémie critique est bien codifiée : il faut définir si le patient est candidat ou non à une revascularisation. Cela nécessite un bilan complet des FDR cardiovasculaires et opératoires et une concertation multidisciplinaire incluant idéalement un médecin vasculaire, un chirurgien vasculaire, un cardiologue, un radiologue vasculaire et un

anesthésiste. Le patient non candidat à une revascularisation est défini par : patient non éligible à une revascularisation (risque opératoire majeur, comorbidité lourde grevant la survie ou l'autonomie), impossibilité technique de revascularisation, et absence de bénéfice attendu (gangrène extensive). L'algorithme de traitement de l'ischémie critique est résumé dans les recommandations TASC II « TransAtlantic Inter-Society Consensus » (**Figure 13**).

Lorsqu'une revascularisation est possible, il est essentiel de choisir la meilleure méthode de revascularisation définie par un équilibre entre la gravité des lésions artérielles et le risque opératoire du patient. Il existe actuellement deux modalités thérapeutiques : la chirurgie dite « classique » et le traitement endovasculaire. Les avantages de la chirurgie sont la bonne perméabilité primaire et la durabilité à long terme. Les avantages des techniques endovasculaires sont une morbidité opératoire et un coût plus faibles. En constatant que les traitements proposés pour une même pathologie variaient en fonction des pays et des disponibilités matérielles, et par souhait d'uniformisation du langage médical de l'AOMI, les recommandations TASC ont été publiées en 2000 puis révisées en 2007 « pour une meilleure prise en charge et une nomenclature de classification des lésions artérielles » (109, 113). Une classification des lésions artérielles basée sur leur localisation anatomique a ainsi été proposée pour déterminer en fonction de cette classification la meilleure technique de revascularisation, chirurgicale versus endovasculaire. Le traitement endovasculaire est un bon compromis entre le bénéfice attendu en termes de sauvetage de membre et le risque opératoire, il est de plus en plus réalisé en première intention d'autant plus que ces dernières années ont été l'avènement de nouvelles techniques comme par exemple l'angioplastie sous-intimale. Cette technique consiste en un passage et une progression dans l'espace sous-intimal d'un guide hydrophile qui peut être dirigé pour la réentrée dans la lumière une fois l'obstacle franchi. Une étude de 2006 a publié de bons résultats chez 46

patients atteints d'ischémie critique et bénéficiant d'une angioplastie sous-intimale des artères de jambes avec une perméabilité secondaire de 55% et un taux de sauvetage de membre de 87% à deux ans (114).

Dans les cas où la revascularisation est impossible anatomiquement ou risquée du fait de comorbidités lourdes, les options thérapeutiques restent très limitées actuellement. Il faut soulager la douleur, éviter les positions vicieuses qui aggravent les ulcères, lutter contre la dénutrition et les infections. Les soins locaux prodigués à ces patients sont capitaux pour améliorer la cicatrisation. La prise en charge des FDR cardiovasculaires associée au « Best Medical Treatment » permet de réduire la progression de la maladie athéromateuse et la mortalité coronarienne. Chez les patients en ischémie critique, la mortalité cardiovasculaires est de 13% à 6 mois, de 19 à 25% à un an et de plus de 60% à 5 ans (115). Concernant les traitements pharmacologiques directement ciblés sur les artères des membres inférieurs, les vasoactifs type naftidrofuryl par voie intraveineuse n'ont pas montré leur efficacité en comparaison à un placebo (110). Les prostaglandines sont à envisager en cas d'impossibilité de revascularisation. Il s'agit de vasodilatateurs puissants qui diminuent l'activité plaquettaire et leucocytaire, protègent l'endothélium et stimulent l'angiogenèse. Parmi les différentes molécules disponibles, l'iloprost, un analogue stable de la prostaglandine I2 administré en perfusion intraveineuse sur plusieurs semaines, est la plus aboutie et utilisée. Elle semble apporter un bénéfice chez environ 40% des patients non revascularisables cependant l'efficacité est très limitée (109). Enfin l'oxygénothérapie hyperbare peut aider à la cicatrisation de troubles trophiques après revascularisation ou chez des patients qui ne sont pas candidats à une revascularisation mais l'efficacité est très limitée au dépend d'un traitement couteux (116).

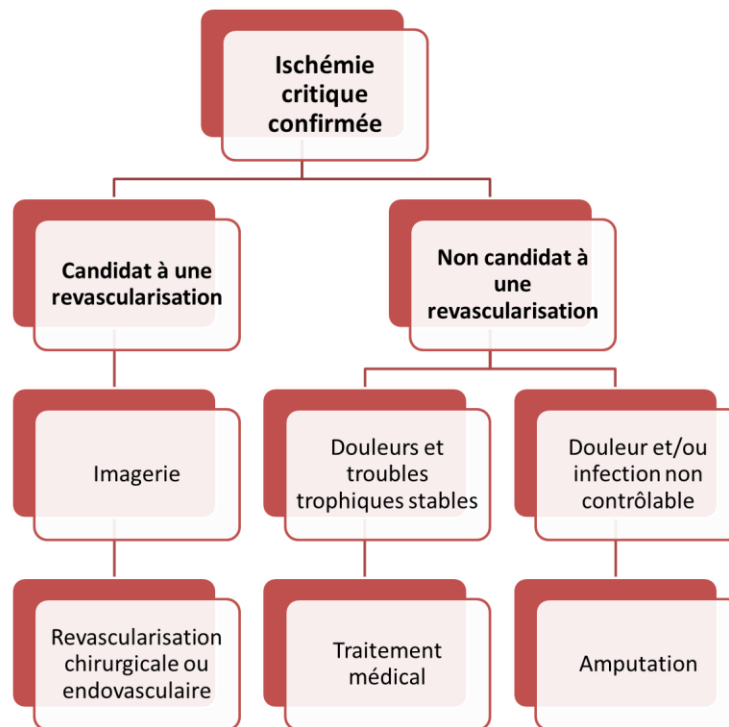


Figure 13: algorithme de prise en charge du patient en ischémie critique selon les recommandations TASC II (109).

Malgré tous les progrès techniques de la médecine actuelle, l'amputation reste la seule option thérapeutique chez 25 à 30% des patients en ischémie critique. L'amputation est réalisée principalement quand les lésions vasculaires sont inaccessibles à une revascularisation. Elle peut aussi être indiquée lors d'une infection majeure non contrôlée médicalement, une gangrène étendue et chez des patients grabataires. Il faut savoir aussi poser l'indication chez des patients jeunes pour lesquels des traitements longs avec peu d'espoir de guérison retarderaient une reprise rapide de la vie active après appareillage. Il est admis que le niveau d'amputation doit être le plus distal possible, la charge de travail nécessaire à la marche étant nettement plus importante pour les amputations effectuées au-dessus du genou. Malheureusement, seules 60% des amputations sous le genou guérissent en première intention, 15% nécessitent une reprise chirurgicale rapide pour

une amputation au niveau supérieur et la mortalité périopératoire est très élevée estimée à 10% (109). Face à cette situation d'impasse thérapeutique, Il serait intéressant de proposer une autre alternative à l'amputation pour cette catégorie de patients en échec ou dans l'impossibilité de revascularisation, et c'est pour eux que la recherche sur l'angiogenèse thérapeutique prend tout son intérêt.

1.3.2. Angiogenèse et progéniteurs endothéliaux circulants comme outils de réparation et de régénération de l'endothélium : éléments de physiopathologie

1.3.2.1. Vasculogenèse et angiogenèse embryonnaires

Le développement embryonnaire du système vasculaire est un processus complexe qui fait intervenir deux mécanismes : la vasculogenèse et l'angiogenèse. La vasculogenèse est à l'origine de la vascularisation de l'embryon. Les cellules mésodermiques se différencient en hémangioblastes et forment des îlots sanguins primitifs. Les hémangioblastes se différencient ensuite en angioblastes, précurseurs des cellules endothéliales. Les îlots sanguins fusionnent entre eux et vont former des structures tubulaires à l'origine du plexus vasculaire primitif. L'angiogenèse est l'étape suivante qui permet l'expansion et le remodelage du réseau vasculaire primitif : des néovaisseaux se forment à partir des vaisseaux préexistants (117). L'angiogenèse se déroule en plusieurs étapes : vasodilatation et perméabilisation vasculaire de la zone destinée à former le néovaisseau, libération de protéases par les cellules endothéliales qui dégradent la membrane basale et la matrice

extracellulaire, prolifération et migration des cellules endothéliales sous l'influence de différents stimuli, et enfin formation et stabilisation des néovaisseaux (118).

Chez l'adulte, l'angiogenèse s'observe lors de situations physiologiques (remodelage tissulaire cyclique dans le système génital féminin ou formation placentaire) et lors de phénomènes pathologiques comme les processus de réparation tissulaire, d'ischémie tissulaire ou de croissance tumorale.

1.3.2.2. Concept de vasculogenèse adulte

L'angiogenèse a été longtemps considérée comme le seul mécanisme de néovascularisation chez l'adulte jusqu'en 1997, date à laquelle Asahara *et coll.* établissent le concept de vasculogenèse post-natale en isolant des cellules immatures, les progéniteurs endothéliaux circulants (PECs), dans le sang périphérique d'adulte humain (119). Ces cellules sont isolées à partir de cellules mononuclées du sang et expriment les marqueurs CD34+ et VEGFR2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2). Elles sont capables de se différencier *in vitro* en cellules qui expriment des marqueurs membranaires de cellules endothéliales différenciées : VEGFR2, CD31+, VE-cadhérine et facteur Willebrand. Ces cellules sont aussi capables de former des néovaisseaux *in vivo* au niveau de sites ischémiques chez la souris. Ainsi, les PECs seraient des cellules souches immatures circulantes qui participeraient à la réparation vasculaire chez l'adulte en situation d'ischémie.

1.3.2.3. Origine des PECs

L'origine des PECs n'est pas encore clairement identifiée (**Figure 14**) mais la première hypothèse est qu'ils dérivent principalement de cellules médullaires. Les lignages dont ils seraient issus restent incertains. Ils pourraient être issus de cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui expriment les marqueurs CD34+ et CD133+ (120). Il existe aussi des cellules souches mésenchymateuses (CSM) médullaires qui peuvent se différencier en cellules endothéliales et améliorer la néovascularisation *in vivo* (121, 122). Enfin des cellules souches multipotentes adultes (MAPC, Multipotent Adult Progenitor Cells) ont été isolées dans la moelle osseuse d'adulte et sont capables de se différencier *in vitro* en cellules endothéliales et contribuent *in vivo* à la néoangiogenèse lors de la croissance tumorale et de la cicatrisation (123).

En parallèle, un nombre croissant d'études a démontré l'existence de cellules souches résidentes dans les tissus en dehors de la moelle osseuse et suggéré que la moelle osseuse n'est pas l'unique réservoir de PECs. Des cellules capables de se différencier en cellules endothéliales ont été retrouvées dans le tissu adipeux et dans le tissu cardiaque (124, 125). En 2005, Ingram *et coll.* ont apporté la preuve de l'existence de PECs au sein même des vaisseaux : parmi les cellules endothéliales de la paroi vasculaire peuvent être identifiées des cellules capables d'un potentiel clonogénique et d'une prolifération élevés, propriétés caractéristiques des PECs (126). La présence de cellules progénitrices dans la paroi vasculaire suggère qu'elles pourraient participer à la vasculogenèse adulte de façon directe et rapide.

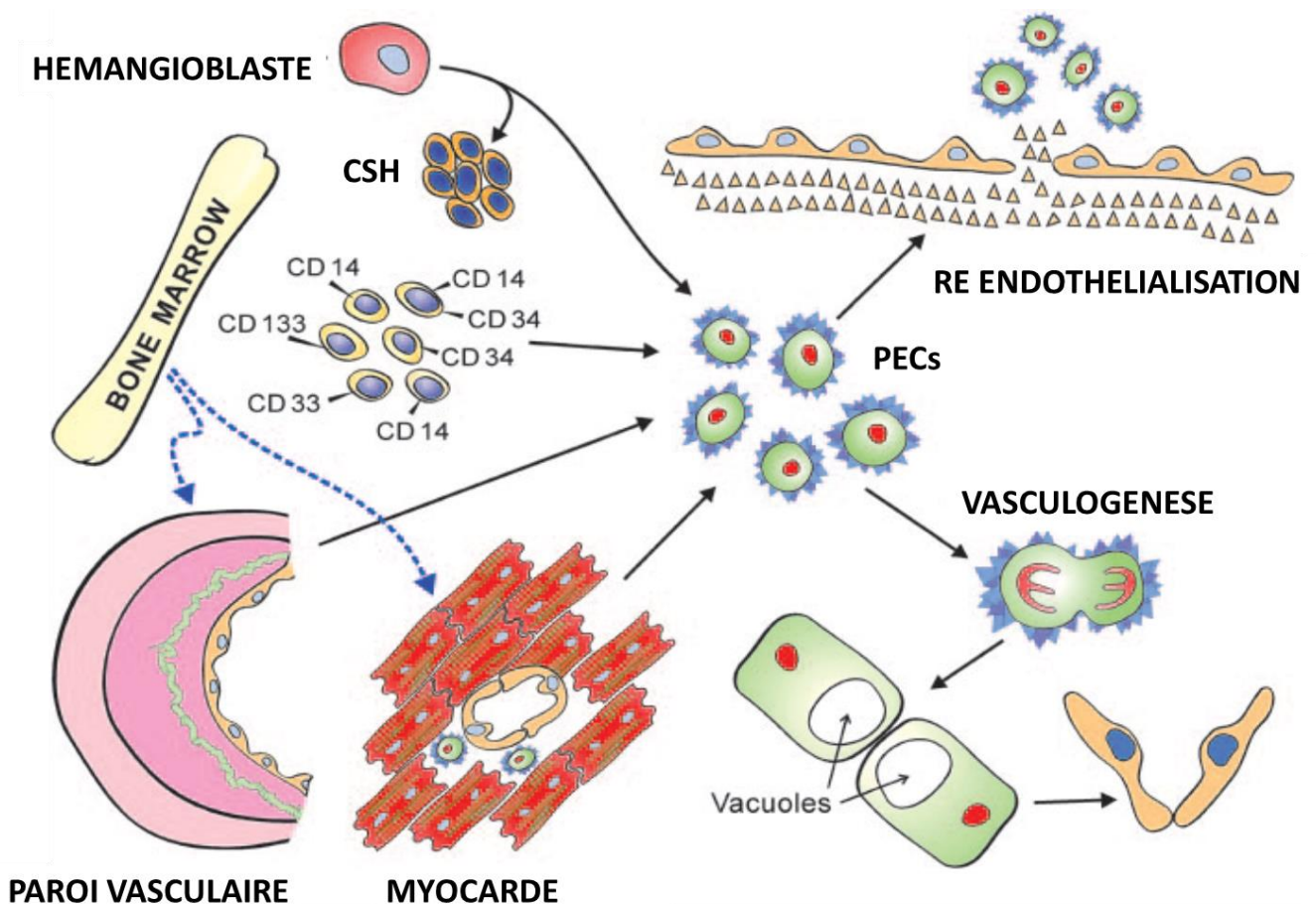


Figure 14 : origine multiple des PECs : la moelle osseuse, la paroi vasculaire, le tissu cardiaque, d'après Leri *et coll.* (127). CSH : cellules souches hématopoïétiques ; PECs : progéniteurs endothéliaux circulants.

1.3.2.4. Mécanismes de mobilisation et de recrutement des PECs

La mobilisation des PECs à partir de la moelle osseuse est une étape clé de la vasculogénèse adulte permettant de recruter *in situ* un nombre suffisant de progéniteurs nécessaires aux phénomènes de régénération et réparation vasculaire. Les facteurs angiogéniques et les facteurs de croissance hématopoïétiques constituent des médiateurs clés du processus de mobilisation. Les PECs

expriment un récepteur au VEGF, VEGFR-2, et un récepteur au SDF-1, CXCR4, ce qui suggère que les PECs sont capables de répondre à une stimulation par ces deux molécules (128). Dans des conditions physiologiques, l'ischémie tissulaire induit la sécrétion de SDF-1 et de VEGF (129). Une mobilisation rapide de PECs est observée après administration de VEGF chez la souris (130) ou de SDF-1 (131). D'autres molécules pourraient participer à la mobilisation des PECs : le G-CSF (Granulocyte colony-stimulating factor) et l'érythropoïétine (EPO). L'EPO augmente significativement la mobilisation des PECs dans des modèles expérimentaux chez la souris (132) et des PECs CD34+CD45+ dans le sang périphérique de l'homme (133).

Après mobilisation à partir de leur réservoir médullaire, les PECs sont recrutés spécifiquement dans les sites de néoangiogenèse et participent à la régénération tissulaire. La sécrétion de facteurs chimiotactiques tel le SDF-1 est le premier processus déclenchant le recrutement spécifique des PECs (134). Dans les sites ischémiques, l'hypoxie permet l'activation de l'endothélium quiescent qui va permettre l'adhésion des PECs par l'intermédiaire d'intégrines et leur transmigration endothéliale (135). Les PECs sont ensuite doués d'une capacité d'invasion du tissu ischémié notamment par l'intermédiaire de la sécrétion de MMP (136). Enfin, les PECs sont capables de s'incorporer aux vaisseaux néoformés grâce à une différenciation terminale vers la lignée endothéliale. Ces processus de mobilisation et de recrutement sont résumés dans la **figure 15**.

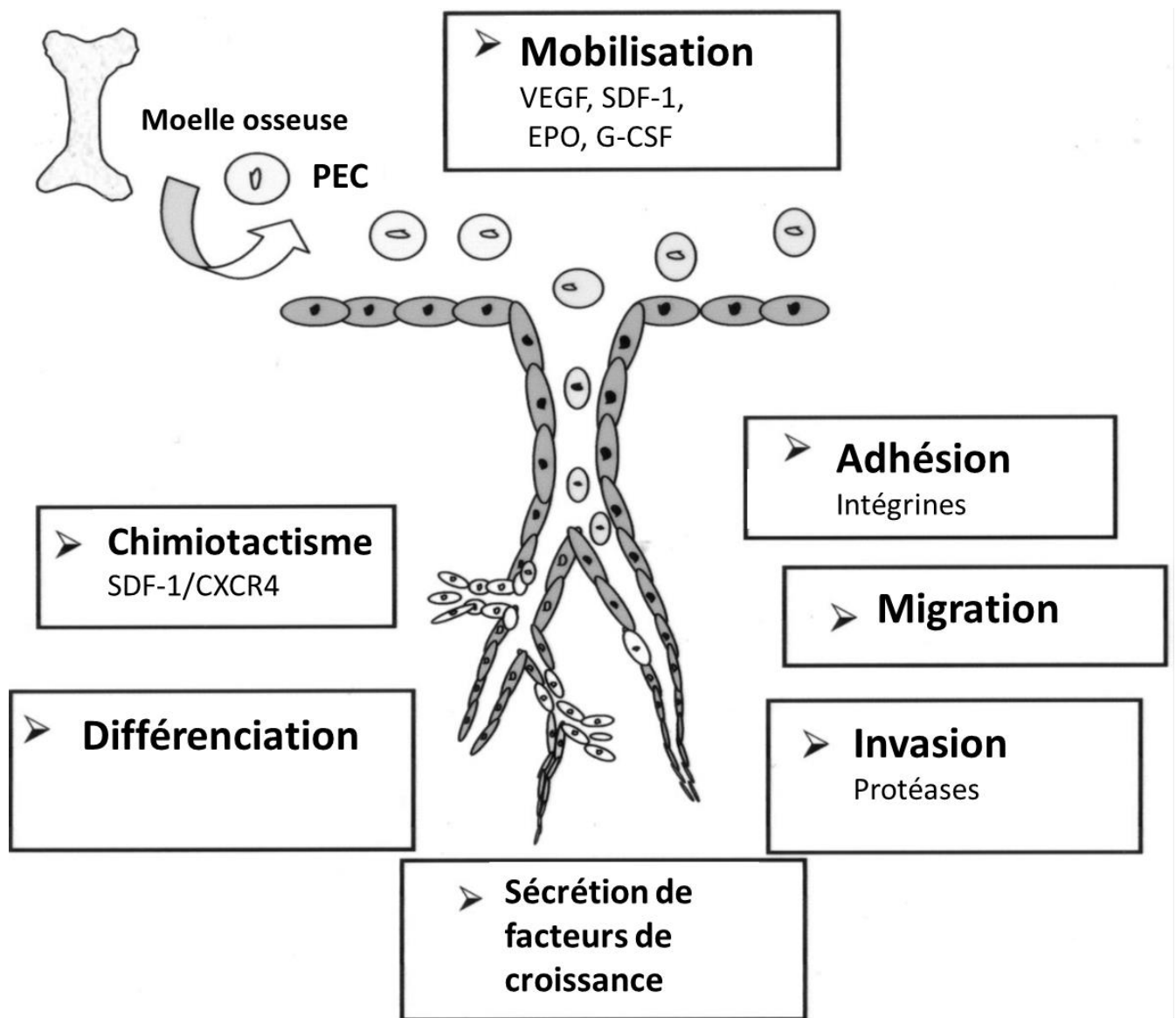


Figure 15 : mécanismes de recrutement des PECs au site ischémique : étapes de mobilisation, de chimiotactisme, d'adhésion endothéliale, de transmigration, d'invasion et de différenciation *in situ*. D'après les travaux d'Urbich *et coll.* (137). VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor ; SDF-1 : Stroma cell Derived Factor-1 ; G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor.

1.3.2.5. Hétérogénéité et nomenclature des PECs

Des études récentes ont montré que les cellules ayant des propriétés d'angioblastes, regroupées sous le terme générique de PECs, représentent en fait une population cellulaire hétérogène. Cette hétérogénéité phénotypique dans la littérature est due au fait de l'obtention en culture de deux types de cellules : des cellules précoces « Early EPC » et des cellules tardives « Late EPC » (138-140)} **(Figure 16)**. Les CFU-EC (Colony Forming Unit-Endothelial Cells) et les CAC (Circulating Angiogenic Cells) de la littérature correspondraient aux cellules précoces alors que les ECFCs (Endothelial Colony Forming Cells) correspondraient aux cellules tardives. Les PECs précoces possèdent un haut potentiel de sécrétion de facteur de croissance mais sont dépourvus de capacité de prolifération tandis que les PECs tardifs peuvent se multiplier dans un milieu adéquat pendant plus de 5 semaines, ce qui rend ces dernières cellules intéressantes comme produit de thérapie cellulaire. Les PECs tardifs ont aussi une meilleure prolifération *in vitro* et une meilleure réactivité aux facteurs de croissance que les cellules endothéliales matures (141).

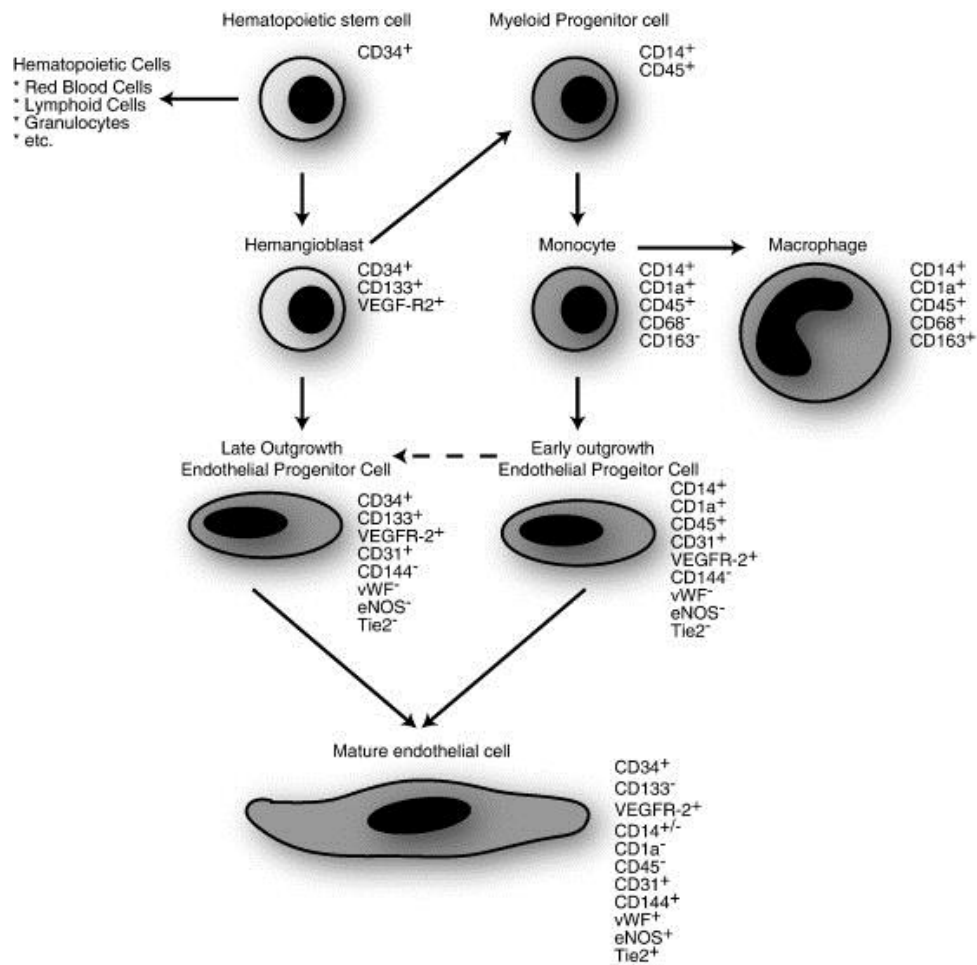


Figure 16: origine des progéniteurs endothéliaux circulants, différenciation et marqueurs membranaires (140).

Récemment, devant l'absence de définition bien spécifique des PECs, Timermans *et coll.* ont proposé une nomenclature en différenciant les EC-like cells (Endothelial Cells-like cells), les EOCs (Endothelial Outgrowth Cells) et les CECs (Circulating Endothelial Cells) (**Tableau VIII**) (142). Les PECs précoces sont issus de lignées hématopoïétiques tandis que les PECs tardifs sont issus de lignées médullaires ou de la paroi vasculaire.

EC-like cells	EOCs	CECs
EPCs, ECs, CFU-ECs, CACs, early EPCs	EPCs, ECs, CFU-ECs, ECFCs, late EPCs	Circulating Endothelial Cells
Apparaissent après 4 à 21 jours de culture	Apparaissent après plus de 7 jours de culture	Faible potentiel prolifératif
Cellules rondes non confluentes	Cellules polygonales formant des colonies	Issues du mur vasculaire
Marqueurs endothéliaux et hématopoïétiques (CD45, CD14)	Marqueurs endothéliaux mais non hématopoïétiques (CD45-, CD14-, CD133-)	Phénotypes similaires aux EOCs
Liaison avec les lectines et absorption de LDL acétylées	Liaison avec les lectines et absorption de LDL acétylées	Pas de marqueurs hématopoïétiques
Maintien d'un potentiel et/ou de fonctions hématopoïétiques	Pas de potentiel hématopoïétique	Pas de potentiel ni de fonctions hématopoïétiques
Faible potentiel prolifératif	Fort potentiel prolifératif	
Pas de formation de tubes vasculaires <i>in vitro</i> en matrigel	Formation de tubes vasculaires <i>in vitro</i> en matrigel et <i>in vivo</i>	
Améliorent la néovascularisation <i>in vivo</i>	Améliorent la néovascularisation <i>in vivo</i>	
Issues de lignées hématopoïétiques CD45+	Issues de lignées médullaires (CD34+, CD45-, CD133-) et probablement du mur vasculaire	

Tableau VIII : caractéristiques des cellules endothéliales progénitrices selon Timmermans *et coll.*

(142) : EC-like cells, EOCs ou Endothelial Outgrowth Cells, CECs ou Circulating Endothelial Cells.

EPCs : Endothelial Progenitor Cells, ECs : Endothelial Cells, CFU-ECs : Colony Forming Unit-ECs, CACs

: Circulating Angiogenic Cells.

La **figure 17** résumant les interactions entre PECs précoces et tardifs dans les phénomènes de réparation vasculaire et de formation de néovaisseaux (143).

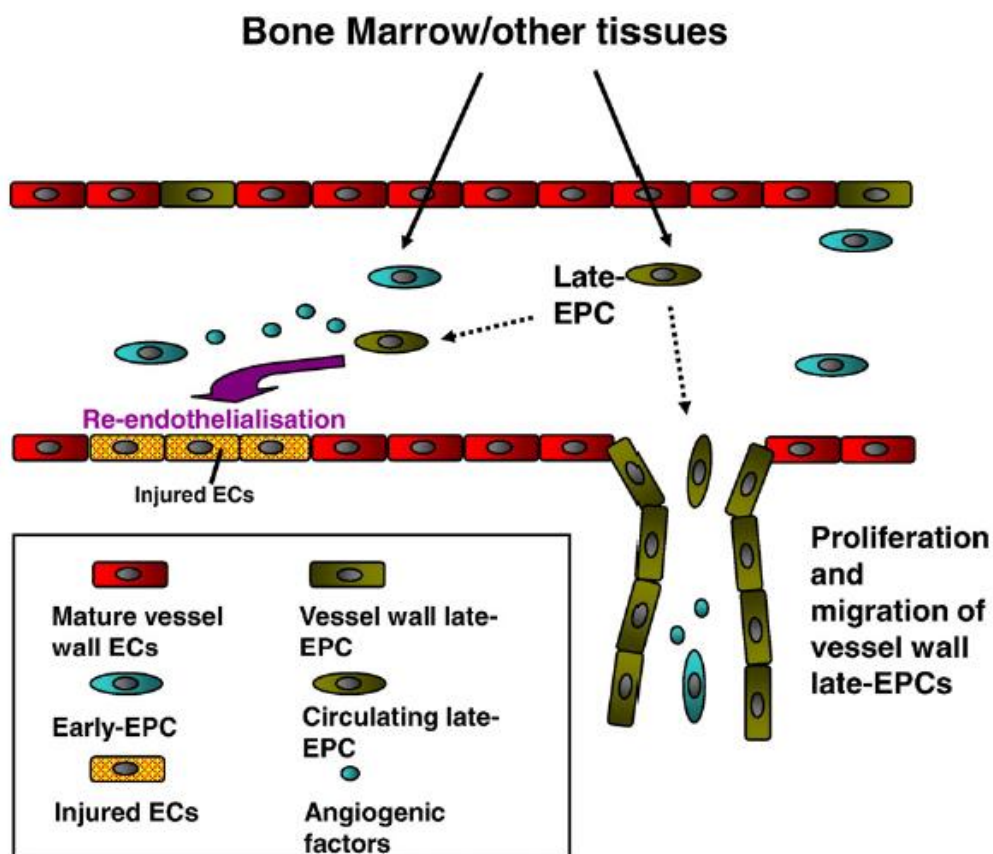


Figure 17 : interaction entre PECs précoces et tardifs dans les phénomènes de réparation vasculaire. Les PECs sont issus de la moelle osseuse. Les PECs précoces ont une fonction paracrine, les PECs tardifs participent à la formation de néovaisseaux grâce aux mécanismes de prolifération et de migration (143).

1.3.3. Angiogenèse thérapeutique : thérapie génique et cellulaire

L'ischémie critique des membres inférieurs est une situation d'impasse thérapeutique pour près d'un tiers des patients qui doivent alors subir une amputation. C'est pour éviter cette issue irréversible que les stratégies de thérapie génique et cellulaire sont actuellement en cours

d'évaluation, le but étant de favoriser l'angiogenèse post-natale à l'aide de facteurs de croissance et/ou de cellules progénitrices endothéliales. Deux voies de recherche sont possibles pour tenter de dépasser les limites de la réponse angiogénique naturelle : « **la thérapie génique** » dont le principe est d'augmenter les concentrations locales de facteurs angiogéniques dans le membre inférieur par administration de gènes codant pour un facteur angiogénique ; ou « **la thérapie cellulaire** » dont le principe est d'administrer des cellules progénitrices endothéliales qui participent à la formation de néo-vaisseaux ou qui synthétisent un cocktail de facteurs croissance à proximité de nouveaux vaisseaux en formation. Les avantages communs de ces techniques sont la stimulation de la néoangiogenèse locale au niveau du site ischémique, les risques communs sont inhérents à ces bénéfices : ces techniques peuvent aussi stimuler la néoangiogenèse extravasculaire c'est à dire la croissance tumorale et la prolifération d'une rétinopathie diabétique. Le risque spécifique de la thérapie génique est la manipulation génétique qui en fait une voie de seconde intention.

1.3.3.1. Thérapie génique

Née dans les années 1980, la thérapie génique repose sur l'introduction de matériel génétique à l'aide d'un vecteur, afin qu'il produise un effet thérapeutique. C'est un outil thérapeutique prometteur des maladies cardiovasculaires qui peuvent ainsi surmonter l'instabilité inhérente à l'ischémie des protéines angiogéniques en facilitant la production locale soutenue de ces facteurs angiogéniques. Cette approche a été initialement développée par l'équipe d'Isner en 1996, et reprise depuis par plusieurs équipes (144) Plusieurs méthodes de transfert de gène dans les cellules endothéliales ont été évaluées mais le succès de cette technique dépend de l'efficacité avec laquelle le gène est introduit et exprimé dans la population cellulaire cible. Actuellement,

l'approche privilégiée est celle utilisant l'injection d'un plasmide nu exprimant un facteur de croissance (préférentiellement le VEGF ou le FGF-1, Fibroblast Growth Factor-1) directement dans les muscles du mollet et de la cuisse, qui vont intégrer le plasmide et ensuite sécréter le facteur de croissance d'intérêt.

La première étude effectuée en double aveugle contre placebo est l'étude TALISMAN « Therapeutic Angiogenesis Leg Ischemia Study for the Management of Arteriopathy and Non-healing ulcers », une étude de phase II multicentrique européenne (145). Elle a testé l'efficacité d'un plasmide nu codant pour le FGF-1 et injecté par voie intramusculaire dans la face postérieure des mollets de 125 patients ayant une ischémie critique avec troubles trophiques. Quatre séries de huit injections ont ainsi été réalisées, à J1, J15, J30 et J45. Pour le critère primaire « cicatrisation des ulcères », aucun effet du traitement n'a été constaté. En revanche, la diminution du taux d'amputation à un an était significative. Une tendance favorable a été constatée pour la réduction des décès. Enfin, sur le critère combiné amputation majeure ou décès, le bénéfice du traitement était significatif. Côté sécurité, le risque théorique avec un facteur de croissance est de stimuler la croissance tumorale, la néoangiogénèse de métastases et la rétinopathie chez les diabétiques. Les patients porteurs de tumeurs avaient été éliminés du recrutement. En revanche, des diabétiques avaient été inclus. Aucun effet secondaire n'a toutefois pu être imputé au traitement.

Cette étude a été suivie par TAMARIS « NV1FGF Gene Therapy on Amputation-Free Survival in Critical Limb Ischemia », essai de phase III qui a strictement repris le protocole thérapeutique de TALISMAN : même transgène, même vecteur plasmidique, même schéma d'administration (4 mg administrés en 4 séries de deux injections intramusculaire espacées de 2 semaines) (146). Les 525 patients (70 ans, 70% d'hommes, 53% de diabétiques) présentaient une ischémie critique avec troubles trophiques. Après un an de suivi, aucun bénéfice n'a été obtenu en termes d'amputation

majeure et de décès. Cette thérapie n'a donc pas fait la preuve de son efficacité probablement en raison de la difficulté d'obtenir un gradient de concentration suffisant entre la zone à traiter et le reste de l'organisme, d'une demi-vie tissulaire faible et d'une action trop sélective sur les processus d'angiogenèse *in vivo*. Suite à ces résultats et ces limites difficilement contournables, la recherche s'est concentrée sur le développement et la mise au point de la thérapie cellulaire.

1.3.3.2. Thérapie cellulaire

Le principe de la thérapie cellulaire dans l'ischémie critique est d'apporter localement des PECs comme aide à la néoangiogenèse des tissus ischémiés. L'administration des cellules peut être effectuée par voie locale intramusculaire pour augmenter directement le nombre de cellules dans le tissu ischémique, ou par voie intraartérielle pour augmenter le nombre de cellules au niveau de l'arbre artériel occlus. Le concept de thérapie cellulaire est né dès 1997 lorsque le groupe de Asahara et Isner a mis en évidence des PECs qui, après isolement et amplification *ex vivo*, sont capables de participer à l'angiogenèse dans de multiples modèles animaux d'ischémie (119, 147).

Suite à ces nombreux résultats précliniques, la première étude pilote chez l'homme a été publiée en 2002 par une équipe japonaise, l'étude TACT « Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation » (148). La source de progéniteurs était une préparation autologue de cellules mononucléées non sélectionnées issues de la moelle et la pathologie ciblée était l'ischémie critique des membres inférieurs. Un prélèvement de 500 ml de moelle était réalisé sous anesthésie générale, puis les cellules mononucléées étaient isolées et concentrées dans un volume final de 30 ml. Le nombre total de cellules injectées était compris entre 0,7 et $2,8 \times 10^9$. L'étude a inclus 22

patients ayant une ischémie bilatérale des membres inférieurs. Les 44 membres inférieurs de ces 22 patients ont été randomisés et ont reçu des cellules mononucléées de la moelle osseuse ou des cellules mononucléées issues du sang périphérique. Après inclusion, les patients ont été suivis pendant 4 semaines après greffe puis tous les quatre mois. Après 4 et 24 semaines, une amélioration significative des critères cliniques (douleur de repos, index de pression systolique, périmètre de marche) ainsi que la formation de vaisseaux collatéraux objectivée par angiographie ont été observées dans tous les membres ayant reçu des cellules médullaires (mais pas dans le membre témoin, traité par cellules mononucléées du sang périphérique). La principale critique de cette étude est que les données concernant la cicatrisation des ulcères et le taux d'amputation ne sont pas clairement données et ne font pas parties des critères de jugement de l'étude. Cependant, c'est la première étude à avoir montré l'efficacité et la sûreté de l'implantation de cellules mononucléées médullaire dans l'ischémie des membres inférieurs. Depuis cette étude princeps, de nombreux travaux ont été mené dans l'ischémie critique et sont résumés dans une méta-analyse récente de 2010 (149). Les auteurs ont retenu 37 études sur 108, ces études étaient contrôlées ou non et randomisées ou non. L'index de pression systolique était amélioré de $0,46 \pm 0,04$ avant traitement par cellules mononucléées médullaires versus $0,63 \pm 0,04$ après traitement ($p=0,011$). De même, l'amélioration était significative en ce qui concerne les résultats de la pression transcutanée en oxygène, le périmètre de marche, les douleurs de repos et la cicatrisation des ulcères. Seule deux études contrôlées sont analysables sur le taux d'amputation qui diminue significativement avec le traitement (OR 0,09 ; 95%IC 0,02-0,44 ; $p=0,0005$). La voie d'injection intramusculaire donne de meilleurs résultats que la voie intraartérielle, les cellules mononucléées médullaires donnent de meilleurs résultats que les cellules périphériques mobilisés par le G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor). L'analyse des effets secondaires ne retrouve pas de mauvaise tolérance ou d'effets secondaires graves significatifs. Une revue encore plus récente sur

la thérapie cellulaire via cellules autologues administrées en intramusculaire dans l'ischémie critique a été publiée, elle résume les résultats des deux seules études randomisées retenues par les auteurs (150). L'étude de Tateishi-Yuyama *et coll.* a été exclue car deux traitements étaient administrés (cellules mononuclées médullaires versus périphériques) (148). La première étude a comparé l'injection intramusculaire de cellules mononuclées médullaires au traitement médical optimal chez 29 patients. Il n'y avait pas de différence en termes de douleur ($p=0,37$) et d'index de pression systolique. Par contre on observait une diminution significative du nombre d'amputation ($p=0,026$). Dans la deuxième étude, des injections sous-cutanées de G-CSF étaient effectuées pendant 5 jours puis les PBMC étaient récoltées et injectées par voie intramusculaire dans les mollets en ischémie critique chez 28 patients. Le groupe placebo était le traitement par prostaglandine intraveineux. Une réduction significative de la douleur était obtenue ($p<0,001$) de même qu'une amélioration de la distance de marche (306,4m versus 78,6m ; $p=0,007$) et de l'index de pression systolique moyen (0,13 versus 0,02 ; $p<0,01$). Une réduction des amputations était obtenue (0% versus 36% ; $p=0,007$). Les auteurs de cette revue concluent cependant que ces données sont insuffisantes pour suggérer un réel bénéfice de la thérapie cellulaire dans l'ischémie critique du fait du faible nombre de patients inclus dans les études et du faible nombre d'étude randomisée.

A côté de ces résultats prometteurs mais discrets sur l'amélioration de l'ischémie critique grâce à la thérapie cellulaire, d'autres limites ont été publiées portant notamment : sur le caractère invasif de la ponction médullaire, le faible nombre de cellules progénitrices disponibles et l'altération de leur capacité proangiogène. Plusieurs travaux ont montré en effet une nette atténuation des propriétés biologiques proangiogéniques des PECs avec l'âge des patients ou l'existence d'une pathologie ischémique chronique (151, 152). Il existe aussi une limite quant au type cellulaire exact à utiliser.

Dans la méta-analyse de Fadini *et coll.*, les douleurs de repos étaient plus calmées par les cellules mononuclées périphériques que par les médullaires ($p=0,006$), les résultats étaient inversés pour l'amélioration des ulcères (149). La thérapie cellulaire est donc une voie séduisante pour lutter contre l'amputation des patients en ischémie mais les premiers résultats insuffisants chez l'homme associés à plusieurs limites biologiques nécessitent d'augmenter le potentiel de néovascularisation du produit de thérapie cellulaire.

1.3.4. Stratégie d'optimisation de la thérapie cellulaire par PECs : la stimulation *ex vivo*

1.3.4.1. Principe

Les cellules mononuclées médullaires injectées dans les mollets de patients en ischémie donnent des résultats encourageants mais insuffisants pour un réel bénéfice clinique en termes d'amputation et de cicatrisation d'ulcère. De plus, le prélèvement médullaire est une technique lourde pour des patients fragiles au risque opératoire non négligeable. Une solution séduisante serait d'isoler les PECs tardifs à partir de prélèvements périphériques et de pouvoir : 1/ les amplifier rapidement *ex vivo* en utilisant un pré-traitement par des molécules proangiogéniques, et 2/ améliorer leurs propriétés angiogéniques grâce à ce pré-traitement avant réinjection au site ischémique.

1.3.4.2. Modèles pré-cliniques

Un premier modèle pré-clinique a été publié en 1998 par Couffinhal *et coll.* : il s'agit d'un modèle animal d'ischémie de patte de souris sauvage C57/BL6 développé pour étudier le rôle du VEGF dans la néoangiogenèse post-ischémique (153). Le principe de la chirurgie était de ligaturer l'artère fémorale jusqu'à l'artère saphène, et de l'exciser avec ses collatérales pour mimer une ischémie de patte (**Figure 18**). La reperfusion était analysée à J3, J7, J14, J21, J28 et J35 grâce à un système de laser doppler : la perfusion de la patte opérée était effondrée à J7 puis s'améliorait à J14 pour redevenir normale à J28. Une analyse immunohistochimique de la densité capillaire par anticorps anti-CD31 sur les muscles ischémiés était effectuée à J14 et comparée au muscle controlatéral non ischémié. Ce modèle permet ainsi de mimer une ischémie de membre et de tester ensuite des traitements améliorant la reperfusion.

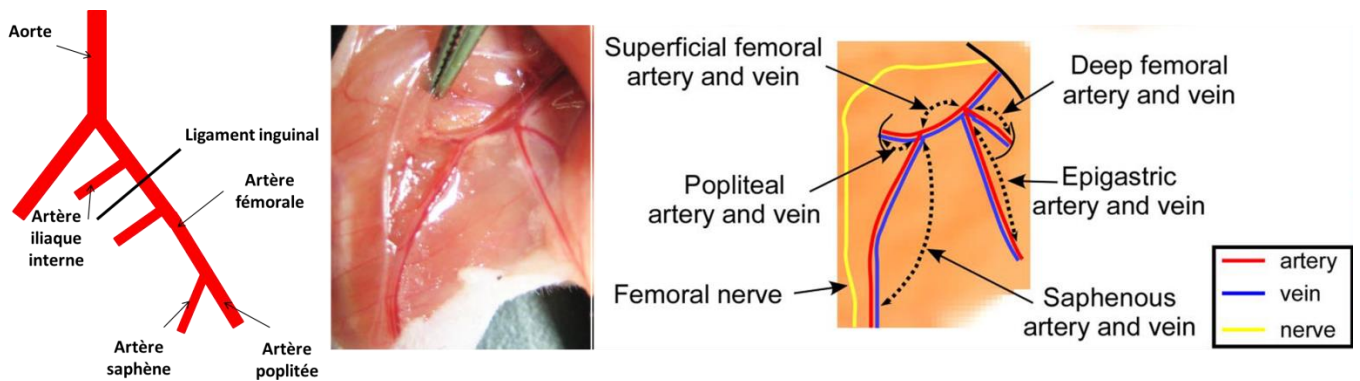


Figure 18 : schéma de la vascularisation de la patte de la souris : dans le modèle de Couffinhal *et coll.*, l'artère fémorale est totalement excisée (153) ; dans le modèle de Foubert *et coll.* l'artère fémorale est ligaturée sans excision (154). D'après la publication de Hamada *et coll.* (155).

Foubert *et coll.* ont publié en 2007 un modèle d'ischémie de patte chez la souris nude et ont testé pour la première fois l'effet de PECs issus de sang de cordon et stimulés *ex vivo* par de l'éphrine B2 (154). Le principe de la chirurgie était de ligaturer l'origine de l'artère fémorale sans excision de l'artère, chez la souris nude. L'immunodépression de l'animal permet d'envisager l'injection de PECs humains sans déclencher de réaction de rejet, la chirurgie est moins agressive que chez la souris sauvage pour éviter une ischémie trop forte chez ces souris fragiles. Les PECs sont prétraités avec l'éphrine B2 pendant 6h puis lavés et injectés par voie intraveineuse 6h après l'induction de l'ischémie. La reperfusion est analysée en laser doppler à J12 et comparée à la patte controlatérale contrôle, une analyse immunohistochimique par anticorps anti-CD31 est effectuée en parallèle (**Figure 19**). Ainsi, les auteurs ont créé un modèle animal d'ischémie de patte et une possibilité de suivre l'efficacité d'un traitement par des PECs stimulés *ex vivo*, modèle pré-clinique fondamental pour pouvoir ensuite transposer les résultats de ce produit de thérapie cellulaire amélioré chez l'homme.

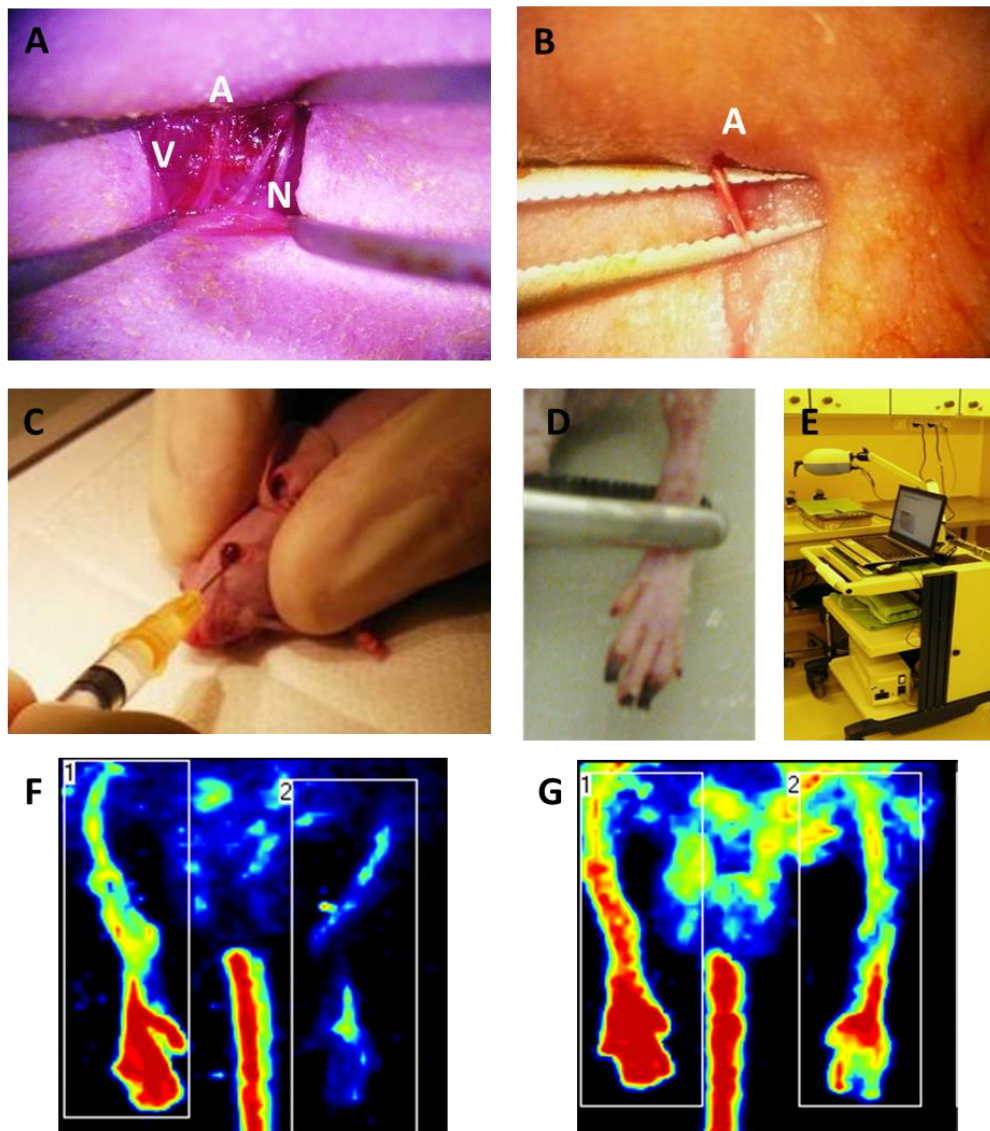


Figure 19 : modèle pré-clinique d'ischémie de patte avec traitement par des progéniteurs endothéliaux stimulés *ex vivo*. A : abord du paquet vasculonerveux au niveau de l'aîne ; B : isolement puis ligature de l'artère fémorale ; C : injection intraveineuse dans le sinus rétro-orbitaire des PECs stimulés (10^6 cellules /ml) 6h après la chirurgie ; D : nécrose digitale obtenue à J14 ; E : système de laser doppler ; F : reperfusion en laser doppler à J14 d'un animal contrôle avec la patte droite contrôle et la patte gauche ischémisée ; G : reperfusion en laser doppler à J14 d'un animal traité par PECs stimulés avec la patte droite contrôle et la patte gauche ischémisée. A : Artère, V : Veine, N : Nerf.

1.3.4.3. Molécules pro-angiogéniques

Différentes molécules ont été testées comme agents stimulants *ex vivo* la néoangiogenèse des PECs injectés *in vivo*. En 2007, Foubert *et coll.* ont testé l'éphrine B2 comme stimulant des PECs dans un modèle d'ischémie de patte de souris nude (154). L'éphrine B2 est une protéine exprimée très tôt au cours du développement de l'endothélium artériel, l'éphrine B4 elle est impliquée dans le développement du système veineux. L'étude d'embryon de souris montre qu'elles sont toutes les deux importantes dans le développement embryonnaire du cœur et de l'angiogenèse. Les auteurs ont ainsi utilisé un analogue de l'éphrine B2 et ont démontré une augmentation de la néoangiogenèse après administration de PECs stimulés. L'action sur la néoangiogenèse passe par l'activation de l'éphrine B4 et du système des sélectines.

En 2008, Zemani *et coll.* ont étudié l'effet du pré-traitement des PECs par du SDF-1 (Stroma cell-Derived Factor-1) sur un modèle d'ischémie de patte de souris nude (156). SDF-1 est une cytokine fortement impliquée dans le recrutement des PECs vers un site ischémique grâce à un gradient de concentration entre la moelle osseuse et le tissu ischémique, il active aussi l'expression membranaire d'intégrines facilitant les phénomènes de diapédèse. Les auteurs ont ainsi montré une augmentation des capacités d'adhésion des PECs *in vitro* passant par la surexpression d'intégrines membranaires, une sécrétion augmentée de MMP-2 et de FGF-2, et une amélioration de la perfusion après ischémie de patte de souris.

En 2011, nous avons étudié l'effet du fucoïdane sur le même modèle (**Article annexe**) (157). Le fucoïdane est un polysaccharide sulfaté dérivé des algues brunes aux propriétés antithrombotiques mais avec un risque plus faible d'hémorragies que l'héparine du fait d'une activité plus faible sur l'antithrombine. Il a aussi des propriétés antiinflammatoires et augmente la revascularisation *in vivo* lorsqu'il est coinjecté avec du FGF-2 par voie intramusculaire dans un modèle d'ischémie de patte de rat. Par ailleurs, il est capable de stimuler *in vitro* les propriétés proangiogéniques des PECs (158). Nous avons ainsi montré une amélioration de la néoangiogenèse induite par les PECs *in vivo* sur un modèle murin d'ischémie de patte.

Bien que ces molécules soient attractives, aucune n'est utilisée chez l'homme en pratique courante. L'érythropoïétine (EPO) est une molécule connue et utilisée depuis de longues années comme stimulateur de l'érythropoïèse. Des études récentes suggèrent des effets extra-hématopoïétiques de l'EPO (159). Chez l'adulte, l'EPO contribue à l'angiogenèse physiologique et pathologique et à la réponse de l'organisme à une lésion tissulaire notamment lors de lésion ischémique (160, 161). Les effets protecteurs vasculaires de l'EPO semblent être médiés par une action sur l'angiogenèse et anti-apoptotique (161). L'EPO induit un phénotype proangiogénique chez des CECs en culture et mobilise au site ischémique des PECs précoces (132, 162). Comme le montre la **figure 20**, ces effets protecteurs semblent être médiés par l'association du récepteur à l'EPO (EPOR) impliqué habituellement dans les effets hématopoïétiques, à la sous-unité β CR ou CD131, sous-unité classique du récepteur de certaines cytokines (163, 164). Ainsi, l'EPO présente toutes les caractéristiques proangiogéniques et de bonne tolérance humaine pour aider à la stimulation d'un produit de thérapie cellulaire dans l'ischémie critique.

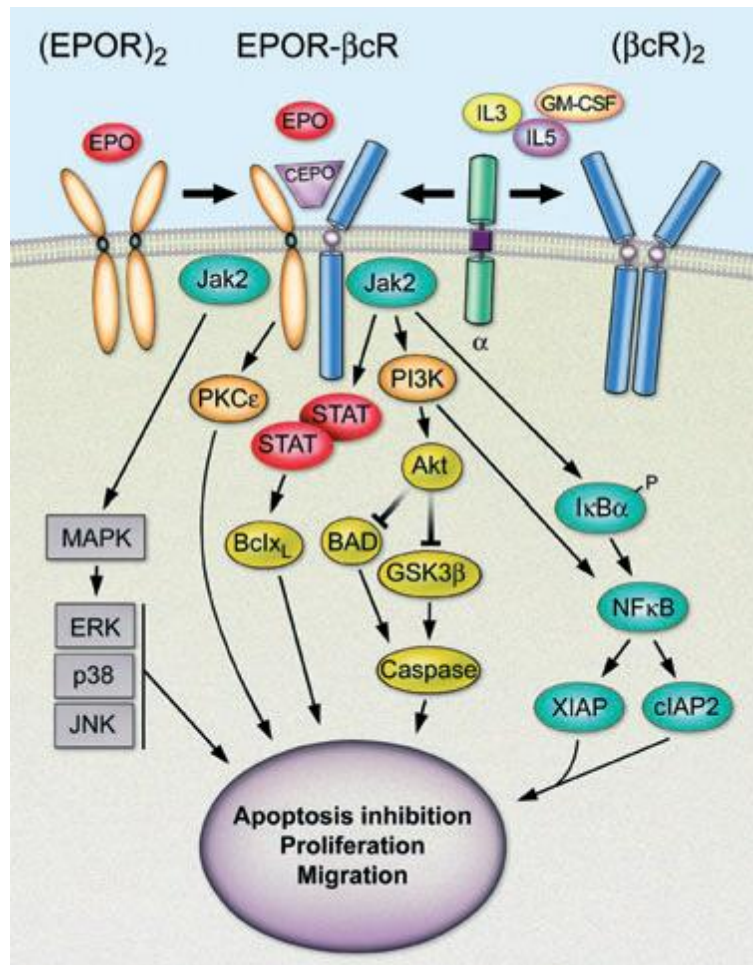


Figure 20 : structure du récepteur à l'EPO impliqué dans les phénomènes extra-hématopoïétiques et voies de signalisation intracellulaires impliquées d'après Arcasoy. (165).

2. TRAVAUX PERSONNELS

2.1. Objectifs

Les maladies artérielles périphériques sont extrêmement fréquentes et souvent graves, notamment lorsqu'il existe une atteinte athéromateuse multiple. L'atteinte artérielle des troncs supra-aortiques est à haut risque d'AVC donc de handicap fonctionnel important, l'atteinte artérielle des membres inférieurs est à haut risque d'amputation avec aussi un pronostic fonctionnel engagé au niveau du membre atteint et une mortalité cardiovasculaire très élevée. Le développement de stratégies innovantes capables d'optimiser le diagnostic précoce et la prise en charge thérapeutique de ces maladies est donc un enjeu considérable.

Les données récentes de la biologie vasculaire, notamment celles émanant de l'UMR-S 1076, ont conduit à identifier les MP et les PECs comme de nouveaux effecteurs des processus de lésion et de régénération endothéliale conditionnant l'homéostasie vasculaire. Ces éléments cellulaires sont détectables et quantifiables dans la circulation périphérique et se comportent comme des biomarqueurs utiles à l'appréciation de la dysfonction et du risque vasculaire. Par ailleurs, la possibilité d'isolement et d'expansion des PECs a ouvert la voie à de nouvelles stratégies de thérapie cellulaire à visée angiogénique en pathologies cardiovasculaires ischémiques.

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail ont été :

1. Dans la sténose carotidienne, de définir l'intérêt de nouveaux biomarqueurs témoins de l'activation leucocytaire et inflammatoire. Sur la base de leur implication physiopathologique dans la genèse et l'évolution de la plaque d'athérome et de leur élévation chez des patients avec des FDR cardiovasculaires ou ayant une maladie cardiovasculaire avérée, nous avons ciblés deux marqueurs inflammatoires, les MPL et la LpPLA2, et recherchés une corrélation avec l'instabilité de la plaque carotidienne définie de manière histologique selon la classification AHA (9). Notre hypothèse est en effet que la mesure des taux plasmatiques de ces marqueurs pourrait permettre un diagnostic précoce et non invasif de la plaque carotidienne instable et ainsi identifier un groupe de patient porteur d'une sténose carotidienne serrée asymptomatique à haut risque d'évènements neurologiques qui bénéficieraient le plus de la chirurgie préventive.
2. Dans l'ischémie critique des membres inférieurs, d'évaluer à l'échelle préclinique une nouvelle stratégie de thérapie cellulaire angiogénique combinant les ECFCs et l'EPO. L'EPO présente en effet différentes qualités intrinsèques en faveur de son utilisation comme adjuvant de thérapie cellulaire : son innocuité chez l'homme et ses propriétés vasculotropes déjà démontrées dans des modèles précliniques de pathologies cardiovasculaires. Notre hypothèse est qu'une stimulation *ex vivo* des ECFCs par de l'EPO permet d'accroître les propriétés angiogéniques de ces cellules *in vitro* et de produire un impact bénéfique sur la néovascularisation *in vivo* dans un modèle d'ischémie de patte de souris.

2.2. Marqueurs de dysfonction vasculaire comme outil diagnostique innovant des sténoses carotidiennes à risque

2.2.1. Manuscrit 1 : Le taux plasmatique de microparticules leucocytaires dépiste les plaques instables des patients asymptomatiques porteurs d'une sténose carotidienne serrée.

Manuscrit soumis au Journal of American College of Cardiology, accepté sous réserve de réponses favorables aux reviewers.

La chirurgie préventive systématique de tous les patients porteurs d'une sténose carotidienne serrée asymptomatique est de plus en plus discutée dans la littérature car, grâce au traitement médical intensif par antiplaquettaire, statines et bloqueur du SRA, le risque neurologique spontané d'une sténose carotidienne devient proche du risque neurologique et opératoire de la chirurgie. Il est intéressant de trouver un biomarqueur qui pourrait prédire l'instabilité d'une plaque carotidienne et ainsi encourager la chirurgie. Les MPL sont des microvésicules membranaires libérées par des leucocytes activés ou en apoptose. Elles participent à la genèse de la plaque d'athérome et à son évolution vers l'instabilité en favorisant la diapédèse et l'accumulation des macrophages dans l'intima, en activant la néoangiogenèse de la plaque et en favorisant le thrombus intimal. Les MPL ont été retrouvées comme constituant majeur de la plaque carotidienne.

Notre objectif était de doser les taux circulants de MPL chez des patients porteurs d'une sténose carotidienne nécessitant une chirurgie et de comparer ces taux à l'analyse histologique de la plaque carotidienne. Le but ultime était de savoir si le taux circulant de MPL peut permettre de prédire le caractère instable d'une plaque carotidienne serrée.

Nous avons inclus 42 patients qui devaient bénéficier d'une chirurgie carotidienne pour une sténose serrée supérieure à 70% en réduction de diamètre NASCET. Le prélèvement biologique était effectué avant la chirurgie et le taux circulant de MPL était mesuré grâce à une technique récente standardisée de cytométrie de haute sensibilité calibrée par des billes Mégamix[®]. Les plaques d'athérome étaient prélevées au cours de la chirurgie et analysées par un anatomopathologiste expérimenté pour classer les plaques en « stable » ou « instable » selon la classification AHA.

Le taux circulant médian de MPL était significativement plus élevé chez les patients ayant une plaque instable (n= 28, CD11bCD66b+MP/ μ l: 240 [147-394], et CD15+MP/ μ l: 147 [60-335]) versus ceux ayant une plaque stable (n=14, 16 [0-234] et 55 [36-157], $p<0.001$ et $p<0.01$ respectivement). Chez les patients asymptomatiques neurologiquement, le taux circulant médian était aussi significativement plus élevé chez les patients ayant une plaque instable (n=10; CD11bCD66b+MP/ μ l: 199 [153-410] et CD15+MP/ μ l: 78 [56-258]) versus ceux ayant une plaque stable (n=14, 20 [0-251] et 55 [34-102], $p<0.05$ and $p<0.05$ respectivement). Dans la population totale, une analyse ROC indiquait que le taux circulant de MPL qui prédisait le mieux l'instabilité de la plaque était : 126 MP/ μ l pour CD11b66b+ MPs avec une sensibilité de 82% et une spécificité de

71% ; et de 58 MP/ μ l pour CD15+ MPs avec une sensibilité de 79% et une spécificité de 71%. Dans le groupe des patients asymptomatiques, le taux circulant de MPL qui prédisait le mieux l'instabilité de la plaque était : 126 MP/ μ l pour CD11b66b+ MPs avec une sensibilité de 90% et une spécificité de 69% ; et de 58 MP/ μ l pour CD15+ MPs avec une sensibilité de 80% et une spécificité de 69%. Après analyse multivariée par régression logistique, seuls l'existence de symptômes neurologiques (OR 48.7, 95% CI 3.0-788, $p < 0.01$) et le niveau de CD11bCD66b+MPs (OR 24.4, 95% CI 2.4-245, $p < 0.01$) prédisaient de façon indépendante l'instabilité de la plaque carotidienne.

En conclusion, le taux circulant de MPL prédit de façon significative et indépendante le caractère instable d'une plaque carotidienne défini selon des critères histologiques. Ces résultats sont valables en présence ou en l'absence de symptômes neurologiques. Le taux circulant de MPL pourra être un outil dans l'avenir pour sélectionner les candidats à une chirurgie carotidienne préventive parmi les patients ayant une sténose carotidienne serrée asymptomatique.

TITLE PAGE

Plasmatic levels of leukocyte-derived microparticles predict unstable plaque in asymptomatic patients with high-grade carotid stenosis

G. Sarlon-Bartoli ^{1,2} MD, Y. Bennis ² MD, MD Piercecchi-Marti ³ MD, PhD, MA. Bartoli ¹ MD, PhD, L. Arnaud ⁴, J. Mancini ⁵ MD, PhD, R. Lacroix ^{2,4} MD, PhD, A. Boudes ¹ MD, E Sarlon ⁶ MD, B. Thevenin ¹ MD, AS. Leroyer ² PhD, C. Squarcioni ⁷ MD, PE. Magnan ¹ MD, F. Dignat-George ^{2,4} MD, PhD and F. Sabatier ^{2,8} MD, PhD.

¹Service de Chirurgie Vasculaire, Faculté de Médecine de Marseille, Aix-Marseille Université, Assistance Publique Hôpitaux de Marseille - Hôpital de la Timone, Marseille, France.

² INSERM UMR-1076, Faculté de Pharmacie, Aix-Marseille Université, Marseille, France

³ Service de Médecine Légale Droit de la Santé, Faculté de Médecine de Marseille, Aix-Marseille Université, Assistance Publique Hôpitaux de Marseille - Hôpital de la Timone, Marseille, France.

⁴ Laboratoire d'hématologie, Assistance Publique Hôpitaux de Marseille - Hôpital de la Conception, Marseille, France.

⁵ Service de santé publique (SSPIM), Assistance Publique Hôpitaux de Marseille - Hôpital de la Timone, Marseille, France.

⁶ INSERM U669, Faculté de médecine Paris Sud, Paris, France.

⁷ Service de Neurologie Vasculaire, Assistance Publique Hôpitaux de Marseille - Hôpital de la Timone, Marseille, France.

⁸ Laboratoire de culture et thérapie cellulaire, INSERM CICBT 510, Assistance Publique Hôpitaux de Marseille - Hôpital de la Conception, Marseille, France.

Corresponding author: Pr Florence Sabatier, INSERM UMR 1076, Faculté de Pharmacie, 27 boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 05, France

Phone: +33491835600; mail: florence.sabatier@ap-hm.fr; Fax: +33491835602

Short title: Leukocyte microparticles and carotid stenosis

Total words: 4484

Total tables and/of figures: 4

STRUCTURED ABSTRACT AND KEYWORDS

ABSTRACT (250 words)

Objectives: To analyze whether plasmatic levels of leukocyte-derived microparticles (LMPs) predict unstable plaques in patients with high-grade carotid stenosis.

Background: Preventive carotid surgery in asymptomatic patients is currently debated given the improvement of medical therapy. Therefore, non-invasive biomarkers that can predict plaque instability are needed. LMPs, originating from activated or apoptotic leukocytes, are the major microparticle subset in human carotid plaque extracts.

Methods Forty-two patients with greater than 70% carotid stenosis were enrolled. Using a new standardized high-sensitivity flow cytometry assay, LMPs were measured before thromboendarterectomy. The removed plaques were characterized as stable or unstable using histological analysis according to the AHA criteria. LMP levels were analyzed according to the plaque morphology.

Results: The median LMP levels were significantly higher in patients with unstable plaque (n= 28, CD11bCD66b+MP/ μ l: 240 [147-394], and CD15+MP/ μ l: 147 [60-335]) compared to those with stable plaque (16 [0-234] and 55 [36-157], $p<0.001$ and $p<0.01$, respectively). The increase in LMP levels was also significant when considering only the group of asymptomatic patients with unstable plaque (n=10; CD11bCD66b+MP/ μ l: 199 [153-410] and CD15+MP/ μ l: 78 [56-258] compared to those with stable plaque (n=14, 20 [0-251] and 55 [34-102], $p<0.05$ and $p<0.05$, respectively). After logistic regression, the neurologic symptoms (OR 48.7, 95% CI 3.0-788, $p<0.01$) and the level of CD11bCD66b+MPs (OR 24.4, 95% CI 2.4-245, $p<0.01$) independently predicted plaque instability.

Conclusions: LMPs constitute a promising biomarker predicting plaque vulnerability in patients with high-grade carotid stenosis. These data provide clues for identifying asymptomatic subjects who may benefit the most from carotid surgery.

KEYWORDS: leukocyte-derived microparticles, high-grade carotid stenosis, atherosclerosis, unstable plaque

TEXT

INTRODUCTION

Surgery for high-grade symptomatic carotid stenosis is a preventive strategy that is considered to be the gold standard treatment for avoiding ipsilateral stroke ¹. However, whether surgery is the best strategy for all symptom-free patients is a matter of debate. Currently, the systematic use of statins and ACE inhibitors is recommended facing a carotid stenosis³, and some reports suggest that, in asymptomatic patients, this medical therapy might reduce the risk of stroke inherent to carotid stenosis to levels making the carotid surgery unnecessary ^{4,5}. On the other hand, as recently enforced by the long term results of the ACST trial, the risk of high carotid stenosis is not completely abolished by the best medical therapy. Therefore, additional surgery can be useful, especially in patients who would otherwise have >10 years of life expectancy ⁶.

In an attempt to predict which patients would benefit the most from surgery, several biological and imaging markers, which may correlate with atherosclerotic plaque vulnerability, are under clinical investigation ⁷⁻⁹. Shed membrane microparticles (MPs), originating from diverse apoptotic or activated cells such as endothelial cells, leukocytes, and platelets have been reported to be elevated in various pathological settings associated with disrupted vascular homeostasis, including atherothrombotic diseases ¹⁰⁻¹³. In those situations, MPs were not only proven to be sensitive markers of disease progression but were also identified as potential effectors in the pathogenesis of vascular dysfunction ^{14,15}. Given the critical involvement of leukocyte activation in the inflammatory process underlying atherosclerotic plaque formation and destabilization, a subset of leukocyte-derived microparticles (LMPs) has gained particular interest in relation to atherothrombotic diseases¹⁶. LMPs were found to be the major MP subpopulation in extracts from human plaques after carotid endarterectomy ¹⁷. In addition, increased LMP levels are present in the plasma of patients with cardiovascular risk factors such as hypertension or type 2 diabetes ¹⁸ and are generated *in vitro* after tobacco smoke exposure in human monocytes/macrophages ¹⁹. Circulating LMPs are also increased in symptom-free subjects without a known history of cardiovascular disease but with subclinical carotid and femoral atherosclerosis as assessed by ultrasound examination ^{20,21}.

Given the importance of LMPs in atherothrombotic disorders, we hypothesized that LMPs are increased in the plasma of patients with vulnerable carotid plaques. Our objective was to test whether plasmatic levels of LMPs in patients with high-grade carotid stenosis undergoing systematic surgery could be useful to identify patients with histologically defined unstable plaques.

MATERIAL AND METHODS

Patients

All the patients with high-grade carotid stenosis who undergo a carotid endarterectomy in the vascular surgery department were screened prospectively from June 2009 to June 2010. Informed consent was obtained from all patients before participation to the study, and the local human ethics committee approved the procedures. The following data were collected for each patient: demographic characteristics, cardiovascular risk factors, medical therapy before surgery, neurological clinical symptoms, and percentage of carotid diameter reduction on computed tomography. The NASCET trial clinical criteria¹ were used to classify patients as neurologically symptomatic or asymptomatic. All of the symptomatic patients had a clinical evaluation by a neurologist, brain imaging, and cardiac exams (transoesophageal echocardiography and ECG monitoring) before the neurologic symptoms were determined to be related to the stenosis. High-grade carotid stenosis was defined as a 70% or greater reduction in diameter using the NASCET trial technique¹. Hypercholesterolemia was defined as an LDL cholesterol >1.6 g/l or long-term statin therapy. Medical therapy was defined as the treatment at the time of admission in vascular-surgery department. Patients with patent clinical infection signs, chronic inflammatory diseases or cancer were excluded. For the LMP and hs-CRP analyses, blood sampling was performed just before surgery after an overnight fast. Then, thromboendarterectomy was performed and removed carotid plaques were collected for histopathological analysis.

Leukocyte-derived MP measurement using high sensitivity flow cytometry

Blood was drawn by puncturing the antecubital vein with a 21-gauge needle using a light tourniquet and was collected into 0.129 mol.L⁻¹ tri-sodium citrate Vacutainer tubes (BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ, USA). Platelet-free plasma (PFP) samples were prepared within 2 to 4 hours after the blood draw using two serial centrifugations at room temperature (15 min at 1500 g, 2 min at 13 000 g) and stored at -80°C until use. For the MP labeling, 30 µL of freshly thawed PFP was incubated for 30 min at room temperature with 10 µl of conjugated monoclonal antibodies, which included CD11b-FITC (clone Bear1) and CD66b-FITC (clone UCHT1) or CD15-FITC (clone 80H5) or isotype and concentration-matched control antibodies from Beckman Coulter (Marseille, France). The PFP was then diluted in phosphate buffered saline without calcium and magnesium. Thirty microliters of Cyto-Count® Fluorospheres (Dako, Trappes, France) was added to each sample to determine the absolute MP numbers. LMP determination was performed on a high-sensitivity flow cytometer (Gallios instrument, Beckman Coulter), which provided access to a standardized MP measurement in the submicron range. Protocol standardization was performed according to a new strategy, which is based on a blend of fluorescent size-calibrated beads (0.1, 0.3, 0.5 and 0.9 µm) (Megamix-Plus prototype, a kind gift from Biocytex, Marseille, France)²². To obtain better sensitivity in the low size range, the Gallios flow cytometer was set up in the “W2” mode²³. The lower and upper limits of the MP gate were defined using 0.3-µm and 0.9-µm beads, respectively, as previously described²⁴. LMPs were defined as the CD11bCD66b or CD15 positive events included in the MP region, and the results were expressed as the number of MP/µl of plasma.

High-sensitivity C-Reactive Protein assay

High-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) levels were analyzed with a latex turbidimetric immunoassay (Beckman Coulter, Inc. Brea, CA - USA). The analytical detection limit for this method was 0.006 mg/dl.

Histological assessment of the carotid plaques

The samples were fixed for 24 hours in 4% neutral buffered formalin, dehydrated in graded alcohols, cleared in xylene, and embedded in paraffin. Serial sections (5 μ m) of each sample were cut for HES staining and histological analysis. The morphologic characteristics of the carotid plaques were established on the HES-sections by an experienced pathologist according to the classification defined by the American Heart Association (AHA) ²⁵. The stable lesions are AHA type V and are characterized by fibrous conjunctive tissue together with extracellular lipids and laminated acellular collagen without endothelial disruption (Va) or only fibrous conjunctive tissue (Vb). The unstable lesions are type VI and are characterized by ulceration of the endothelial surface (VIa) or recent intraplaque hemorrhage (VIb) or intraplaque thrombosis (VIc). Six sections were analyzed from each patient.

Statistical analysis

The patient characteristics were compared at baseline according to the plaque morphology. The results were expressed as a median [inter quartile range]. Bivariate comparisons were conducted using the Mann-Whitney test for continuous characteristics and the Chi-squared or Fisher's exact tests for categorical characteristics. The correlation coefficients (Pearson's test) were calculated to determine the strength of the association between the continuous characteristics. An ROC curve analysis was then conducted to identify the threshold level of LMPs that was capable of predicting an unstable plaque with the highest sensitivity and specificity. A multivariate analysis was carried out by creating a forward stepwise logistic regression model to estimate the probability of an unstable plaque. Age, gender, and factors associated with the outcome at the $p < 0.20$ level in the bivariate analyses were considered eligible to enter in the logistic regression model. The logistic regression model was applied to the whole population and to the population of asymptomatic patients. Statistical analyses were performed using SPSS 17.0. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Population characteristics

A total of 42 patients, 32 men and 10 women with ages ranging from 43 to 88 years (median 73.0), were included. The baseline cardiovascular risk factors were as follows: hypertension, 69% of patients; hypercholesterolemia, 69% of patients; tobacco use, 31% of patients; and diabetes, 21.4% of patients. The median body mass index was 25.4 [24.2-27.2]. At the time the patients were admitted to the hospital, the medications included anti-platelet treatments (n=40, 95.2%), statins (n=24, 57.1%) and ACE inhibitors (n=16, 38.1%). The median stenosis degree, estimated using the NASCET method on computed tomography, was 85% [80.0-90.0]. Neurologic symptoms related to the carotid stenosis were present in 19 patients (45.2%). Based on the histological analysis, 66.7% of the plaques were classified as unstable and 33.3% were classified as stable.

The analysis of the patients' characteristics according to plaque morphology is summarized in **Table I**. In this population, the patients with stable and unstable plaques displayed similar characteristics except for neurologic symptoms, significantly higher in the patients with unstable plaques, and hypercholesterolemia, significantly higher in the patients with stable plaques. A total of 23 patients were asymptomatic; 43.5% of these patients had an unstable plaque, and 56.5% had a stable plaque. No significant differences were observed in term of clinical characteristics or medications between the asymptomatic patients grouped according to plaque morphology. The leukocyte counts and hs-CRP serum levels were also similar between the patient groups.

Circulating leukocyte-derived microparticles are increased in patients with unstable plaque

In the whole population, the median plasmatic LMP levels, as assessed by CD11b66b+ or CD15+ labeling, were 181 [70-324] MP/μl and 90 [51-233] MP/μl, respectively. The levels of both types of LMPs were significantly correlated ($r=0.6$; $p<0.05$). The median plasmatic level of CD11b66b+ LMPs was significantly higher in the patients with unstable plaque compared to those with stable plaque (240 [147-394] MP/μl, vs. 16 [0-234], $p<0.001$) (**Figure 1**). Similarly, a significant increase in the median plasmatic level of CD15-expressing LMPs was observed in the patients with unstable plaque compared to those with stable plaque (147 [60-635] MP/μl vs. 55 [36-157], $p<0.01$) (**Figure 1**).

Interestingly, among the asymptomatic patients, the median plasmatic levels of the LMP subsets remained significantly higher in patients with unstable plaque compared to those with stable plaque (CD11b66b+ MP/μl: 199 [153-410] vs. 20 [0-251], $p<0.05$; CD15+ MP/μl: 78 [56-258] vs. 55 [34-102], $p<0.05$) (**Figure 2**).

Circulating leukocyte-derived microparticles independently predict plaque instability

In the study population, a ROC analysis indicated that the cut-off point for LMPs that best predicted the presence of unstable plaque was 126 MP/ μ l for CD11b66b+ MPs with an 82% sensitivity and a 71% specificity, and the cut-off was 58 MP/ μ l for CD15+ MPs with a 79% sensitivity and a 71% specificity (**Figure 3A**). In the asymptomatic patients, the cut-off points for LMPs that best predicted the presence of unstable plaque were found to be the same (CD11b66b+ MPs was 126 with a 90% sensitivity and a 69% specificity, and the cut-off point was 58 for CD15+ MPs with an 80% sensitivity and a 69% specificity) (**Figure 3B**).

After logistic regression, both the neurologic symptoms and the level of CD11b66b+ MPs were identified as independent predictors of unstable plaques (Neurologic symptoms: OR 48.7, 95% CI 3.0-788, $p=0.006$; CD11b66b+ MP > 120: OR 24.4, 95% CI 2.4-245, $p=0.007$). In the asymptomatic patients, only the level of CD11b66b+ MPs was associated with unstable plaques (level > 120: OR 20.3, 95% CI 1.9-219, $p=0.013$).

DISCUSSION

In the present study, we utilized a standardized high-sensitivity flow cytometry method, which allowed for the measurement of previously undetectable MP subpopulations. We provided new, clinically relevant information by demonstrating higher levels of LMPs in patients with histologically defined unstable carotid plaques. To our knowledge, this is the first study to demonstrate that plasmatoc levels of LMPs predict unstable plaque in asymptomatic patients with high-grade carotid stenosis. Altogether, our data identified an LMP measurement that was reliable and provided a non-invasive approach for diagnosing plaque vulnerability. Thus, LMPs behave as a new potential biomarker that could be used to identify asymptomatic subjects who may benefit the most from preventive carotid surgery.

The annual risk of ischemic stroke secondary to a 60% asymptomatic carotid stenosis was 2 to 3% in randomized trials of endarterectomy versus best medical therapy², but in recent years, this risk has been reported as low as 0.4%. This dramatic risk reduction was correlated by the authors to medical treatment improvement²⁶. Surgery for all asymptomatic patients with a 60% carotid stenosis is likely to be replaced by selective surgery for patients with a high neurologic risk. Thus, the identification of biomarkers of plaque instability is essential to make this selection possible. Previous studies tested various circulating markers for their ability to predict vulnerable carotid plaques, but to our knowledge, none of these markers allowed to differentiate stable and unstable plaques in asymptomatic patients. In patients with high-grade carotid stenosis⁷, a bivariate analysis showed that the median hs-CRP was significantly higher in patients with neurologic symptoms or with unstable carotid plaques. However, these results were not confirmed in multivariate analyses, and the hs-CRP value did not significantly differ according to plaque morphology in the asymptomatic patients. In our study, hs-CRP consistently failed to discriminate patients with histologically defined unstable or stable carotid plaques. More recently, similar results were reported for MMP-9 levels, which were associated with neurological symptoms or unstable carotid plaques in symptomatic patients but remained unchanged in asymptomatic patients⁸.

In a previous study¹⁷, where MP subsets were measured in human plaque extracts after carotid endarterectomy, more than 50% of MPs originate from leukocytes, 30% from macrophages, 15% from lymphocytes, and 8% from granulocytes. However, no significant difference was found between asymptomatic and symptomatic patients for any of the MP cellular origins. In addition, although a significant proportion of circulating MPs were found to originate from leukocytes ($\approx 40\%$), the levels failed to differentiate the symptomatic patients from the asymptomatic patients given the small population number ($n=26$).

Here, we used a high-sensitivity flow cytometry method to measure circulating LMP levels according to histologically defined carotid plaque vulnerability. This new generation of flow cytometry provides improved resolution and decreased background noise, which allows the measurement of previously undetectable small MP subpopulation in a standardized manner²⁴. In this study, we demonstrated that

including these small-size MP fractions new clinically relevant information for identifying patients with carotid plaque vulnerability could be evidenced.

Using two different marker strategies, we observed that excessive vesiculation of leukocytes occurred in patients with unstable plaque compared to subjects with stable plaque, as demonstrated by increased levels of both CD11bCD66b⁺ MPs and CD15⁺ MPs. An analysis of the patients' characteristics indicated that the patient groups did not differ with regard to the prevalence of the usual cardiovascular risk factors, but as expected, a history of neurological symptoms was more prevalent in the patients with unstable plaques. Of note, a previous neurological event alone cannot explain the LMP elevation because the elevation in both LMP subsets remained significant in the asymptomatic patients with unstable plaque compared to the asymptomatic patients with stable plaque, which indicates that the. However, because our symptomatic patients were analyzed at a time distant from the stroke, future studies are necessary to address whether the occurrence of neurological complications affects LMP levels in patients with carotid stenosis. Further support comes from the results of the multivariate analyses, which indicate that after adjustment for cardiovascular risk factors and neurological symptoms, LMPs were independently associated with plaque instability. Taken together these data suggest that increased LMP levels are a robust marker of plaque instability. Interestingly, the independent association between LMPs and plaque morphology was observed for MPs expressing CD11b and/or CD66b, in contrast to those expressing CD15, which indicates that depending on the marker used, LMP subsets may have various pathological roles and clinical significances. This result is consistent with the fact that these markers do not identify strictly similar subpopulations of leukocytes. In contrast to CD15, present mainly in granulocytes, CD11b can also be expressed by leukocyte subpopulations that make significant contributions to atherosclerosis progression, such as monocytes, CD8⁺ T lymphocytes and NK cells ²⁷. In addition, the high expression levels of CD11b and CD66b on parental leukocytes contribute to optimizing the sensitivity for MP detection.

Little is known about the pathophysiological mechanisms that contribute to high circulating LMP levels in patients with unstable atherosclerotic plaques. LMPs can be generated within the blood compartment or at the vessel wall interface as a result of inflammatory processes, which drives plaque instability. Accordingly, increased LMP levels are classically correlated with systemic inflammation. Increased circulating levels of neopterin were recently reported in patients presenting carotid complicated plaques ²⁸; this by-product of activated monocyte/macrophage metabolism could trigger leukocyte vesiculation. However, a role for systemic inflammation is unlikely in our study because no significant elevation of hs-CRP was noted in patients with morphologically unstable plaque compared to patients with stable plaque. Because LMPs are enriched in carotid atherosclerotic plaques, ¹⁵ another hypothesis is that the circulating MP originated from plaque rupture. Several mechanisms contributing to the vulnerability of atherosclerotic plaques have been implicated, including an ulceration of the endothelial surface or an intraplaque hemorrhage, in which LMPs may play a key pathogenic role. MPs from apoptotic macrophages present in vulnerable plaques stimulate endothelial proliferation and intraplaque neovascularization through a CD40-CD40L interaction ²⁹ and can also promote plaque progression by the transfer of ICAM-1 to endothelial cells, thereby

favoring leukocyte recruitment ³⁰. In addition, LMPs are critical vectors of thrombogenicity through their expression of coagulation activators and their capacity to interact with platelets and endothelial cells ^{31,32,16}. Given these pleiotropic functional capacities, LMPs can not only constitute a marker of plaque instability but also act as key effectors participating in the development of high-risk carotid atherosclerosis lesions.

The potential limitations of this study include the limited number of subjects and the absence of patient follow-up regarding neurologic events. Future large-scale prospective studies are needed to establish whether LMP levels can effectively identify patients with carotid stenosis who are at high risk of neurological events, and whether LMP levels could be used as a non-invasive biomarker with decision making value in an asymptomatic population of patients who are considered for preventive carotid endarterectomy. Moreover, circulating LMPs may reflect a systemic state of vulnerable atherosclerosis, but they may not locate the real culprit lesion. Imaging techniques using contrast ultrasound, high-resolution MRI or nuclear imaging are currently being developed ^{9, 33, 34} to analyze parameters of instability such as intraplaque hemorrhage or thrombus. In the future, a multimarker strategy coupling biology and imaging may help to determine the risk of an asymptomatic atherosclerotic carotid stenosis and guide therapy.

In conclusion, among the asymptomatic patients with high-grade carotid stenosis, increased circulating LMP levels identify those with histologically defined plaque instability. LMPs may constitute a promising biomarker for the diagnosis of carotid plaque vulnerability and provide encouraging clues for the identification of asymptomatic subjects at high neurological risk who would benefit the most from carotid surgery.

Acknowledgements:

We thank the paramedical teams of the Vascular Surgery Department for their help in conducting this work. We also thank Patricia Stellmann and Patricia Berenger for their technical assistance with the MP analysis. We are grateful to the Beckman Coulter Company for their technical support. We thank Biocytex Company for the kind gift of the Megamix-Plus standardization beads.

Conflict of interest: none

REFERENCES

1. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high grade stenosis. *NEJM* 1991; 325: 445-453.
2. Halliday A, Mansfield A, Marro J, Peto C, Peto R, Potter J, Thomas D for MRC Asymptomatic Carotid Surgery Trial (ACST) Collaborative Group. Prevention of disabling and fatal strokes by successful carotid endarterectomy in patients without recent neurological symptoms: randomised controlled trial. *Lancet* 2004; 363: 1491-1502.
3. Hobson RW 2nd, Mackey WC, Ascher E, Murad MH, Calligaro KD, Comerota AJ, Montori VM, Eskandari MK, Massop DW, Bush RL, Lal BK, Perler BA; Society for Vascular Surgery. Management of atherosclerotic carotid artery disease: clinical practice guidelines of the Society for Vascular Surgery. *J Vasc Surg* 2008; 48: 480-486.
4. Naylor AR, Gaines PA, Rothwell PM. Who benefits most from intervention for asymptomatic carotid stenosis: patients or professionals? *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2009; 37: 625-632.
5. Abbott AL. Medical (nonsurgical) intervention alone is now best for prevention of stroke associated with asymptomatic severe carotid stenosis: results of a systematic review and analysis. *Stroke* 2009; 40:e573-83.
6. Halliday A, Harrison M, Hayter E, Kong X, Mansfield A, Marro J, Pan H, Peto R, Potter J, Rahimi K, Rau A, Robertson S, Streifler J, Thomas D; Asymptomatic Carotid Surgery Trial (ACST) Collaborative Group. 10-year stroke prevention after successful carotid endarterectomy for asymptomatic stenosis (ACST-1): a multicentre randomised trial. *Lancet* 2010; 376:1074-1084.
7. Alvarez Garcia B, Ruiz C, Chacon P, Sabin JA, Matas M. High-sensitivity C-reactive protein in high-grade carotid stenosis: risk marker for unstable carotid plaque. *J Vasc Surg* 2003;38:1018-1024.
8. Alvarez B, Ruiz C, Chacón P, Alvarez-Sabin J, Matas M. Serum values of metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 as related to unstable plaque and inflammatory cells in patients with greater than 70% carotid artery stenosis. *J Vasc Surg* 2004; 40:469-475.
9. Staub D, Patel MB, Tibrewala A, Ludden D, Johnson M, Espinosa P, Coll B, Jaeger KA, Feinstein SB. Vasa vasorum and plaque neovascularization on contrast-enhanced carotid ultrasound imaging correlates with cardiovascular disease and past cardiovascular events. *Stroke* 2010; 41:41-47.
10. Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F, Freyssinet JM. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26:2594-604.
11. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, Tedgui A. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2000; 101:841-3.
12. Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Lesèche G, Freyssinet JM, Tedgui A. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 1999; 99:348-53
13. Rautou PE, Vion AC, Amabile N, Chironi G, Simon A, Tedgui A, Boulanger CM. Microparticles, vascular function, and atherothrombosis. *Circ Res* 2011; 109:593-606

14. Martinez MC, Tual-Chalot S, Leonetti D, Andriantsitohaina R. Microparticles: targets and tools in cardiovascular disease. *Trends Pharmacol Sci* 2011; 32:659-65
15. VanWijk M, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* 2003; 59:277-287.
16. Angelillo-Scherrer A. Leukocyte derived microparticles in vascular homeostasis. *Circ Res* 2012; 100:356-69.
17. Leroyer AS, Isobe H, Lesèche G, Castier Y, Wassef M, Mallat Z, Binder BR, Tedgui A, Boulanger CM. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49:772-7.
18. Nomura S, Inami N, Shouzu A, Urase F, Maeda Y. Correlation and association between plasma platelet-, monocyte- and endothelial cell-derived microparticles in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus. *Platelets* 2009; 20:406-14.
19. Li M, Yu D, Williams KJ, Liu ML. Tobacco smoke induces the generation of procoagulant microvesicles from human monocytes/macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010 Sep; 30:1818-24.
20. Chironi G, Simon A, Hugel B, Del Pino M, Gariépy J, Freyssinet JM, Tedgui A. Circulating leukocyte-derived microparticles predict subclinical atherosclerosis burden in asymptomatic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:2775-80.
21. Chironi GN, Simon A, Boulanger CM, Dignat-George F, Hugel B, Megnien JL, Lefort M, Freyssinet JM, Tedgui A. Circulating microparticles may influence early carotid artery remodeling. *J Hypertens* 2010; 28:789-96.
22. Robert S, Poncelet P, Lacroix R, Arnaud L, Giraudo L, Hauchard A, Sampol J, Dignat-George F. Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? *J Thromb Haemost* 2009; 7:190-197.
23. Lacroix R, Robert S, Poncelet P, Dignat-George F. Overcoming limitations of microparticle measurement by flow cytometry. *Semin Thromb Hemost* 2010; 36:807-818.
24. Robert S, Lacroix R, Poncelet P, Harhouri K, Bouriche T, Judicone C, Wischhusen J, Arnaud L, Dignat-George F. High-sensitivity flow cytometry provides access to standardized measurement of small-size microparticles--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 ;32:1054-8.
25. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995; 92:1355-74.
26. Marquardt L, Geraghty OC, Mehta Z, Rothwell PM. Low risk of ipsilateral stroke in patients with asymptomatic carotid stenosis on best medical treatment: a prospective, population-based study. *Stroke*. 2010;41:e11-7.
27. Shimada K. Immune system and atherosclerotic disease: heterogeneity of leukocyte subsets participating in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ J* 2009 ;73:994-1001.
28. Sugioka K, Naruko T, Hozumi T, Nakagawa M, Kitabayashi C, Ikura Y, Shirai N, Matsumura Y, Ehara S, Ujino K, Itoh A, Haze K, Becker AE, Yoshiyama M, Ueda M. Elevated levels of neopterin are associated with

carotid plaques with complex morphology in patients with stable angina pectoris. *Atherosclerosis* 2010 ;208:524-30

29. Leroyer AS, Rautou PE, Silvestre JS, Castier Y, Lesèche G, Devue C, Duriez M, Brandes RP, Lutgens E, Tedgui A, Boulanger CM. CD40 ligand+ microparticles from human atherosclerotic plaques stimulate endothelial proliferation and angiogenesis a potential mechanism for intraplaque neovascularization. *J Am Coll Cardiol* 2008 ;52:1302-11.

30. Rautou PE, Leroyer AS, Ramkhalawon B, Devue C, Duflaut D, Vion AC, Nalbone G, Castier Y, Leseche G, Lehoux S, Tedgui A, Boulanger CM. Microparticles From Human Atherosclerotic Plaques Promote Endothelial ICAM-1-Dependent Monocyte Adhesion and Transendothelial Migration. *Circ Res* 2010;

31. Essayagh S, Xuereb JM, Terrisse AD, Tellier-Cirioni L, Pipy B, Sié P. Microparticles from apoptotic monocytes induce transient platelet recruitment and tissue factor expression by cultured human vascular endothelial cells via a redox-sensitive mechanism. *Thromb Haemost* 2007;98:831-37.

32. Aharon A, Tamari T, Brenner B. Monocyte-derived microparticles and exosomes induce procoagulant and apoptotic effects on endothelial cells. *Thromb Haemost* 2008;100:878-885.

33. Gao T, Zhang Z, Yu W, Zhang Z, Wang Y. Atherosclerotic carotid vulnerable plaque and subsequent stroke: a high-resolution MRI study. *Cerebrovasc Dis* 2009; 27: 345-352.

34. Riou LM, Broisat A, Dimastromatteo J, Pons G, Fagret D, Ghezzi C. Pre-clinical and clinical evaluation of nuclear tracers for the molecular imaging of vulnerable atherosclerosis: an overview. *Curr Med Chem* 2009; 16:1499-1511.

Table I: Clinical, therapeutic, and biological characteristics of all patients and asymptomatic patients with regard to plaque morphology. The data given as n (%) or median [IQR]

	Whole population			Asymptomatic patients		
	Stable plaque n=14	Unstable plaque n=28	<i>p</i>	Stable plaque n=13	Unstable plaque n=10	<i>p</i>
Age	77.0 [62-80]	72.5 [66-76]	0.42	78.0 [62-80]	73.0 [70-78]	0.93
Male	10 (71.4)	22 (78.6)	0.71	9 (69.2)	8 (80.0)	0.66
Body mass index	25.4 [24.2-28.1]	25.2 [24.0-27.0]	0.94	25.6 [24.4-28.4]	25.9 [24.8-29.4]	0.74
Hypertension	12 (85.7)	17 (60.7)	0.16	11 (84.6)	6 (60.0)	0.34
Diabetes mellitus	5 (35.7)	4 (14.3)	0.13	5 (38.5)	3 (30.0)	0.99
Hypercholesterolemia	13 (92.9)	16 (56.5)	0.03	12 (92.3)	7 (70.0)	0.28
Smoker	4 (28.6)	9 (57.1)	0.99	4 (30.8)	2 (20.0)	0.66
Antiplatelets	14 (100)	26 (92.9)	0.55	13 (100)	10 (100.0)	-
Statins	9 (64.3)	15 (53.6)	0.51	9 (69.2)	7 (70.0)	0.99
ACE inhibitors	7 (50.0)	9 (32.1)	0.32	6 (46.1)	6 (60.0)	0.68
Neurologic event	1 (7.1)	18 (64.3)	0.001	0	0	-
LDL cholesterol (g/l)	0.93 [0.8-1.0]	1.2 [0.9-1.2]	0.15	0.92 [0.7-1.0]	0.90 [0.9-1.0]	0.61
hs-CRP (mg/l)	3.0 [1.6-4.8]	7.0 [2.0-21.3]	0.16	3.0 [1.6-4.3]	2.0 [1.2-4.0]	0.59
Leukocyte count	8.0 [6.7-9.9]	7.9 [6.6-9.7]	0.58	7.8 [6.6-9.2]	7.4 [5.9-8.2]	0.56

Figure legends

Figure 1: Plasmatic levels of CD11b66b+ MPs and CD15+ MPs as assessed by high-sensitivity flow cytometry were significantly increased in patients with unstable plaques compared to patients with stable plaques (* $p < 0.05$). A thick black line inside the box indicates the median. The top and bottom of the box are the upper and lower quartile and indicate the inter-quartile range (IQR). The whiskers indicate the lowest datum still within 1.5 IQR of the lower quartile and the highest datum still within 1.5 IQR of the upper quartile. Outliers (more than 1.5 times the IQR) are marked with a circle.

Figure 2: Plasmatic levels of CD11b66b+ MPs and CD15+ MPs as assessed by high-sensitivity flow cytometry were significantly increased in asymptomatic patients with unstable plaques compared to patients with stable plaques (* $p < 0.05$).

Figure 3: An ROC curve analysis was used to determine the threshold of leukocyte-derived MPs that predicts an unstable plaque with the highest sensitivity and specificity. A: whole population, B: asymptomatic patients. The cutoff point for leukocyte-derived MPs that best predicted the presence of unstable plaques was 126.5 for CD11b66b+ MP and 58.5 for CD15+MP.

Figure 1:

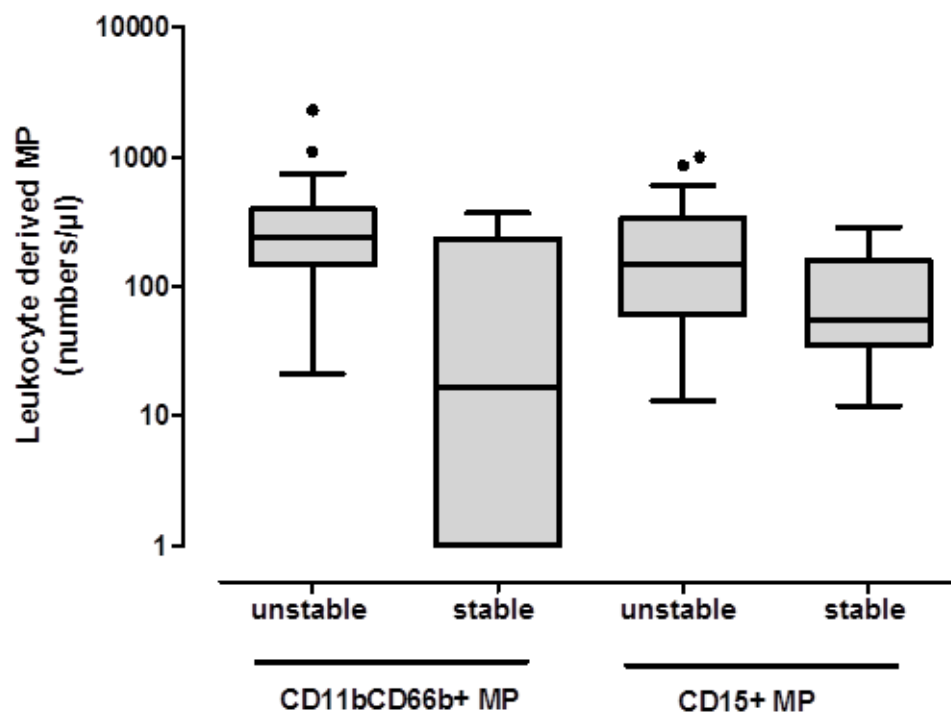


Figure 2:

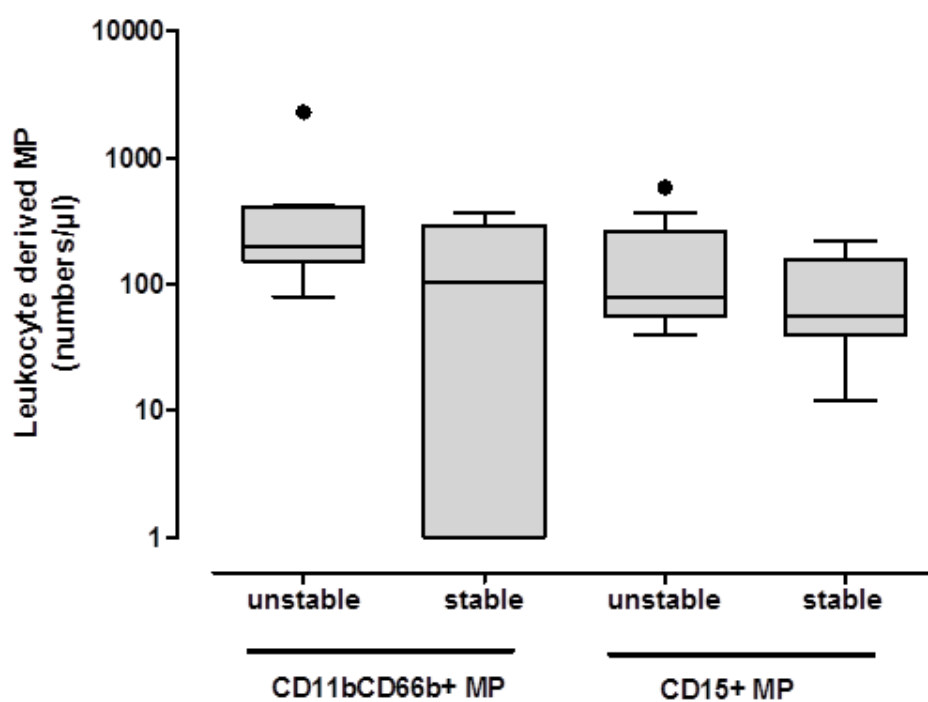
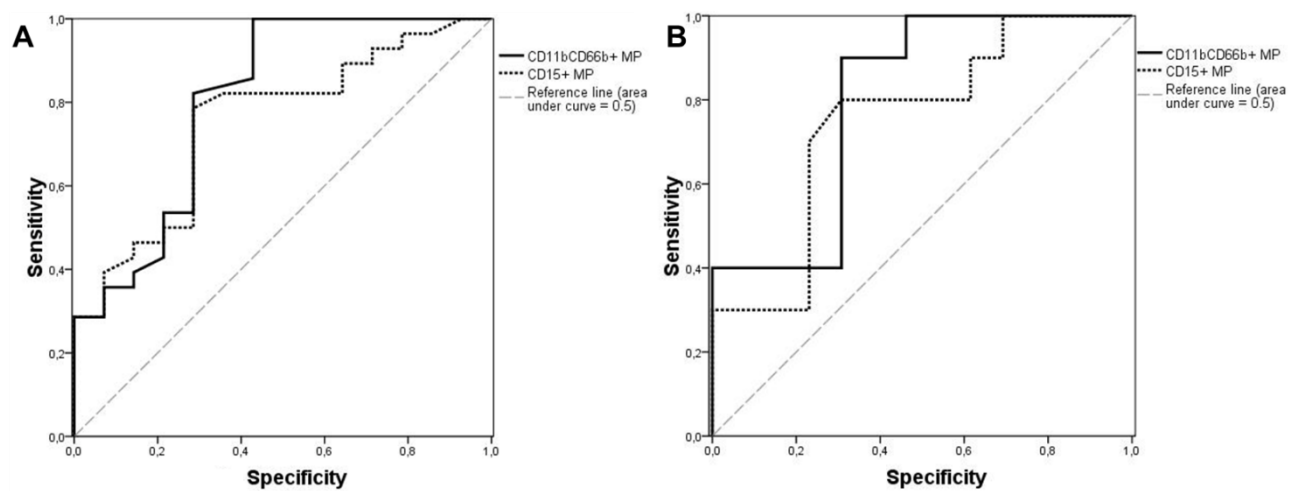


Figure 3:



2.2.2. Manuscrit 2 : Taux plasmatique de Lipoprotéine phospholipase A2 chez les patients porteurs d'une sténose carotidienne serrée : nouveau biomarqueur pour prédire une plaque instable.

European Journal of Vascular and Endovascular Surgery. 2012;43:154-9.

Ce travail s'intéresse à un autre biomarqueur inflammatoire, la Lp-pLA2. Il s'agit d'une enzyme synthétisée par les macrophages ; elle se lie aux LDL circulantes et le complexe traverse l'endothélium pour rejoindre l'espace sous-intimal. Les LDL sont oxydés ce qui active la Lp-PLA2, elle produit des médiateurs proinflammatoires qui vont attirer les macrophages dans l'espace sous-intimal. Les macrophages ainsi accumulés phagocytent les LDL oxydés, se transforment en cellules spumeuses, s'agrègent pour former le cœur lipidique et sécrètent de la Lp-PLA2 entretenant ainsi l'inflammation de la plaque. La Lp-PLA2 participe ainsi activement à la genèse et à l'instabilité de la plaque d'athérome. La Lp-PLA2 est présente en grande quantité dans les plaques carotidiennes de sujets symptomatiques.

Notre objectif était de doser les taux circulants de Lp-PLA2 chez des patients porteurs d'une sténose carotidienne nécessitant une chirurgie et de comparer ces taux à l'analyse histologique de la plaque carotidienne. Le but final était de savoir si le taux circulant de Lp-PLA2 peut permettre de prédire le caractère instable d'une plaque carotidienne serrée.

Nous avons inclus 42 patients qui devaient bénéficier d'une chirurgie carotidienne pour une sténose serrée supérieure à 70% en réduction de diamètre NASCET. Le prélèvement biologique était effectué avant la chirurgie et le taux circulant de Lp-PLA2 était mesuré grâce au test de PLACTM (diaDexus, Inc., Sud San Francisco, CA, USA), dosage immunoenzymatique (ELISA) de type « sandwich ». Le taux circulant de CRP-us était aussi mesuré en utilisant le système SYNCHRON LX PRO System, validée par la méthode Beckman Coulter. Les plaques d'athérome étaient prélevées au cours de la chirurgie et analysées par un anatomopathologiste expérimenté pour classer les plaques en « stable » ou « instable » selon la classification AHA.

Parmi les 42 patients (âge moyen 70,4 ans, 67% d'hommes), les signes neurologiques étaient présents chez 16 d'entre eux (38%). 23 patients (55%) avaient une plaque définie comme instable en histologie. Le taux médian de Lp-PLA2 était significativement plus élevé chez les patients avec des plaques instables que chez les patients ayant des plaques stables (222,4 (174,9-437,5) interquartile range (IQR) 63,5 vs. 211,1 (174,9-270,6) IQR 37,2 ng/ml ; $p = 0,02$). De plus parmi les patients asymptomatiques, le taux médian de Lp-PLA2 avaient tendance à être plus élevé chez les patients avec des plaques instables que chez les patients ayant des plaques stables (226.8 (174.9-437.5) IQR 76,8 vs. 206,9 (174,9-270,6) IQR 33,7 ng/ml ; $p = 0.16$). Après analyse multivariée par régression logistique, seuls les signes neurologiques (OR = 30,9 (3,7-244,6) ; $p < 0,001$) et le taux circulants de Lp-PLA2 (OR = 1,7 (1,1-12,3) ; $p = 0,03$) étaient indépendamment associés à l'instabilité de la plaque définie en histologie.

En conclusion, le taux circulant de Lp-PLA2 prédit de façon significative et indépendante le caractère instable d'une plaque carotidienne défini selon des critères histologiques. Dans le groupe des patients asymptomatiques, ce résultat tend à être identique mais de façon non significative. Le taux de Lp-PLA2 pourrait être un facteur prédictif de l'instabilité de la plaque carotidienne chez des sujets asymptomatiques porteurs d'une sténose carotidienne serrée mais ce résultat doit être confirmé lors d'une étude de plus grande envergure incluant un plus grand nombre de patients.



Circulating Lipoprotein-associated Phospholipase A2 in High-grade Carotid Stenosis: A New Biomarker for Predicting Unstable Plaque **CME**

G. Sarlon-Bartoli ^{a,*}, A. Boudes ^a, C. Buffat ^b, M.A. Bartoli ^a, M.D. Piercecchi-Marti ^c, E. Sarlon ^d, L. Arnaud ^e, Y. Bennis ^e, B. Thevenin ^f, C. Squarcioni ^f, F. Nicoli ^f, F. Dignat-George ^e, F. Sabatier ^e, P.E. Magnan ^f, for the RISC Study Group

^aService de Chirurgie Vasculaire, Faculté de Médecine de Marseille, Université de la Méditerranée, Assistance Publique Hôpitaux de Marseille - Hôpital de la Timone, 13005 Marseille, France

^bService de Biochimie, Hôpital de la Conception, Marseille, France

^cService de Médecine Légale Droit de la Santé, Hôpital de la Timone, Marseille, France

^dInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Inserm U669, Paris, France

^eFaculté de Pharmacie, Université de la Méditerranée, Inserm U608, Marseille, France

^fService de Neurologie Vasculaire, Hôpital de la Timone, Marseille, France

WHAT THIS PAPER ADDS

- Our work focussed on a new biomarker for predicting vulnerability of carotid plaque, the plasmatic level of lipoprotein-associated phospholipase A2. We reported that Lp-PLA2 is increased in patients with unstable and high-grade carotid stenosis.
- Lp-PLA2 may thus be a relevant biomarker that could classify a carotid plaque as vulnerable or not, and predict neurologic risk of a carotid stenosis in asymptomatic subjects.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 June 2011

Accepted 10 October 2011

Available online 9 November 2011

Keywords:

Lp-PLA2

High-grade carotid stenosis

Atherosclerosis

Unstable plaque

ABSTRACT

Objective: To test plasma levels of lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) in patients with high-grade carotid stenosis according to plaque histology.

Methods: This cross-sectional single-centre study included patients with $\geq 70\%$ North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial (NASCET) carotid stenosis, who were treated surgically. Serum Lp-PLA2 and high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) were determined on the day of surgery. Histopathological analysis classified carotid plaque as stable or unstable, according to AHA classification.

Results: Of the 42 patients (mean age 70.4 ± 10.5 years; 67% men), neurological symptoms were present in 16 (38%). Unstable plaques were found in 23 (55%). Median plasma level of Lp-PLA2 was significantly higher in patients with unstable plaque compared to those with stable plaque (222.4 (174.9–437.5) interquartile range (IQR) 63.5 vs. 211.1 (174.9–270.6) IQR 37.2 ng ml⁻¹; $p = 0.02$). Moreover, median Lp-PLA2 level were higher in asymptomatic patients with unstable plaque (226.8 ng ml⁻¹ (174.9–437.5) IQR 76.8) vs. stable plaque (206.9 ng ml⁻¹ (174.9–270.6) IQR 33.7 ; $p = 0.16$). Logistic regression showed that only the neurological symptoms (OR 30.9 (3.7–244.6); $p < 0.001$) and the plasma Lp-PLA2 level (OR 1.7 (1.1–12.3); $p = 0.03$) were independently associated with unstable carotid plaque as defined by histology.

Conclusions: This study showed that circulating Lp-PLA2 was increased in patients with high-grade carotid stenosis and unstable plaque. Lp-PLA2 may be a relevant biomarker to guide for invasive therapy in asymptomatic patients with carotid artery disease.

© 2011 European Society for Vascular Surgery. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

CME To access continuing medical education questions on this paper, please go to www.vasculareducation.com and click on 'CME'

* Corresponding author. Chirurgie Vasculaire, Hôpital de la Timone, 264 rue saint pierre, 13385 Marseille cedex 05, France. Tel.: +33491385772; fax: +33491384370.
E-mail address: gabrielle.sarlon@ap-hm.fr (G. Sarlon-Bartoli).

Systematic surgery of patients with $\geq 70\%$ North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial (NASCET)¹ asymptomatic carotid stenosis is actually debated. This reflects the considerable improvement in medical treatment not only by strict control of

cardiovascular (CV) risk factors, but also by the recent provision of anti-platelet therapy, statins and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors. This medical approach may reduce the risk of stroke inherent with carotid stenosis to levels below the stroke-risk due to surgery.² However, for some patients, despite this best medical treatment, the risk of carotid stenosis is not completely abolished and additional surgery can be useful, especially in patients who would otherwise have >10 years of life expectancy.³

In this context, several markers have been tested to select patients who would most benefit from surgery: systemic biological markers (high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), metalloproteinase-2 MMP-2 and MMP-9)⁴ and imaging techniques (contrast ultrasound, high-resolution magnetic resonance imaging (MRI) and nuclear techniques) have been assessed for their ability to detect unstable carotid plaques. Recently, lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) has been considered as an original independent biomarker of both coronary heart disease and ischaemic stroke associated with atherosclerosis.⁵ Lp-PLA2 is a calcium-independent member of the phospholipase A2 enzyme family, and can hydrolyse oxidised phospholipids to generate lysophosphatidylcholine and oxidised fatty acids, which have proinflammatory properties. Lp-PLA2 is secreted *de novo* by plaque inflammatory cells⁶ and is thus implicated in the genesis of vulnerable plaques. In 2008, an international consensus panel included a level of Lp-PLA2 >200 ng ml⁻¹ as a new parameter to improve the stratification of CV-risk patients.⁷ Recently, Mannheim et al. showed that local expression of Lp-PLA2 in carotid plaque is increased in patients with clinical vulnerable plaque.⁸

The objective of our study was to compare plasma levels of Lp-PLA2 in patients with high-grade carotid stenosis according to plaque histology.

Materials and Methods

Patients

Patients with high-grade carotid stenosis, who were referred to our vascular surgery department for a carotid endarterectomy, were included from June 2009 to June 2010. All symptomatic patients had a clinical evaluation by a neurologist, a brain imaging and cardiac examinations (trans-oesophageal echocardiography and electrocardiogram (ECG) monitoring). Informed consent was obtained from all patients. All procedures were approved by the local human-ethics committee. High-grade carotid stenosis was defined by a $\geq 70\%$ diameter reduction using the NASCET method.¹ All the data were collected prospectively. Hypercholesterolaemia was defined as low-density lipoprotein (LDL) cholesterol >160 mg dl⁻¹ or long-term statin therapy. Medical therapy was defined as the treatment at the admission in our vascular surgery department. NASCET clinical criteria¹ were used to classify patients as neurologically symptomatic or asymptomatic. Patients with clinical signs of infection were excluded. A carotid endarterectomy was performed using conventional surgical techniques and removed carotid plaque was collected for histopathological analysis.

Laboratory measurements

On the day of surgery, blood samples were taken for subsequent analysis (hs-CRP and Lp-PLA2), and plasma were stored at -70°C until analysis. Lp-PLA2 was measured using the PLACTM Test (diaDexus Inc., San Francisco, CA, USA) test, which uses a dual monoclonal antibody immunoassay, which was standardised to recombinant Lp-PLA2.⁹ Hs-CRP was measured using the SYNCHRON LX PRO System, which has been validated to the Beckman Coulter method. Biological analyses were performed blinded to the clinical details.

Histological assessment and immunohistochemistry of carotid plaques

The samples were fixed for 24 h in 4% neutral buffered formalin, dehydrated in graded alcohols, cleared in xylene and embedded in paraffin. Serial (5 μm) samples were cut for haematoxylin–eosin staining (HES) and immunohistochemical procedures to identify specific antibodies. Automated immunohistochemistry was performed with an avidin–biotin–peroxidase complex using a Ventana Benchmark XT. The following antibodies were used: anti-CD 3 (polyclonal rabbit anti-human, Dako, pre-diluted 1/2) and anti-CD 68 (monoclonal mouse anti-human clone KP1, Dako, diluted 1/2500).

Morphological characteristics of the carotid plaque were established on HES sections according to the classification of the American Heart Association (AHA)¹⁰ (Fig. 1). Lesions referred to as stable were AHA type V, characterised by fibrous conjunctive tissue, together with extracellular lipids and laminated acellular collagen, without any endothelial disruption (Va), or were only fibrous conjunctive tissue (Vb). Lesions referred to as unstable were type VI, characterised by ulceration of the endothelial surface (VIa) or recent intra-plaque haemorrhage (VIb), or an intra-plaque thrombosis (VIc). Six sections per patient were analysed. The quantification of T lymphocytes and macrophages was established from immunohistochemical sections that were taken from the area around the lipid core. Quantitative evaluation of 10 optical fields was performed at $\times 400$ magnification. Results are expressed as the number of cells per 10 fields.

Statistical analyses

The patients' characteristics were compared at baseline according to the plaque's morphology and the presence of neurological symptoms in the patient. Results were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD) or median (min–max) with interquartile range (IQR). Bivariate analyses were conducted with all appropriate continuous variables using Student's *t*-test or a Mann–Whitney test. Categorical variables were analysed by the chi-squared or Fisher's exact test. The statistical analysis was considered to be significant for $p < 0.05$. Multivariate analysis was carried out by elaborating a logistic regression model to estimate the probability of an unstable plaque according to the relevant parameters. The selection of variables was made according to a literature review¹¹ and the results of bivariate analyses (variables associated with $p < 0.05$): age, sex, the existence of a hypercholesterolaemia, the presence of neurological symptoms, the Lp-PLA2 level and the hs-CRP level. Analysis was performed using R for Windows, version 2.11.1.

Results

Population characteristics

A total of 42 patients (28 men and 14 women) were included with a mean age of 70.4 ± 10.6 years. During the inclusion period, 30 patients were not included because of unavailable biological or histological samples or patients' rejection. Neurological symptoms were present in 16 patients (38%): five (31%) had a transient ischaemic attack (three with hemispheric symptoms and two with amaurosis fugax) and 11 (69%) had a stroke. Mean carotid-diameter reduction was $82.8 \pm 8.6\%$. At hospital admission, 41 patients (98.0%) were receiving anti-platelet therapy, 26 (61.9%) were receiving statins and 18 (42.9%) were receiving ACE inhibitors. All patients warranted that they took their treatment. The mean time between neurological symptoms and carotid surgery was 11.4 ± 7.2

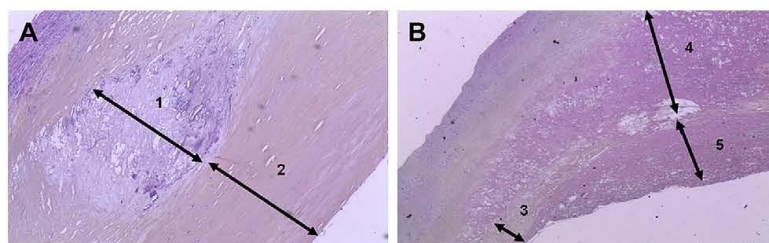


Figure 1. Examples of stable (A) and unstable plaque (B) obtained by histological analysis according to the American Heart Association's classification.¹⁹ A: Plaque defined as stable (AHA type V) are characterised by a small lipid core (1) and a large fibrous cap (2) on haematoxylin–eosin staining (HES). Original magnification $\times 200$. B: Plaque defined as unstable (AHA type VI) are characterised by a thin fibrous cap (3), a large and altered lipid core (4), and an intra-plaque thrombosis with rupture of the cap (5) on HES-staining. Original magnification $\times 100$.

days. After histological analysis, the plaques were classified as unstable (55%, $n = 23$) or stable (45%, $n = 19$). The most frequently encountered cells were macrophages (mean per 10 fields: 33.6 ± 15.3) more than T lymphocytes (mean per 10 fields: 13.5 ± 11.7).

Characteristics for all patients regarding 'neurological symptoms' vs. the 'asymptomatic' patients, and 'unstable plaques' vs. 'stable plaques', are summarised in Table 1. There was no statistical difference regarding age, gender, CV-risk factors, prior history of coronary artery disease or peripheral artery disease, or medical therapy. Hypercholesterolaemia was more frequent in asymptomatic patients and in patients with stable plaques ($p = 0.04$). Unstable plaque was significantly associated with the presence of neurological symptoms ($p = 0.001$) and with the number of macrophages in the plaque ($p = 0.02$). There was no association between high-density lipoprotein (HDL) and Lp-PLA2.

Plasma Lp-PLA2, neurological symptoms and carotid-plaque morphology

Median plasma level of Lp-PLA2 in the total patient population was 214.6 ng ml^{-1} (174.9–437.5). Thirty-one patients (74%) had an Lp-PLA2 level $\geq 200 \text{ ng ml}^{-1}$, 18 patients had unstable plaque (78%, $n = 23$) and 13 had stable plaque (68%, $n = 19$, $p = 0.18$). Median plasma level of Lp-PLA2 was significantly higher in patients with unstable plaque including ulcerated plaque compared to those with stable plaque (222.4 (174.9–437.5) IQR 63.5 vs. 211.1 (174.9–270.6) IQR 37.2 ng ml^{-1} ; $p = 0.02$) (Fig. 2). There was no significant

difference between patients with or without neurological symptoms (220.0 (182.2–349.7) IQR 62.6 vs. 213.0 (174.9–437.5) IQR 33.7 ng ml^{-1} ; $p = 0.43$) (Fig. 2).

Plasma hs-CRP, neurological symptoms and carotid-plaque morphology

Median plasma level of hs-CRP in the total patient population was 4.7 mg l^{-1} (0.5–83). This was significantly higher in patients with unstable plaque compared to those with stable plaque (11.0 (1–83) IQR 16.8 vs. 2.0 (0.5–25) IQR 3.5 mg l^{-1} ; $p = 0.01$) (Fig. 3). Similarly, median plasma level of hs-CRP was significantly higher in patients with neurological symptoms compared to asymptomatic patients (12.0 (2–83) IQR 19.0 vs. 1.9 (0.5–25) IQR 3.0 mg l^{-1} ; $p = 0.009$) (Fig. 3).

Lp-PLA2 and hs-CRP plasma levels in asymptomatic patients with unstable carotid plaques vs. stable plaques

In patients without neurological symptoms, eight had unstable plaques and 18 had stable plaques, as assessed by histology. Characteristics were identical whatever the carotid-plaque morphology (Table 2). Plasma Lp-PLA2 was higher in patients with unstable plaques compared to those with stable plaques (226.8 (174.9–437.5) IQR 76.8 vs. 206.9 (174.9–270.6) IQR 33.7 ng ml^{-1} ; $p = 0.16$) (Fig. 2). However, hs-CRP levels were similar between patients with unstable or stable plaques (2.8 (1–13.6) IQR 6.5 vs. 1.9 (0.5–25) IQR 3.0 mg l^{-1} ; $p = 0.53$) (Fig. 3).

Table 1

Clinical and therapeutic characteristics of all patients and of those with neurological symptoms or a plaque morphology.

	All patients $n = 42$ (%)	Neurological symptoms			Plaque morphology		
		No $n = 26$ (%)	Yes $n = 16$ (%)	p	Stable $n = 19$ (%)	Unstable $n = 23$ (%)	p
Age (years; mean $\pm$ SD)	70.4 ± 10.6	72.2	67.4	0.18	73.1	68.2	0.14
Male gender	28 (66.6)	16 (61.5)	12 (75.0)	0.57	12 (63.2)	16 (69.6)	0.91
Body-mass index (mean)	26	26.1	25.8	0.80	26	25.9	0.95
Hypertension	32 (76.2)	22 (84.6)	10 (62.5)	0.20	17 (89.5)	15 (65.2)	0.14
Diabetes mellitus	7 (16.7)	6 (23.1)	1 (6.2)	0.31	5 (26.3)	2 (8.7)	0.27
Hypercholesterolaemia	30 (71.4)	22 (84.6)	8 (50.0)	0.04	17 (89.5)	13 (56.5)	0.04
Smoker	13 (31.0)	8 (30.8)	5 (31.2)	0.75	5 (26.3)	8 (34.8)	0.79
CAD or PAD	15 (35.7)	9 (34.6)	6 (37.5)	0.64	6 (31.5)	9 (39.1)	0.61
Antiplatelets	41 (98.0)	26 (100)	15 (93.8)	0.77	19 (100)	22 (95.7)	0.83
Statins	26 (61.9)	18 (69.2)	8 (50.0)	0.20	13 (68.4)	13 (56.5)	0.30
Neurological event	16 (38.1)	0 (0)	16 (100)	—	1 (5.0)	15 (65.0)	0.001
Unstable plaque	23 (54.8)	8 (30.8)	15 (93.7)	0.001	0 (0)	23 (100)	—
Macrophages CD68 (mean $\pm$ SD)	33.6 ± 15.3	32.8	34.8	0.87	27.7	38.4	0.02
T lymphocytes CD3 (mean $\pm$ SD)	13.5 ± 11.7	13.3	13.9	0.70	11.5	15.0	0.19

CAD: coronary artery disease, PAD: peripheral artery disease.

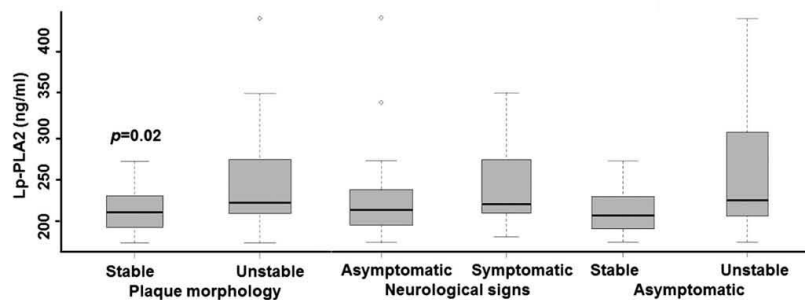


Figure 2. Box and whisker plots representing circulating Lp-PLA2 levels in patients with regard to plaque morphology or/and neurological symptoms. Circulating Lp-PLA2 levels were significantly increased in patients with unstable plaque ($p = 0.02$). The bottom and top of the box represent the 25th and 75th percentile and the band near the middle of the box is the median. The ends of the whiskers represent the lowest datum still within 1.5 interquartile range of the lower quartile, and the highest datum still within 1.5 interquartile range of the upper quartile.

Multivariate analyses

After logistic regression, only the presence of neurological symptoms and elevated plasmatic Lp-PLA2 levels were independently associated with unstable plaque. The risk of unstable carotid plaque was increased 1.7-fold to an Lp-PLA2 level of ≥ 200 ng ml⁻¹ (OR = 1.7 (1.1–12.3); $p = 0.03$) and was 30.9 times more with neurologic symptoms (OR = 30.9 (3.7–244.6); $p < 0.001$). This result was not improved when hs-CRP level was associated to Lp-PLA2 level.

Discussion

Our study shows that the patients with high-grade carotid stenosis and unstable plaques have a significantly higher plasmatic Lp-PLA2 level than patients with stable plaques. These findings strongly suggest a role for Lp-PLA2 in the pathophysiology and clinical presentation of unstable carotid stenosis, thus supporting the report of Mannheim et al. in 2008.⁸ These authors enrolled 167 patients who had undergone a carotid endarterectomy; they found increased local expression of Lp-PLA2 in symptomatic patients and vulnerable plaque. These results may be interesting to predict neurological risk of a carotid stenosis in asymptomatic patients in whom surgery is actually highly debated given the low rate of stroke with the best medical therapy.^{2,3}

Interest in Lp-PLA2 as a biomarker for CV disease emerged 10 years ago after WOSCOPS publication (West of Scotland Coronary Prevention Study, WOSCOPS), which showed a positive association between elevated circulating concentrations of Lp-PLA2 and the

risk of coronary events.¹² Since then, several reports have confirmed these results in coronary artery and cerebrovascular diseases.¹³ Although some reports inconclusively found this positive association,¹⁴ two recent meta-analyses and one review have confirmed that, after multivariate adjustments, increased levels of Lp-PLA2 remain a reliable marker for increased risk of CV events.^{5,15,16}

In this study, we chose to measure the mass of Lp-PLA2 without analysing its activity. Lp-PLA2 is an enzyme that can be measured by either its mass or its activity. In a recent meta-analysis, Madjid et al. found 16 studies that measured mass, 12 studies that measured activity and six that included both mass and activity.¹⁵ Currently, there is no consensus on the best method to estimate Lp-PLA2 level. However, in 2008, a panel's recommendation, which incorporated Lp-PLA2 testing into the CV disease-risk assessment guidelines, used mass to measure Lp-PLA2 when stratifying patients.⁷ Recently, the US Food and Drug Administration approved the immunoassay PLAC test, which measures Lp-PLA2 mass to screen patients who are at high risk of CV disease. In this context, we have preferred to assess the mass of Lp-PLA2, and not its activity. However, a large-scale, randomised, multicentre trial is needed to determine which assay method is superior.

Our study reports that patients with neurological symptoms, or with unstable carotid plaque, have hs-CRP levels significantly higher than asymptomatic patients or those with stable plaque. Similarly, Alvarez et al., in 2003, reported this correlation in 62 patients with high-grade carotid stenosis.⁴ Moreover, after logistic regression, Lp-PLA2, but not hs-CRP, was independently associated with unstable plaque, as defined by histology. Elkind et al. studied

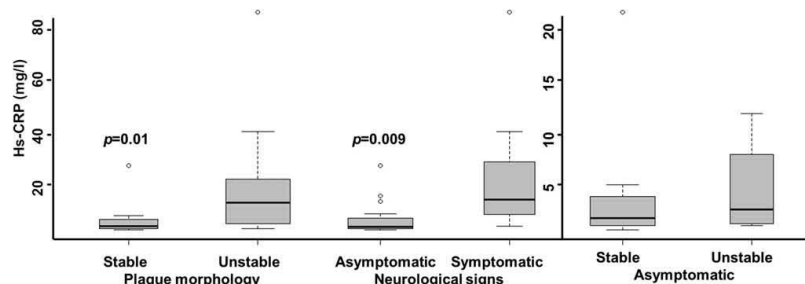


Figure 3. Box and whisker plots representing hs-CRP levels of patients with regard to plaque morphology or/and neurological symptoms. Hs-CRP levels were significantly increased in patients with unstable plaque ($p = 0.01$) and neurological symptoms ($p = 0.009$).

Table 2
Clinical and therapeutic characteristics of asymptomatic patients regarding plaque morphology.

	Plaque morphology		p
	Stable n = 18 (%)	Unstable n = 8 (%)	
Age (years; mean $\pm$ SD)	72.9 $\pm$ 10.7	70.6 $\pm$ 6.4	0.53
Male gender	11 (61.1)	5 (62.5)	0.71
Body-mass index (mean)	26.3	25.6	0.59
Hypertension	16 (88.9)	6 (75.0)	0.75
Diabetes mellitus	5 (27.8)	1 (12.5)	0.72
Hypercholesterolaemia	16 (88.9)	6 (75.0)	0.75
Smoker	5 (27.8)	3 (37.5)	0.66
CAD or PAD	6 (33.3)	3 (37.5)	0.68
Antiplatelets	18 (100)	8 (100.0)	0.57
Statins	13 (72.2)	5 (62.5)	0.97
Macrophages CD68 (mean $\pm$ SD)	28.3 $\pm$ 14.2	42.9 $\pm$ 13.6	0.03
T lymphocytes CD3 (mean $\pm$ SD)	11.5 $\pm$ 10.5	17.2 $\pm$ 12.0	0.26

CAD: coronary artery disease, PAD: peripheral artery disease.

Lp-PLA2 mass and hs-CRP in 467 patients after a first ischaemic stroke and concluded that Lp-PLA2, but not hs-CRP, was associated with the recurrence of ischaemic neurological events.¹⁷ In addition, a biovariability study on samples from 43 non-fasting healthy adults reported greater stability of Lp-PLA2 compared to hs-CRP levels in peripheral blood.¹⁸ All these results suggest that enhancement of hs-CRP may be a consequence of stroke and that Lp-PLA2 is more relevant than hs-CRP to predict vulnerability of carotid plaques.

Pathophysiological mechanisms that explain the association between circulating Lp-PLA2 and unstable atherosclerosis plaques are unclear and complex; however, a pro-atherogenic biological role for Lp-PLA2 has ever been suggested before. Lp-PLA2 has been shown to promote modification of LDL, to enhance binding to matrix proteoglycans, and to facilitate their aggregation and oxidation. The accumulation of such modified LDL in the intimal subendothelial space is a key initiation step in endothelial activation and atherosclerotic-plaque rupture.^{15,16} Locally, Lp-PLA2 has been detected in human carotid atherosclerotic plaques, but not in areas of the adjacent normal arterial wall.¹⁹ Its expression is mainly confined to plaque areas with massive lipid accumulation and leucocyte infiltration, cellular necrosis and calcification: this suggests that Lp-PLA2 is a marker for unstable plaque. As Lp-PLA2 is produced by macrophages and foam cells within atherosclerotic vulnerable plaques, excessive Lp-PLA2 may be released into peripheral blood and, thus, could indicate these unstable plaques.

Study limitations are the small number of asymptomatic patients who do not allow to obtain a significant association between Lp-PLA2 and unstable plaque, even though the trend is strong. Also, we were not able to determine a cut-off point for Lp-PLA2 to classify patients but we demonstrated that the risk of unstable carotid plaque was increased 1.7-fold to an Lp-PLA2 level of ≥ 200 ng ml⁻¹, which is the cut-off point used by the international consensus on Lp-PLA2 to classify the level of CV risk.⁷ Moreover, we used as definition of hypercholesterolaemia: LDL cholesterol ≥ 160 mg dl⁻¹ or long-term statin therapy. With this definition, we obtained significantly more patients with hypercholesterolaemia in asymptomatic patients and in stable plaque because these patients ever took statin therapy for CV diseases or carotid stenosis. However, logistic regression showed that Lp-PLA2 was correlated to plaque instability whatever level of hypercholesterolaemia. Finally, Lp-PLA2 may reflect a systemic state of vulnerable atherosclerosis without localising the real culprit lesion. Several teams have developed imaging techniques, using contrast ultrasound, high-resolution MRI and nuclear imaging to analyse

parameters of instability, such as intra-plaque haemorrhage or a thrombus. A multi-marker strategy that coupled biology and imaging could improve identification of at-risk asymptomatic atherosclerotic lesions to guide effective therapy.

Conclusions

We have shown in this preliminary study that circulating Lp-PLA2 was increased in patients with unstable carotid stenosis. These findings strongly support a role for Lp-PLA2 in the pathophysiology and clinical presentation of carotid artery disease. Lp-PLA2 may be a relevant biomarker that could identify vulnerable carotid stenosis. Further studies are warranted to confirm these preliminary results and to determine a threshold value to predict the neurological risk of a carotid stenosis in asymptomatic subjects.

Acknowledgements

We thank the paramedical teams of the Vascular Surgery Department for their help in conducting this work.

Funding

This study was supported by The French Society for Vascular Surgery (Société de Chirurgie Vasculaire de Langue Française).

Conflict of Interest

None.

References

- North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high grade stenosis. *NEJM* 1991;**325**:445–53.
- Naylor AR, Gaines PA, Rothwell PM. Who benefits most from intervention for asymptomatic carotid stenosis: patients or professionals? *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2009;**37**:625–32.
- Halliday A, Harrison M, Hayter E, Kong X, Mansfield A, Marro J, et al. Asymptomatic Carotid Surgery Trial (ACST) Collaborative Group. 10-year stroke prevention after successful carotid endarterectomy for asymptomatic stenosis (ACST-1): a multicentre randomised trial. *Lancet* 2010;**376**:1074–84.
- Alvarez Garcia B, Ruiz C, Chacon P, Sabin JA, Matas M. High-sensitivity C-reactive protein in high-grade carotid stenosis: risk marker for unstable carotid plaque. *J Vasc Surg* 2003;**38**:1018–24.
- Thompson A, Gao P, Orfei L, Watson S, Di Angelantonio E, Kaptoge S, et al. for the Lp-PLA(2) Studies Collaboration. Lipoprotein-associated phospholipase A(2) and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies. *Lancet* 2010;**375**:1536–44.
- Zalewski A, Macphee C. Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis: biology, epidemiology, and possible therapeutic target. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;**25**:923–31.
- Davidson MH, Corson MA, Alberts MJ, Anderson JL, Gorelick PB, Jones PH, et al. Consensus panel recommendation for incorporating lipoprotein-associated phospholipase A2 testing into cardiovascular disease risk assessment guidelines. *Am J Cardiol* 2008;**101**:51F–7F.
- Mannheim D, Herrmann J, Versari D, Gössl M, Meyer FB, McConnell JP, et al. Enhanced expression of Lp-PLA2 and lysophosphatidylcholine in symptomatic carotid atherosclerotic plaques. *Stroke* 2008;**39**:1448–55.
- Caslake MJ, Packard CJ, Suckling KE, Holmes SD, Chamberlain P, Macphee CH. Lipoprotein-associated phospholipase A(2), platelet-activating factor acetylhydrolase: a potential new risk factor for coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2000;**150**:413–9.
- Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull Jr W, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. *Circulation* 1995;**92**:1355–74.
- Brilakis ES, Khera A, McGuire DK, See R, Banerjee S, Murphy SA, et al. Influence of race and sex on lipoprotein-associated phospholipase A2 levels: observations from the Dallas heart study. *Atherosclerosis* 2008;**199**:110–5.
- Packard CJ, O'Reilly DS, Caslake MJ, McMahon AD, Ford I, Cooney J, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease: west of Scotland coronary prevention study group. *N Engl J Med* 2000;**343**:1148–55.
- Nambi V, Hoogeveen RC, Chambless L, Hu Y, Bang H, Coresh J, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and high-sensitivity C-reactive protein improve the stratification of ischemic stroke risk in the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Stroke* 2009;**40**:376–81.

- 14 Caslake MJ, Packard CJ, Robertson M, Cooney J, Nelson JJ, Ford I, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A(2), inflammatory biomarkers, and risk of cardiovascular disease in the prospective study of pravastatin in the elderly at risk (PROSPER). *Atherosclerosis* 2010;**210**:28–34.
- 15 Madjid M, Ali M, Willerson JT. Lipoprotein-associated phospholipase A2 as a novel risk marker for cardiovascular disease: a systematic review of the literature. *Tex Heart Inst J* 2010;**37**:25–39.
- 16 Mallat Z, Lambeau G, Tedgui A. Lipoprotein-associated and secreted phospholipases A2 in cardiovascular disease: roles as biological effectors and biomarkers. *Circulation* 2010;**122**:2183–200.
- 17 Elkind MS, Tai W, Coates K, Paik MC, Sacco RL. High-sensitivity C-reactive protein, lipoprotein-associated phospholipase A2, and outcome after ischemic stroke. *Arch Intern Med* 2006;**166**:2073–80.
- 18 Wolfert RL, Kim NW, Selby RG, Sarno MJ, Warnick RG, Sudhir K. Biological variability and specificity of lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2), a novel marker of cardiovascular risk. *Circulation* 2004;**110**:309.
- 19 Menschikowski M, Kasper M, Lattke P, Schiering A, Schiefer S, Stockinger H, et al. Secretory group II phospholipase A2 in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 1995;**118**:173–81.

2.1. La dysfonction vasculaire comme cible de stratégies thérapeutiques innovantes de l'ischémie critique des membres inférieurs

Manuscrit 1 : Le prétraitement des progéniteurs endothéliaux tardifs par de l'érythropoïétine avant leur transplantation nécessite la sous-unité CD131 et augmente leur potentiel angiogénique.

Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2012 ;10:1914-28.

L'ischémie critique des membres inférieurs est une pathologie grave aboutissant chez 30% des patients à une amputation devant l'absence d'autres solutions thérapeutiques. La thérapie cellulaire par progéniteurs endothéliaux est une alternative séduisante dans l'avenir pour ces patients mais l'efficacité angiogénique de cette technique doit être optimisée. L'EPO est une cytokine récemment impliquée dans les processus de néoangiogenèse post-natale. Ses effets sont médiés par un récepteur membranaire formé d'une sous-unité d'EPOR et d'une sous-unité, le β CR ou CD131, qui semble impliquée lors des effets angiogéniques et antiapoptotiques de l'EPO.

Notre objectif était de pré-traiter *ex vivo* avec de l'EPO les ECFCs isolés à partir de sang de cordons humains et de mesurer l'amélioration des capacités proangiogéniques *in vitro* et *in vivo* des ECFCs grâce à ce pré-traitement. Nous avons aussi étudié le rôle de la sous-unité CD131 du récepteur de l'EPO dans ces effets pro-angiogéniques.

Nous avons montré, par western blot sur des lysats cellulaires d'ECFCs issus de sang de cordon, que l'expression de l'EPOR et la sous-unité CD131 augmente significativement après pré-traitement par de l'EPO. Ces deux protéines colocalisent et coimmunoprécipitent, suggérant une liaison covalente sur les ECFCs. Le pré-traitement par de l'EPO à 5IU/mL améliore significativement la prolifération, la cicatrisation, la migration et la capacité de former des tubes capillaires des ECFCs en culture. Le pré-traitement par EPO des ECFCs augmente aussi leur résistance à l'apoptose induite par H₂O₂ et leur survie *in vivo*. Sur un modèle d'ischémie de patte de souris nude, l'injection intraveineuse 24h après l'induction de l'ischémie d'ECFCs pré-traitées *ex vivo* par de l'EPO à 5IU/mL augmente significativement à J14 la reperfusion du membre ischémié mesurée en laser doppler et la densité capillaire mesurée en immunohistochimie à l'aide d'anticorps antiCD31, en comparaison à du placebo et à un groupe traité seulement par ECFCs. Ces résultats sont tous abolis si la sous-unité CD131 du récepteur de l'EPO est inactivée par méthode de transfection des ECFCs.

En conclusion, l'EPO est une cytokine qui améliore les capacités proangiogéniques des ECFCs *in vitro* et *in vivo* sur un modèle d'ischémie de patte de souris nude. Ces effets semblent médiés par la sous-unité CD131 du récepteur à l'EPO. Si ces résultats se confirment chez l'homme, l'EPO pourrait être utilisée pour améliorer les capacités de revascularisation des PECs tardifs circulants humains avant réinjection autologue chez des patients atteints d'ischémie critique des membres inférieurs.

ORIGINAL ARTICLE

Priming of late endothelial progenitor cells with erythropoietin before transplantation requires the CD131 receptor subunit and enhances their angiogenic potential

Y. BENNIS,*¹ G. SARLON-BARTOLI,*^{†1} B. GUILLET,*[‡] L. HUBERT,* L. PELLEGRINI,*[§] L. VELLY,*[§] M. BLOT-CHABAUD,* F. DIGNAT-GEORGE,* F. SABATIER,*[¶] and P. PISANO*[‡]

*Aix-Marseille Université, UMR INSERM1076, Faculté de Pharmacie, Marseille; †Service de chirurgie vasculaire, CHU La Timone, Marseille;

‡CERIMED – Centre Européen de Recherche en Imagerie Médicale, Marseille; §Département d'anesthésie réanimation, CHU Timone, Marseille;

and ¶Laboratoire de Culture Cellulaire, INSERM CIC-BT 510, CHU Conception, Marseille, France

To cite this article: Bennis Y, Sarlon-Bartoli G, Guillet B, Hubert L, Pellegrini P, Velly L, Blot-Chabaud M, Dignat-George F, Sabatier F, Pisano P. Priming of late endothelial progenitor cells with erythropoietin before transplantation requires the CD131 receptor subunit and enhances their angiogenic potential. *J Thromb Haemost* 2012; **10**: 1914–28.

Summary. *Background:* Endothelial colony-forming cells (ECFCs) are promising candidates for cell therapy of ischemic diseases. Erythropoietin (EPO) is a cytokine that promotes angiogenesis after ischemic injury. EPO receptors (EPORs) classically include two EPOR subunits, but may also associate with the β -common chain (CD131) in a newly identified receptor involved in EPO cytoprotective effects. *Objective:* The aim was to take advantage of the proangiogenic properties of EPO to enhance ECFC graft efficiency. We postulated that priming ECFCs by adding epoetin α in culture medium prior to experiments might increase their angiogenic properties. We also explored the role of the CD131 subunit in EPO priming of ECFCs. *Methods and Results:* By western blotting on cord blood ECFC lysates, we showed that EPOR and CD131 expression increased significantly after EPO priming. These proteins coimmunoprecipitated and colocalized, suggesting that they are covalently bound in ECFCs. EPO at 5 IU mL⁻¹ significantly stimulated proliferation, wound healing, migration and tube formation of ECFCs. EPO priming also increased ECFC resistance to H₂O₂-induced apoptosis and survival *in vivo*. Similarly, *in vivo* studies showed that, as compared with non-primed ECFC injection, 5 IU mL⁻¹ EPO-primed ECFCs, injected intravenously 24 h after hindlimb ischemia in athymic nude mice, increased the ischemic/non-ischemic ratios of hindlimb blood flow and capillary density. These effects were all prevented by CD131 small interfering RNA transfection,

and involved the phosphoinositide 3-kinase–Akt pathway. *Conclusion:* These results highlight the potential role of EPO-primed ECFCs for cell-based therapy in hindlimb ischemia, and underline the critical role of CD131 as an EPO coreceptor.

Keywords: angiogenesis, apoptosis, endothelial colony-forming cells, endothelial progenitor cells, erythropoietin, ischemia.

Introduction

The prognosis of patients with severe peripheral artery disease remains poor when there is no indication for revascularization therapies, and amputation is necessary in more than one-third of patients at the stage of critical limb ischemia [1]. Hence, new cell-based therapies are being developed to stimulate revascularization of ischemic tissues. Recent clinical trials have illustrated the potential of autologous bone marrow (BM)-derived or peripheral blood-derived stem cell preparations to improve blood flow in patients with critical limb ischemia [2–4]. Although clinical improvements were observed, results have been variable, and efficacy remains to be proved. However, the BM preparations currently being used contain mainly hematopoietic and mesenchymal stem cells, whereas endothelial progenitor cells (EPCs) are only slightly represented. This has prompted the development of an alternative cell therapy product that could be enriched in progenitor cells displaying vasculogenic properties and isolated from a less invasive source. In cord blood, endothelial colony-forming cells (ECFCs) have been characterized as a homogeneous cell population of non-hematopoietic origin, obtained after long-term culture [5,6]. They are considered to be relevant EPCs because of their specific vasculogenic activity *in vivo* [7]. ECFCs are considerably enriched in cord blood as compared with adult peripheral blood, and cord blood ECFCs show a higher clonogenic potential, related to

Correspondence: Youssef Bennis, Laboratoire de Pharmacodynamie, UMR INSERM 1076, Faculté de Pharmacie de Marseille, 27, Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille, CEDEX 5, France.
Tel.: +33 4 91 83 56 41; fax: +33 4 91 25 50 36.
E-mail: youssef.bennis@ap-hm.fr

¹These authors contributed equally to this work.

Received 1 July 2011, accepted 20 June 2012

© 2012 International Society on Thrombosis and Haemostasis

cord blood cell immaturity [8]. These potentialities have been explored by the use of mouse models of hindlimb ischemia, where ECFCs promote recovery of tissue perfusion, angiogenesis, and muscular regeneration [7,9]. Although promising, ECFC-based strategies have several limitations, with respect to the low proportion of engrafted cells observed in preclinical models, the time required for isolation and expansion of a sufficient number of cells from blood, and the possible impairment of clonogenic and functional properties of circulating EPCs in patients presenting with cardiovascular risk factors. Therefore, specific cell 'enhancement strategies' aimed at improving the efficacy of cell-based proangiogenic therapies have been explored, and among them is *ex vivo* priming of the cell candidate before transplantation by proangiogenic factors [10,11].

Erythropoietin (EPO) is recognized as the main regulator of erythropoiesis, but recent studies have suggested the existence of non-hematopoietic effects of EPO [12]. In adults, EPO contributes to physiologic and pathologic angiogenesis, and the body's innate response to tissue injury and, especially, to ischemic injury [12–14]. The tissue-protective effects of EPO are likely, at least in part, to be carried out through induction of angiogenesis and antiapoptotic properties [14]. Accordingly, EPO induces a proangiogenic response in cultivated mature endothelial cells, and mobilizes BM-derived early EPCs and recruits them to ischemic tissue, where they stimulate reparative angiogenesis [15,16]. Also, antiapoptotic effects of EPO were reported *in vitro* in nerve cell cultures subjected to excitotoxic stress and *in vivo* after experimental cerebral ischemia [14]. In this context, we hypothesized that priming of ECFCs with EPO before transplantation could enhance their angiogenic potential after hindlimb ischemia. In this way, Zhang *et al.* [17] showed improved cardiac function in animals subjected to myocardial infarction and injected with EPO-primed BM stromal cells. Similarly, Oda *et al.* [18] reported an enhancement of the angiogenic potential of human mononuclear BM cells cultured in the presence of EPO and then transplanted in a mouse hindlimb ischemia model and in patients with chronic lower limb ischemia. At the molecular level, the tissue-protective effects of EPO seem to be mediated by the association of the known EPO receptor (EPOR) subunit involved in the hematopoietic effects of EPO with the CD131 subunit, also called β -common chain receptor, which is a constitutive part of cytokine receptors such as interleukin (IL)-3, IL-5, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) [19,20]. This hypothesis is supported by the fact that CD131 knockout mice are unable to respond to EPO's tissue-protective effects [19]. On this basis, using RNA interference targeting CD131, we explored the role of CD131 in the priming effect of EPO on ECFC activity. This, this study was aimed at evaluating: (i) the effect of *ex vivo* priming of cord blood-derived ECFCs by EPO on the functional properties of the cells; (ii) the angiogenic potential of EPO-primed ECFCs transplanted in a model of hindlimb ischemia in nude mice; and (iii) the impact of CD131 silencing on the priming effect of EPO.

Materials and methods

ECFC preparation and EPO priming

Human umbilical cord blood samples (30–50 mL) from healthy donors were collected, in compliance with French legislation, and ECFCs were isolated and characterized as previously described [21,22]. EPO priming consisted of a 24-h incubation with human recombinant EPO (10 000 IU mL⁻¹ epoetin α , Eprex; Janssen-Cilag, Issy-les-Moulineaux, France) diluted in EBM-2 (Clonetics Bio, Emerainville, France) supplemented with 0.5% fetal bovine serum (FBS) to a final concentration of 1.5–10 IU mL⁻¹. After extensive washing, cells were used in subsequent assays. In blocking experiments, antibody against the extracellular domain of the EPOR subunit (HI94, 1 : 200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) was added during EPO incubation. Cells maintained in 0.5% FBS/EBM-2 were used as control cells. In several experiments, cells maintained in EGM-2 (EBM-2 enriched with growth factors and vitaminsp Clonetics-Bio) were used as positive controls.

Coimmunoprecipitation

ECFC lysates (1 mg protein mL⁻¹) were incubated overnight at 4 °C with protein G Sepharose (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) previously coupled either to a rabbit anti-CD131 antibody (K17, 1 : 200; Santa Cruz Biotechnology), a mixture of two rabbit anti-EPOR antibodies (M20 and HI94, 1 : 200; Santa Cruz Biotechnology), or a rabbit isotype control antibody (1 : 200; Santa Cruz Biotechnology). The protein G Sepharose beads were washed with low-detergent lysis buffer, and western blotting was performed.

Membrane protein extraction

Membrane extracts were prepared with the Qproteome Plasma Membrane Protein Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Briefly, sequential addition of different buffers to ECFC pellets followed by incubation with a ligand specific for membrane molecules and precipitation with magnetic beads that bind to the ligand resulted in the isolation of the membrane compartment. After washing, plasma membrane proteins were eluted under native conditions, and the ligand remained bound to the beads. Fractions were then subjected to western blotting.

Western blotting

ECFC lysates or protein G Sepharose-immunoprecipitated beads were applied to the NuPAGE system (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), loaded for electrophoresis on a 4–12% gradient polyacrylamide gel, and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were then blocked and probed overnight at 4 °C with primary antibody. Membranes were washed and incubated with anti-rabbit or anti-mouse peroxidase-conjugated secondary antibody (1 : 10 000; Sigma-Aldrich, Lyon, France). Antibody detection was accomplished with the

ECL Plus system (Amersham Biosciences), and protein bands were quantified with a gel image analysis system. The primary antibodies used were rabbit anti-CD131 (K17, 1 : 200; Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-EPOR (M20, 1 : 200; Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-Akt (1 : 500; Invitrogen), rabbit anti-S473 phospho-Akt (pAkt, 1 : 500; Invitrogen), and mouse anti-human β -actin (1 : 5000; Sigma-Aldrich). Band densities were represented as an index of EPOR or CD131 to β -actin or pAkt corrected by β -actin to Akt corrected by β -actin.

EPOR and CD131 immunostaining

Confluent ECFCs, seeded on coverslips, were fixed with a 1 : 1 methanol and acetone mixture at -20°C for 10 min and blocked with phosphate-buffered saline (PBS)/FBS 10% (v/v) before EPOR and CD131 staining, respectively, with rabbit antibody against CD131 (K17, 1 : 100; Santa Cruz Biotech, Heidelberg, Germany) or mouse monoclonal anti-EPOR fluorescein-conjugated antibody (1 : 100; R&D Systems, Lille, France) overnight in blocking solution at 4°C in PBS. Cells were washed, and secondary anti-rabbit Alexa Fluor 568-conjugated antibody (1 : 200; Sigma-Aldrich, Saint Quentin, France) was added. Images were taken with a fluorescence microscope (Leica, Bron, France). 4',6-Diamidino-2-phenylindole (1:1000; Sigma-Aldrich) was used to visualize nuclei.

Proliferation, migration and tube formation assays

ECFC proliferation was measured by fluorescence labeling and a bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation assay. The migration capacity of ECFCs was evaluated by both analysis of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)-induced chemotaxis in a modified Boyden chamber and wound healing experiments. The *in vitro* angiogenic activity of ECFCs was tested with a capillary-like tube formation assay in Matrigel. All of these experiments are described in detail in Data S1.

Survival assays

The capacity of EPO priming to protect ECFCs against H_2O_2 -induced cytotoxicity was analyzed with cell death ELISA and lactate dehydrogenase (LDH) release assays, as described in Data S1.

The survival of ECFCs was also evaluated *in vivo* with bioluminescence studies. For this, ECFCs were infected with pCignalenti-CMV-luc vector (Cignal Lentireporter; SA Biosciences, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's protocol. The transduction was stabilized by the addition of puromycin during the culture, and bioluminescence emission was evaluated with a Photon Imager Imaging System (Biospace Lab, Paris, France). A total of 1×10^5 cells were resuspended in 400 μL of ice-cold Phenol Red-free Matrigel (BD Bioscience, Le Pont de Claix, France), and implanted on the back of an 8-week-old male NMRI nude mouse (Harlan, Gannat, France) by subcutaneous injection with a 25-gauge needle. Implants of Matrigel with EPO-pretreated ECFCs or

ECFCs were injected, respectively, on the right and left side of the mouse's back ($n = 5$). Bioluminescence emission was collected at days 0, 1, 3 and 6 after implantation with a Photon Imager Imaging System (Biospace Lab) and intraplug luciferin (Promega) administration. The collected data were analyzed with M3 vision (Biospace Lab), and results were expressed as a mean percentage of the bioluminescence emission (photons $\text{s}^{-1} \text{cm}^{-2} \text{sr}^{-1}$) of the contralateral control Matrigel plug. Results are reported as mean $\pm$ standard deviation (SD).

Vascular endothelial growth factor (VEGF) assays

VEGF concentrations in supernatants of ECFCs treated or not treated with 10 IU mL^{-1} EPO were determined with a commercially available ELISA kit (Quantikine Human VEGF; R&D Systems), according to the manufacturer's instructions. Values were normalized to cell number ($\text{pg } 10^{-5} \text{ cells}$), and are expressed as mean $\pm$ SD.

Small interfering RNA (siRNA) transfection protocol

The transfection was performed with a Nucleofector electroporation system, following the manufacturer's protocol for human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) (Amaxa). Briefly, 2×10^6 ECFCs were suspended in 100 μL of HUVEC Nucleofector Solution. The cell suspension was transfected with 20 μL of 10 μM (i.e. 2.5 μg) CD131 siRNA or control siRNA (Santa Cruz Biotechnology). To determine the optimal conditions, CD131 extinction was analyzed by western blotting after incubation with 5, 10 and 20 μL of 10 μM siRNA for 48, 72 or 96 h. Maximal CD131 extinction was observed at 72 h with 20 μL of siRNA (data not shown). There was no significant inhibition of CD131 expression in control siRNA-transfected ECFCs (Fig. 4A). All functional assays with CD131 siRNA were then performed 72 h after transfection with 20 μL of 10 μM siRNA.

Mouse model of hindlimb ischemia

This study was approved by the local ethics committee, and was conducted according to the the recommendations of the Helsinki Declaration. Unilateral hindlimb ischemia was performed after femoral artery ligation as previously described [10]. Twenty-four hours later, mice were randomly allocated to receive intravenous injections of PBS, 10^5 ECFCs or 10^5 ECFCs incubated for 24 h with 5 IU mL^{-1} EPO (EPO-ECFCs). For siRNA silencing experiments, two additional groups of mice were studied: those injected with ECFCs with siRNA silencing CD131 (siRNA_{CD131} ECFCs) and those injected with siRNA_{CD131} ECFCs primed with EPO. Hindlimb ischemic damage was quantified on day 14, as previously described [23]. The score was calculated for each mouse as follows: 0, no necrosis; 1, necrosis of one toe; 2, necrosis of two or more toes; 3, foot necrosis; 4, leg necrosis; and 5, autoamputation of the entire leg. Laser Doppler perfusion imaging (Perimed, Crapeyronne, France) was used to assess revascularization from day 1 to day 28 after surgery. Perfusion

results are expressed as a ratio of ischemic to non-ischemic limb blood flow. Fourteen days after cell transplantation or PBS injection, capillary density was assessed by immunohistochemistry on the gastrocnemius muscle, as previously described [10]. Capillaries and muscle fibers were counted in six different fields of each section. The capillary density of each muscle was expressed as the ratio of capillary number to muscular fiber number, in order to take into account muscle trophicity.

Statistical analysis

Data are expressed as means $\pm$ SD of at least three independent experiments. Significant differences were identified with ANOVA followed by the Student Newman Keuls multiple comparisons test. Clinical necrosis score was analyzed with the Kruskal Wallis test followed by the Mann Whitney *U* test. Statistical analysis was performed with SIGMASTAT 2.03 (SPSS, Chicago, IL, USA). A *P*-value of < 0.05 was considered to be statistically significant.

Results

EPOR and CD131 are expressed on ECFCs and upregulated by EPO priming

Western blot experiments revealed an EPOR-identified 59-kDa protein in whole cell lysates of control ECFCs, EPO-ECFCs, and UT-7 cells (Data S1). Expression levels of EPOR and CD131 in total cell lysates (Fig. 1C,F) were significantly increased in EPO-ECFCs (% of ECFCs: $227\% \pm 59\%$ and $152\% \pm 19\%$, respectively, $n = 3$, $P < 0.05$), whereas no significant increase in expression levels was measured in plasma membrane fractions (% of ECFCs: $127\% \pm 26\%$ and $103\% \pm 14\%$, respectively, $n = 3$, not significant [NS]) (Fig. 1B,E). Immunostaining showed that EPOR and CD131 colocalized in ECFCs and EPO-ECFCs (Fig. 2A). Association of the two subunits in both ECFCs and EPO-ECFCs was confirmed with coimmunoprecipitation experiments (Fig. 2B).

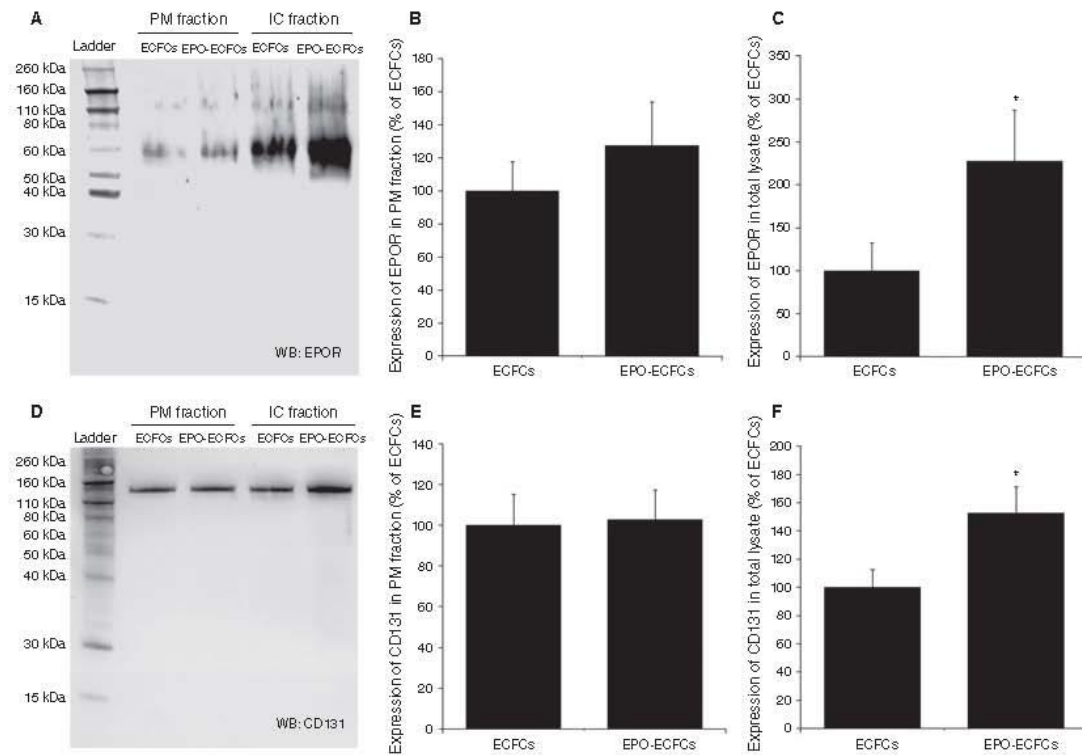


Fig. 1. Expression of erythropoietin (EPO) receptor (EPOR) and CD131 subunits in endothelial colony-forming cells (ECFCs). Representative entire immunoblots from individual samples showed expression of the 59-kDa EPOR subunit with the M20 EPOR antibody (A) and of the 130-kDa CD131 subunit with the K17 CD131 antibody (B) in both the plasma membrane (PM) and intracellular (IC) fractions. Densitometric analysis of signals indicated that expression levels of EPOR and CD131 in the PM fraction ([B] and [E], respectively) were not significantly modified after EPO priming (5 IU mL^{-1} , 24 h), whereas they were significantly increased in total cell lysates ([C] and [F], respectively). Data are corrected by β -actin densities (not shown), and expressed as percentage of ECFCs (means $\pm$ standard deviation, $n = 3$). * $P < 0.05$ vs. ECFCs. WB, western blotting.

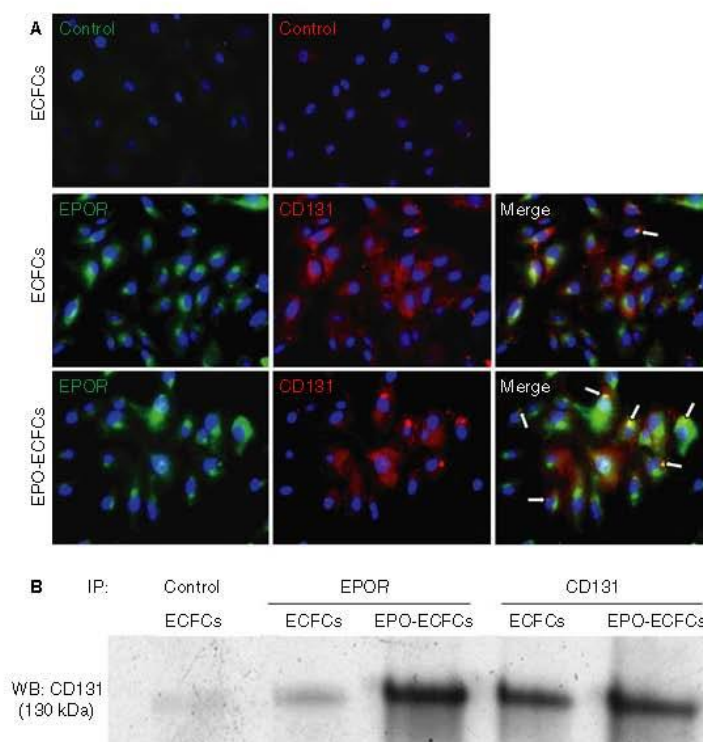


Fig. 2. Association of erythropoietin (EPO) receptor (EPOR) and CD131 subunits. Immunocytochemistry and coimmunoprecipitation assays indicated that EPOR and CD131 could be bound in endothelial colony-forming cells (ECFCs). (A) EPOR and CD131 were detected with a fluorescein-conjugated mouse monoclonal EPOR antibody (green) and a rabbit polyclonal CD131 antibody recognized by an Alexa Fluor-568-conjugated secondary anti-rabbit antibody (red). White arrows show colocalization of EPOR and CD131 in ECFCs and ECFCs incubated for 24 h with EPO (EPO-ECFCs). (B) Western blotting with the CD131 antibody showed that CD131 immunoprecipitated with EPOR antibody-bound G-Sepharose beads, suggesting that EPOR and CD131 could be covalently associated in ECFC and EPO-ECFC lysates. IP, immunoprecipitation; WB, western blotting.

EPO increases ECFC proliferation and survival *in vitro*

EPO concentration-dependently increased the number of fluorescent ECFCs in cultures. The effect was significantly higher 24, 40 and 48 h after priming with 5 IU mL^{-1} EPO than in control ECFCs (% of control ECFCs: $196\% \pm 7\%$ vs. $158\% \pm 7\%$, $227\% \pm 9\%$ vs. $179\% \pm 6\%$, and $243\% \pm 8\%$ vs. $197\% \pm 7\%$, respectively, $P < 0.01$) (Fig. 3A). EPO concentration-dependently increased BrdU incorporation, with a maximal response with 5 IU mL^{-1} (% of control ECFCs: $138\% \pm 14\%$, $P < 0.01$) (Fig. 3B). This effect was abolished in the presence of EPOR antibody (% of control ECFCs: $107\% \pm 12\%$, NS) (Fig. 3B).

After EPO priming, LDH release from H_2O_2 -exposed ECFCs was concentration-dependently reduced as compared with non-primed control cells, with a higher effect being observed with 5 IU mL^{-1} EPO (% of H_2O_2 control ECFCs: $68\% \pm 6\%$, $P < 0.001$) (Fig. 3C). A similar reduction was observed when cells were cultured in the presence of growth factor-containing medium and used as a positive control, before H_2O_2 challenge. The protective effect of 10 IU mL^{-1}

EPO was less marked, although significant (% of H_2O_2 control ECFCs: $77\% \pm 3\%$, $P < 0.01$), but at 1.5 IU mL^{-1} the impact of EPO was not significant. The reduction in H_2O_2 -induced LDH release by ECFCs was abolished when cells were primed with EPO in the presence of EPOR antibody (% of H_2O_2 control ECFCs: $81\% \pm 6\%$, NS) (Fig. 3C,D). Similar results were obtained with measurement of DNA fragmentation. Priming of ECFCs by EPO dose-dependently reduced H_2O_2 -induced DNA fragmentation (% of H_2O_2 control ECFCs: $71\% \pm 2\%$, $P < 0.001$, and $78\% \pm 2\%$, $P < 0.01$, respectively, with 5 and 10 IU mL^{-1}).

Finally, we tested ECFC survival *in vivo* when cells in Matrigel were subcutaneously transplanted into mice (Fig. 4A). No difference in total bioluminescence emission was observed between EPO-ECFCs and ECFCs before cell inclusion in Matrigel (data not shown). We observed a significant increase in total bioluminescence emission 3 and 6 days after implantation of EPO-ECFC-containing Matrigel as compared with ECFC-containing Matrigel (Fig. 4B) (% of day 0: day 3, 8.3% vs. 6.7% , and day 6, 1.04% vs. 0.7% , respectively, $n = 5$, $P < 0.05$). No statistical difference was

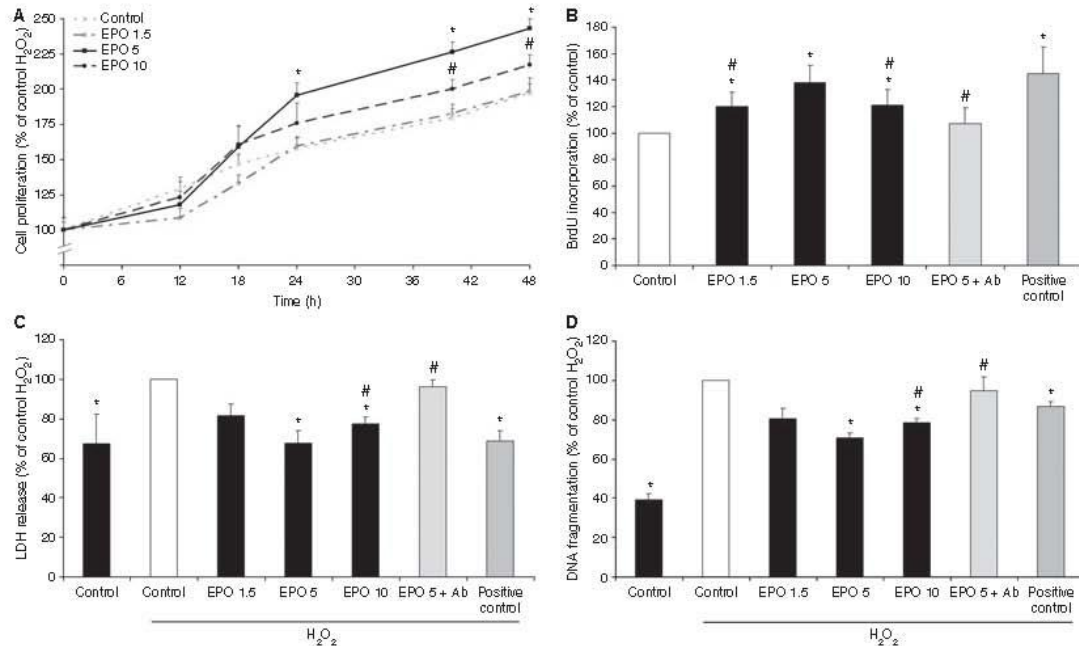


Fig. 3. Erythropoietin (EPO) increased endothelial colony-forming cell (ECFC) proliferation and survival after oxidative stress *in vitro*. EPO priming dose-dependently increased proliferation of ECFCs as measured by fluorescence counting (A) and bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation (B). Data are expressed as percentage of control (means $\pm$ standard deviation [SD], $n = 3-4$). H₂O₂-induced lactate dehydrogenase (LDH) release (C) and DNA fragmentation (D) of ECFCs in culture were reduced by EPO priming. Data are expressed as percentage of H₂O₂ control (means $\pm$ SD, $n = 4$). EPO effects were maximal with 5 IU mL⁻¹ EPO, and were significantly prevented in the presence of EPOR antibody (Ab). Growth factor-supplemented medium (EGM-2) was used as a positive control. EPO 1.5, ECFCs incubated with 1.5 IU mL⁻¹ EPO; EPO 5, ECFCs incubated with 5 IU mL⁻¹ EPO; EPO 10, ECFCs incubated with 10 IU mL⁻¹ EPO; EPO 5 + Ab, ECFCs incubated with 5 IU mL⁻¹ EPO and EPOR antibody. * $P < 0.05$ vs. control; # $P < 0.05$ vs. EPO 5.

observed on day 1 and day 8 (% of day 0: day 1, 643% vs. 625%, and day 8, 0.99% vs. 0.52%, $n = 5$, $P < 0.05$).

EPO increases ECFC angiogenic properties *in vitro*

EPO-ECFCs displayed higher migratory activity than control ECFCs, filling the gap created by the scratch within 8 h in wound healing assays (Fig. 5Aa-d). This effect was concentration-dependent, and the maximal effect was observed with 5 IU mL⁻¹ (% of control ECFCs: 148% $\pm$ 12%, $P < 0.01$) (Fig. 5B). Priming of ECFCs with EPO also enhanced SDF-1-induced ECFC migration measured in the Boyden chamber assay, as compared with control ECFCs (Fig. 5C; representative micrographs are shown in Fig. 5Ae,f). The maximal effect was observed with 5 IU mL⁻¹ EPO (% of control ECFCs: 158% $\pm$ 17%, $P < 0.05$), similar to what was found when cells were cultured in positive control medium. The EPO-induced increase in migratory features was prevented by EPOR antibody (% of control ECFCs: 112% $\pm$ 12%, NS, and 118% $\pm$ 26%, NS) (Fig. 5B,C).

Treatment with EPO concentration-dependently promoted tube formation by ECFCs, as attested by the significant increase in network length relative to controls (118% $\pm$ 3%, $P < 0.01$,

and 142% $\pm$ 12%, $P < 0.01$, for EPO used at 5 and 10 IU mL⁻¹, respectively) (Fig. 5D). The capillary network formed with 10 IU mL⁻¹ was similar to that observed with cells cultured in positive control medium. No significant increase was observed when ECFCs were treated with 10 IU mL⁻¹ EPO in the presence of EPOR antibody (Fig. 5D).

As shown in Fig. 5E, no significant change in VEGF levels could be detected in the medium of ECFCs treated with doses of EPO ranging from 1.5 to 10 IU mL⁻¹ (25.8 $\pm$ 2.6 pg mL⁻¹, 23.9 $\pm$ 1.9 pg mL⁻¹, and 24.5 $\pm$ 2.3 pg mL⁻¹, respectively for 1.5, 5 and 10 IU mL⁻¹) as compared with control ECFCs (25.8 $\pm$ 2.6 pg mL⁻¹). Consistently, EPO failed to increase VEGF mRNA levels in ECFCs (data not shown).

RNA interference targeting CD131 prevents the effects of EPO priming on ECFCs *in vitro*

CD131 protein remained strongly inhibited by the specific CD131 siRNA (siRNA_{CD131} ECFCs) for 72 h following transfection in ECFCs as compared with control siRNA (siRNA_c ECFCs) (% of control ECFCs: 33% $\pm$ 9%, $P < 0.01$) (Fig. 6).

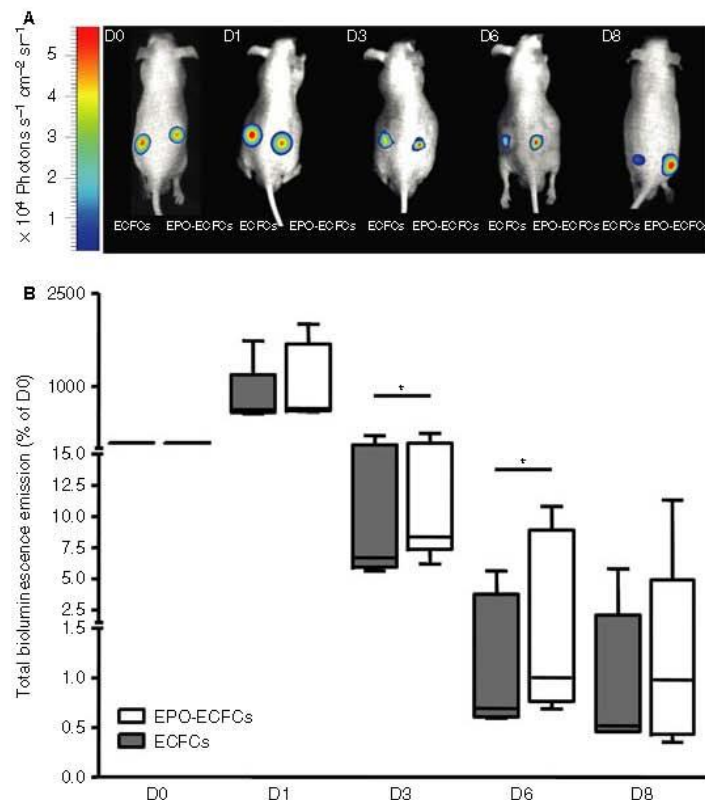


Fig. 4. Erythropoietin (EPO) enhanced endothelial colony-forming cell (ECFC) survival in the Matrigel plug assay. (A) Representative *in vivo* bioluminescence imaging of ECFCs in transplanted Matrigel. (B) Box plot with median (horizontal line), interquartile range (box) and minimum and maximum values (whiskers) represents bioluminescence emission at various time points. Values are quantified as photons $s^{-1} cm^{-2} sr^{-1}$, and are expressed as percentage of day (D)0. We observed a significant increase in bioluminescence emission in the ECFCs incubated for 24 h with EPO (EPO-ECFCs) (white box) on D3 and D6 as compared with the ECFC group (gray box) ($n = 5$ or $n = 6$ for each group). * $P < 0.05$ (Wilcoxon test: ECFCs vs. EPO-ECFCs).

As compared with $siRNA_{ECFCs}$, inhibition of CD131 expression by CD131 $siRNA$ significantly prevented the effect of $5 IU mL^{-1}$ EPO on ECFC proliferation ($siRNA_{CD131}$ EPO-ECFCs vs. $siRNA_{ECFCs}$ EPO-ECFCs), as demonstrated by measurement of BrdU incorporation (% of control ECFCs: $siRNA_{CD131}$ EPO-ECFCs, $105\% \pm 10\%$ vs. $siRNA_{ECFCs}$ EPO-ECFCs, $143\% \pm 22\%$, $P < 0.05$) (Fig. 7A) and on ECFC survival assessed by H_2O_2 -induced LDH release (% of H_2O_2 control ECFCs: $siRNA_{CD131}$ EPO-ECFCs, $94\% \pm 23\%$ vs. $siRNA_{ECFCs}$ EPO-ECFCs, $72\% \pm 17\%$, $P < 0.05$) (Fig. 7B) or DNA fragmentation (% H_2O_2 of control ECFCs: $siRNA_{CD131}$ EPO-ECFCs, $95\% \pm 22\%$ vs. $siRNA_{ECFCs}$ EPO-ECFCs, $74\% \pm 16\%$, $P < 0.05$) (Fig. 7C).

Similarly, silencing of CD131 significantly abrogated: (i) the effect of $5 IU mL^{-1}$ EPO on ECFC migration measured in the wound healing assay (% of control ECFCs: $siRNA_{CD131}$ EPO-ECFCs, $118\% \pm 34\%$ vs. $siRNA_{ECFCs}$ EPO-ECFCs, $171\% \pm 45\%$, $P < 0.05$) (Fig. 7D) and in

the modified Boyden chamber assay (% of control ECFCs: $siRNA_{CD131}$ EPO-ECFCs, $124\% \pm 12\%$ vs. $siRNA_{ECFCs}$ EPO-ECFCs, $154\% \pm 28\%$, $P < 0.05$) (Fig. 7E); and (ii) the effect of $5 IU mL^{-1}$ EPO (% of control ECFCs: $siRNA_{CD131}$ EPO-ECFCs, $120\% \pm 18\%$ vs. $siRNA_{ECFCs}$ EPO-ECFCs, $139\% \pm 39\%$, $P < 0.05$) and $10 IU mL^{-1}$ EPO (% of control ECFCs: $siRNA_{CD131}$ EPO-ECFCs, $112\% \pm 27\%$ vs. $siRNA_{ECFCs}$ EPO-ECFCs, $175\% \pm 46\%$, $P < 0.05$) on cell differentiation into vascular tubes in Matrigel (Fig. 7F).

EPO priming enhances ECFC angiogenic potential in vivo in a murine model of hindlimb ischemia, and CD131 siRNA silencing impairs EPO induced angiogenesis

On day 14 postsurgery, the clinical necrosis score was significantly lower in the $siRNA_{ECFCs}$ EPO-ECFC group than in the PBS group (respectively, 0.55 ± 0.12 vs. 1.9 ± 0.06 , $P < 0.05$),

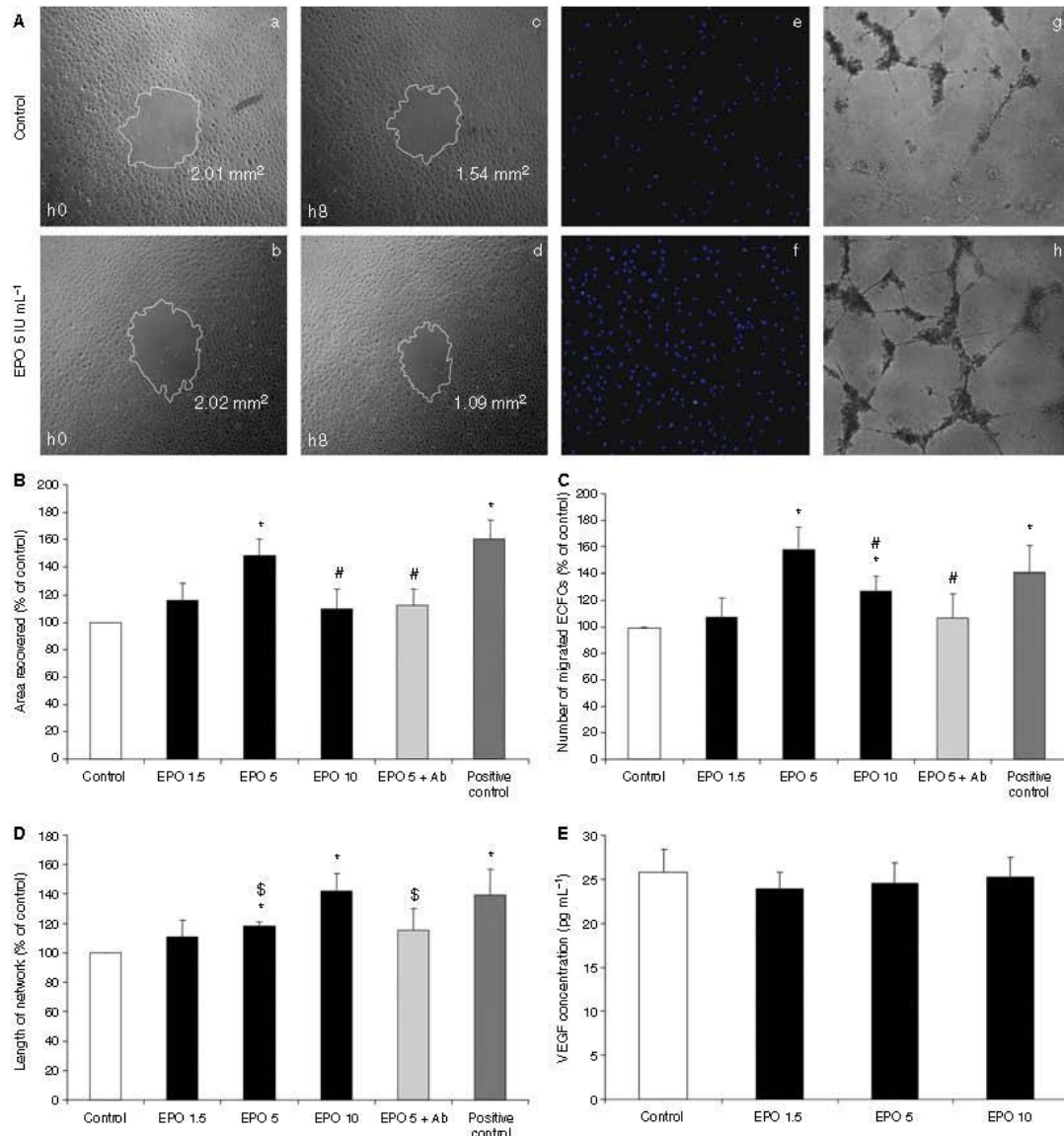


Fig. 5. Erythropoietin (EPO) priming increased endothelial colony-forming cell (ECFC) angiogenic properties *in vitro*. EPO priming increased wound recovery as compared with control ECFCs (control, t_0 h [Aa] and t_8 h [Ac], EPO, t_0 h [Ab] and t_8 h [Ad]). EPO priming increased migration in transwell chamber ([Ae] control; [Af] EPO) and improved tube formation in Matrigel ([Ag] control; [Ah] EPO). EPO effects were significant and maximal with 5 IU mL⁻¹ EPO for wound healing (B) and migration assays (C) and with 10 IU mL⁻¹ EPO for tube formation in Matrigel (D). These effects were significantly reduced in the presence of EPO receptor antibody (Ab) (B–D). Data are expressed as percentage of control (means $\pm$ SD, $n = 4$ –5). No significant modification of the vascular endothelial growth factor (VEGF) concentration in the culture medium occurred after EPO priming of ECFCs (E). Growth factor-supplemented medium (EGM-2) was used as a positive control. EPO 1.5, ECFCs incubated with 1.5 IU mL⁻¹ EPO; EPO 5, ECFCs incubated with 5 IU mL⁻¹ EPO; EPO 10, ECFCs incubated with 10 IU mL⁻¹ EPO; EPO 5 + Ab, ECFCs incubated with 5 IU mL⁻¹ EPO and EPOR antibody. * $P < 0.05$ vs. control; $P < 0.05$ vs. EPO 5; $\$P < 0.05$ vs. EPO 10.

whereas the clinical necrosis score was not significantly different between the siRNA_{ec} ECFC and PBS groups (respectively, 1.4 ± 0.18 vs. 1.9 ± 0.06 , NS) (Fig. 8A). The clinical

necrosis score was significantly higher in the siRNA_{CD133} EPO-ECFC group than in the siRNA_{ec} EPO-ECFC group (1.00 ± 0.18 vs. 0.55 ± 0.12 , $P < 0.05$) (Fig. 8A).

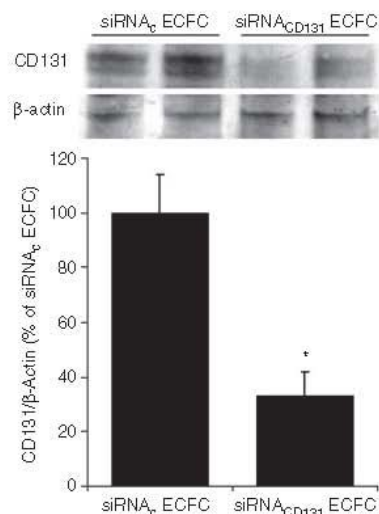


Fig. 6. Transfection of CD131 small interfering RNA (siRNA) in endothelial colony-forming cells (ECFCs) significantly reduced CD131 expression. Western blotting performed 72 h after transfection of siRNA in ECFCs revealed that expression of CD131 was significantly decreased in ECFCs transfected with CD131 siRNA (siRNA_{CD131} ECFCs) as compared with ECFCs transfected with control siRNA (siRNA_c ECFCs). The densitometric data are corrected by β -actin levels and expressed as percentage of siRNA_c ECFCs (means $\pm$ standard deviation, $n = 4$). * $P < 0.05$ vs. siRNA_c ECFCs. A representative immunoblot analysis is shown in the upper panel.

Recovery of blood flow in the ischemic hindlimb was significantly increased in the siRNA_c ECFC, siRNA_{CD131} ECFC, siRNA_c EPO-ECFC and siRNA_{CD131} EPO-ECFC groups as compared with the PBS group from day 3 to day 28 ($P < 0.05$) (Fig. 8B). It was also significantly higher the siRNA_c EPO-ECFC group than in the siRNA_c ECFC group on day 3 ($58.0\% \pm 6\%$ vs. $42.5\% \pm 6.2\%$, $P < 0.05$), day 7 ($66.8\% \pm 7\%$ vs. $50.8\% \pm 9\%$, $P < 0.05$), and day 14 ($84.8\% \pm 20\%$ vs. $53.4\% \pm 17\%$, $P < 0.05$) (Fig. 8B). Moreover, recovery of blood flow was significantly higher in the siRNA_c EPO-ECFC group on day 3 than in the siRNA_{CD131} ECFC group ($43.2\% \pm 9\%$, $P < 0.05$) and siRNA_{CD131} EPO-ECFC group ($41.5\% \pm 6\%$, $P < 0.05$), and was higher on day 14 than in the siRNA_{CD131} ECFC group ($62.0\% \pm 11\%$, $P < 0.05$) and the siRNA_{CD131} EPO-ECFC group ($61.0\% \pm 20\%$, $P < 0.05$) (Fig. 8B). However, on day 28, there were no statistically significant differences in recovery of blood flow between the siRNA_c ECFC, siRNA_c EPO-ECFC, siRNA_{CD131} ECFC and siRNA_{CD131} EPO-ECFC groups ($89.0\% \pm 22\%$, $102\% \pm 16\%$, $79.0\% \pm 20\%$, and $90.5\% \pm 18\%$, respectively).

Fourteen days postsurgery, immunochemical examination of muscle sections from mice treated with siRNA_c ECFCs showed a higher density of capillaries than in mice treated with PBS (% of non-ischemic limb: $0.95\% \pm 0.17\%$ vs. $0.69\% \pm 0.04\%$, $P < 0.05$) (Fig. 8C). Moreover, the increase

in capillary density was significantly higher in the siRNA_c EPO-ECFC group than in the siRNA_c ECFC group (% of non-ischemic limb: $1.25\% \pm 0.08\%$ vs. $0.95\% \pm 0.17\%$, $P < 0.05$) (Fig. 8C). The effect was abrogated in the siRNA_{CD131} EPO-ECFC group as compared with the siRNA_c EPO-ECFC group (0.96 ± 0.08 , $P < 0.05$) (Fig. 8C).

Clinical necrosis score, blood flow recovery and capillary density in the siRNA_c ECFC group were not significantly different from those in the control ECFC group (data not shown).

EPO induced upregulation of the phosphoinositide 3 kinase (PI3K)-Akt pathway required the CD131 subunit

Western blot experiments indicated that the Ser473 pAkt/Akt ratio increased after EPO priming of ECFCs in a concentration-dependent manner. A significant effect was observed at 5 and 10 IU mL⁻¹ EPO as compared with control ECFCs (% of control ECFCs: $230\% \pm 58\%$ and $395\% \pm 78\%$ vs. $100\% \pm 20.4\%$, respectively, $P < 0.05$) (Fig. 9A). The increase in the Ser473 pAkt/Akt ratio was reduced after 5 IU mL⁻¹ EPO priming of siRNA_{CD131} ECFCs as compared with siRNA_c ECFCs (% of siRNA_c ECFCs: $96\% \pm 59\%$ vs. $319\% \pm 49\%$, respectively, $P < 0.01$) (Fig. 9B). The increase in the Ser473 pAkt/Akt ratio was also reduced after 5 IU mL⁻¹ EPO priming of ECFCs in the presence of LY294002, a PI3K inhibitor, as compared with EPO-ECFCs (% of ECFCs: $132\% \pm 18\%$ vs. $263\% \pm 35\%$, respectively, $P < 0.01$) (Fig. 9C). Moreover, EPO priming of ECFCs in the presence of LY294002 before transplantation in ischemic mice prevented the EPO-induced improvement in hindlimb reperfusion 14 days after surgery ($58\% \pm 3\%$ vs. $72\% \pm 2\%$, respectively, $P < 0.01$) (Fig. 9D).

Discussion

To our knowledge, this is the first study documenting the role of EPO as a priming agent for ECFC-based cell therapy. Indeed, we demonstrated that EPO enhanced ECFC proliferation, stress-induced survival and angiogenic properties *in vitro*. In addition, priming ECFCs with EPO before transplantation in a mouse model of hindlimb ischemia increased the improvement in revascularization. Interestingly, we found that siRNA CD131 silencing abolished the positive effects of EPO, indicating that the CD131 subunit is required.

The impact of EPO on ECFCs, the non-hematopoietic-derived subpopulation of EPCs, remains unknown, despite their increasingly recognized specific and major contribution to adult vasculogenesis [24]. Our *in vitro* experiments indicated that EPO enhanced proliferation of ECFCs. The effect was maximal for EPO at a concentration of 5 IU mL⁻¹, and it decreased at higher concentrations. A similar bell-shaped concentration response curve has been observed for the proliferative effect of EPO on circulating myeloid EPCs from healthy subjects [25] and on cultured mature endothelial cells [15]. EPO also enhanced ECFC migration *in vitro*, as shown by the increased ability of EPO-stimulated ECFCs to heal a

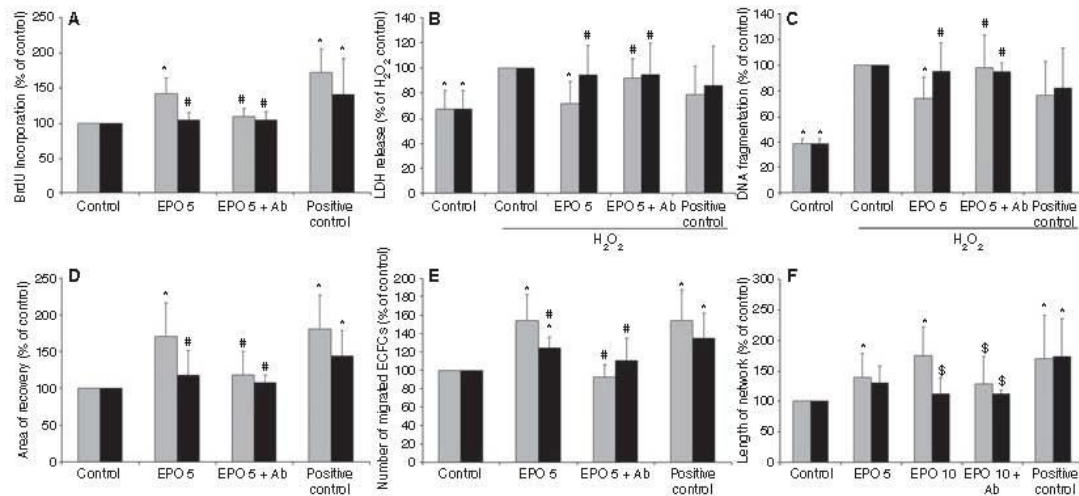


Fig. 7. RNA interference targeting CD131 reversed the proliferative, antiapoptotic and angiogenic effects of erythropoietin (EPO) priming on endothelial colony-forming cells (ECFCs) *in vitro*. Enhancement of bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation after EPO priming of ECFCs with control small interfering RNA (siRNA) (siRNA_{control} ECFCs) (shaded bars) was prevented in ECFCs with siRNA silencing CD131 (siRNA_{CD131} ECFCs) (black bars) (A). Data are expressed as percentage of control (means $\pm$ SD, $n = 4$). EPO protective effects against H₂O₂ in siRNA_{control} ECFC (shaded bars) were also abolished in siRNA_{CD131} ECFCs (black bars) (B and C). Data are expressed as percentage of H₂O₂ control (means $\pm$ standard deviation [SD], $n = 4$). Enhancement of area recovery (D), transwell migration (E) and tube formation in Matrigel (F) after EPO priming of siRNA_{control} ECFCs (shaded bars) was also prevented in siRNA_{CD131} ECFCs (black bars). Growth factor-supplemented medium (EGM-2) was used as a positive control. Data are expressed as percentage of control (means $\pm$ SD, $n = 4-5$). EPO 1.5, ECFCs incubated with 1.5 IU mL⁻¹ EPO; EPO 5, ECFCs incubated with 5 IU mL⁻¹ EPO; EPO 10, ECFCs incubated with 10 IU mL⁻¹ EPO; EPO 5 + Ab, ECFCs incubated with 5 IU mL⁻¹ EPO and EPO antibody. * $P < 0.05$ vs. control; # $P < 0.05$ vs. EPO 5; \$ $P < 0.05$ vs. EPO 10. Ab, antibody; LDH, lactate dehydrogenase.

wound and to migrate along an SDF-1 gradient. Recruitment of ECFCs involving SDF-1 and CXCR-4 interaction has been shown to be critical for the angiogenic activity of EPCs in ischemic models [9,26,27]. In addition, Brunner *et al.* [27] reported enhanced SDF-1-mediated homing of BM stromal cells into ischemic myocardium in the presence of EPO. Thus, our results suggest that EPO could increase SDF-1-mediated recruitment of ECFCs. We also showed that EPO stimulated ECFC differentiation into vascular tubes in Matrigel. This effect concentration-dependently increased up to 10 IU mL⁻¹ EPO. A similar linear concentration response curve has been described for cocultivated peripheral myeloid EPCs and HUVECs treated with recombinant human EPO [28]. Moreover, enhanced ECFC functions were observed *in vitro* after EPO removal, suggesting that this cytokine has a sustained effect on ECFCs that may be relevant as an 'add-on' strategy in cell-based therapy. One of the current challenges is to identify strategies for overcoming the limitations of EPC-based therapeutic angiogenesis. Indeed, impairment of EPC activity in various clinical conditions, such as diabetes or coronary artery disease, may result in poor treatment efficacy [29,30]. Such alterations are mainly documented for the myeloid EPC population. However, regarding ECFCs, difficulties arise from the limited supply of *ex vivo* expanded cells from peripheral blood, variability in neovascularization-promoting capacity, or unfavorable changes during expansion

process. Therefore, one possibility is to reduce the required number of efficient cells by using ECFCs that have been stimulated before infusion.

In that context, we reported that EPO-primed ECFCs were more potent for therapeutic revascularization in a model of hindlimb ischemia. Blood flow recovery measured by laser Doppler was significantly increased in ischemic hindlimbs from day 3 to day 14 after femoral artery ligation, and was associated with an increase in capillary density in ischemic tissues on day 14. This effect may have prevented hindlimb necrosis, as we observed a reduced clinical necrosis score in EPO-ECFC-transplanted mice. However, on day 28, statistical multiple comparisons of blood flow recovery ratios showed that there was no longer a significant difference between EPO-ECFC-transplanted mice and ECFC-transplanted mice. It should be noted that, on day 28, ECFC transplantation permitted the recovery of ~90% of the blood flow ratio as compared with 50% in PBS-treated mice. Similar results have been previously obtained with pharmacologic treatment [31]. Therefore, it could be suggested that this maximal effect on blood flow recovery was obtained earlier when ECFCs were primed with EPO. Nevertheless, the main therapeutic objective in critical limb ischemia is to obtain, as soon as possible, tissue reperfusion to allow limb salvage, limit infectious risk, and maintain mobility [32]. The long-term effect is therefore of less importance.

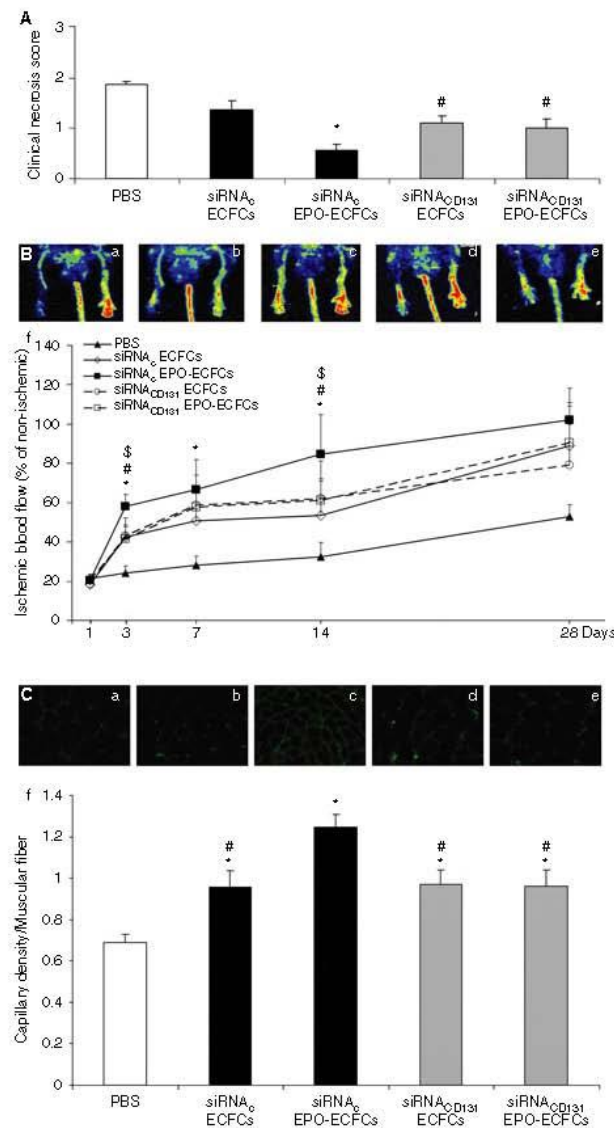


Fig. 8. Erythropoietin (EPO) priming increased endothelial colony-forming cell (ECFC) angiogenic properties *in vivo*. The clinical necrosis score at day 14 was lower in the siRNA₀ EPO-ECFC group than in the siRNA₀ ECFC group and phosphate-buffered saline (PBS) group (A). Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD) ($n = 5-7$ mice for each condition); * $P < 0.05$ vs. PBS; # $P < 0.05$ vs. 5 IU mL⁻¹ EPO. Representative hindlimb blood flow measured by laser Doppler perfusion imaging (LDPI) at day 14 in the PBS (Ba), siRNA₀ ECFC (Bb), siRNA₀ EPO-ECFC (Bc), siRNA_{CD131} ECFC (Bd) and siRNA_{CD131} EPO-ECFC (Be) groups. Hindlimb reperfusion expressed as ischemic/non-ischemic hindlimb perfusion ratio (Bf) was significantly higher in the siRNA₀ EPO-ECFC group than in the siRNA₀ ECFC (days 3, 7, and 14), siRNA_{CD131} ECFC (days 3 and 14) and siRNA_{CD131} EPO-ECFC (days 3 and 14) groups. Data are expressed as mean $\pm$ SD ($n = 5-7$ mice for each condition). Comparisons of LDPI values among the five groups were made by one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls multiple comparison procedure; * $P < 0.05$ for siRNA₀ EPO-ECFCs vs. siRNA₀ ECFCs; # $P < 0.05$ for siRNA₀ EPO-ECFCs vs. siRNA_{CD131} ECFCs; \$ $P < 0.05$ for siRNA₀ EPO-ECFCs vs. siRNA_{CD131} EPO-ECFCs. Representative muscle vessel immunostaining with antibody against PECAM-1 of the PBS (Ca), siRNA₀ ECFC (Cb), siRNA₀ EPO-ECFC (Cc), siRNA_{CD131} ECFC (Cd) and siRNA_{CD131} EPO-ECFC (Ce) groups. Quantification showed that ischemic/non-ischemic capillary density was significantly higher in the siRNA₀ EPO-ECFC group than in the PBS, siRNA₀ ECFC and siRNA_{CD131} ECFC groups (Cf). Data are expressed as mean $\pm$ SD ($n = 5-7$ mice for each condition); * $P < 0.05$ vs. PBS; # $P < 0.05$ vs. siRNA₀ EPO-ECFCs. EPO-ECFCs, ECFCs incubated for 24 h with EPO; siRNA₀ ECFCs, ECFCs with control siRNA; siRNA_{CD131} ECFCs, ECFCs with siRNA silencing CD131.

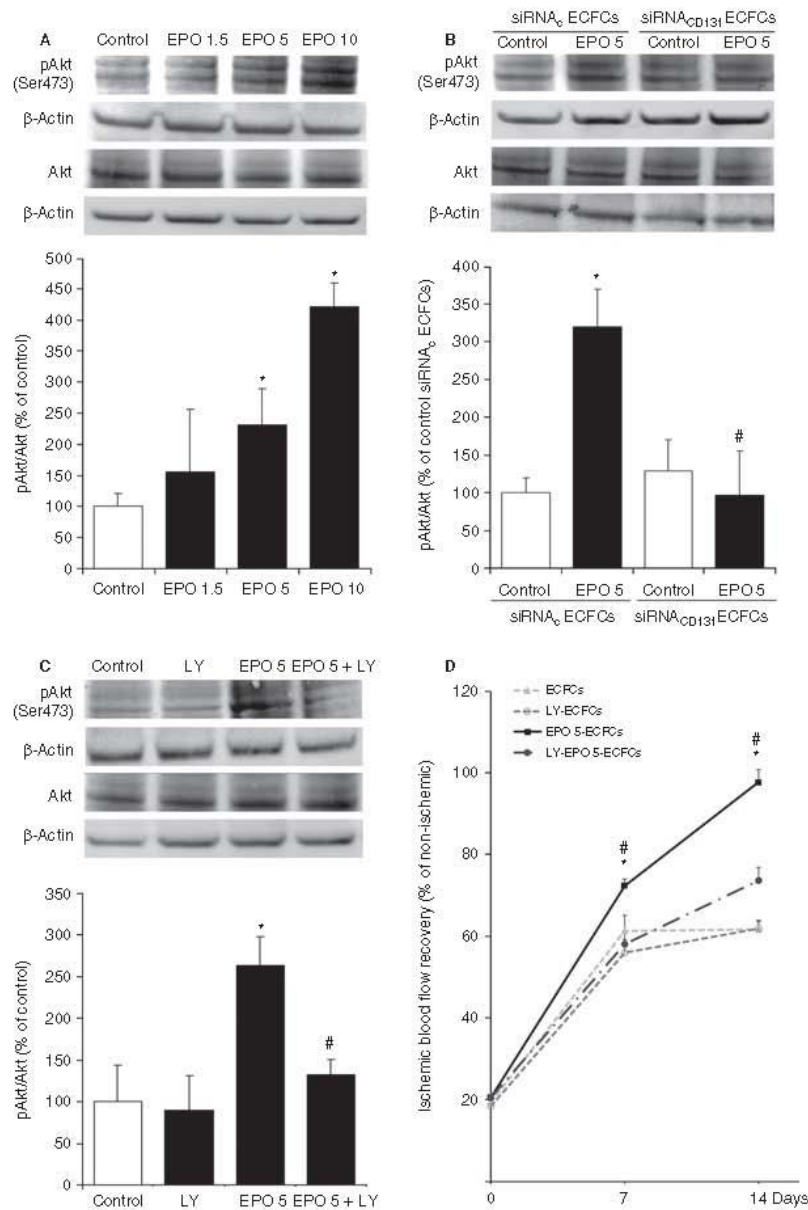


Fig. 9. Erythropoietin (EPO)-induced phosphorylation of Akt is dependent on phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and requires CD131. Immunoblots from individual samples showed 60-kDa pAkt, 60-kDa Akt and 42-kDa β -actin bands with a rabbit polyclonal antibody against Akt phosphorylated on Ser473, a mouse mAb against Akt, and a mouse mAb against β -actin (top of [A], [B], and [C]). Densitometric analysis of signals indicated that the pAkt/Akt ratio was concentration-dependently increased in ECFCs primed with 5 IU mL⁻¹ EPO (EPO 5-ECFCs) (A, bottom) and that the 5 IU mL⁻¹ EPO-induced increase in the pAkt/Akt ratio was abolished in ECFCs transfected with small interfering RNA (siRNA)_{CD131} (siRNA_{CD131} ECFCs) (B, bottom). Moreover, EPO priming of ECFCs with LY294002 (LY), a PI3K inhibitor, prevented the EPO-induced increase in the pAkt/Akt ratio (C, bottom) and the improvement in 14-day postischemic hindlimb perfusion recovery after EPO-ECFC transplantation (D). Data are expressed as percentage of control (means $\pm$ standard deviation, $n = 3$). EPO 1.5, ECFCs incubated with 1.5 IU mL⁻¹ EPO; EPO 5, ECFCs incubated with 5 IU mL⁻¹ EPO; EPO 10, ECFCs incubated with 10 IU mL⁻¹ EPO; EPO 5 + Ab, ECFCs incubated with 5 IU mL⁻¹ EPO and EPOR antibody. * $P < 0.05$ vs. control (A and C) or siRNA_{ECFCs} Control-ECFCs (B) or ECFCs (D). $P < 0.05$ vs. EPO 5 (A and C) or siRNA_{ECFCs} EPO 5-ECFCs (B) or EPO 5-ECFCs (D).

Priming of progenitor cells with p38 inhibitors or endothelial nitric oxide synthase enhancers has been used to augment cell homing, integration and revascularization after induction of ischemia in various tissues [33]. Similar strategies using EPCs pretreated with either activators of the EphB4-ephrin-B2 system [10] or with SDF-1 [11] were successfully applied in hindlimb ischemia mouse models, but no one used the EPO angiogenic properties to prime ECFCs before transplantation in ischemic models. EPO was shown to increase the efficiency of therapeutic angiogenesis by BM stromal cells when coinjected in a model of rat hindlimb ischemia [34] and in a model of myocardial infarction [17]. However, a recent demonstration that exogenous EPO administration induced excessive smooth muscle cell-rich lesions in a carotid artery injury model calls for caution when EPO is used in clinical scenarios associated with high atherosclerosis risk [35]. ECFC priming with EPO *ex vivo*, rather than coinjection, may be an interesting way to circumvent the unwanted and potential damaging effect of EPO *in vivo*.

We report here, for the first time, that ECFCs expressed EPOR and that EPO increased this expression, which agrees with the findings of Beleslin-Cokic *et al.* [36], showing an increase in EPOR mRNA after EPO treatment of endothelial cells. However, western blots performed after isolation of plasma membrane fractions from cell lysates revealed that the increase in EPOR expression was not statistically significant in plasma membrane fractions, suggesting an EPO-induced increase of EPOR synthesis instead of EPOR homing to the membrane. Further studies should evaluate EPOR expression in the ECFC plasma membrane after longer periods of EPO priming. The specificity of the available EPOR antibodies was questioned by Elliott *et al.* [37], who concluded that the M20 antibody (Santa Cruz) was suitable for detection of the 59-kDa EPOR by immunoblotting. We observed that a 59-kDa protein was detected with the use of the M20 antibody in ECFC lysates and in UT-7 cell lysates, which are known to express EPOR [38]. We confirmed the presence of this protein, which was identified as the EPOR subunit, by fluorescence microscopy, with a second different anti-EPOR mouse mAb for specific immunostaining. In this study, we also observed that ECFCs expressed the CD131 subunit and that EPO increased this CD131 expression. Upregulation of EPOR and CD131 may thus potentiate the effects *in vivo* of endogenous EPO on transplanted ECFCs. Moreover, it has been reported that CD131 could bind the EPOR subunit and form a heterotrimeric receptor [39]. Such an association may also exist in ECFCs, as we showed that EPOR coimmunoprecipitated and colocalized. It seems that, as when CD131 is shared by IL-3, IL-5 or GM-CSF receptors, according to the presence of the specific ligand [40], the association of CD131 with EPOR may be potentiated by EPO. Additionally, we highlighted a central role of the CD131 subunit in EPO priming, as CD131 siRNA silencing abolished all EPO effects *in vitro* and *in vivo*. Brines and Cerami [41] suggested that EPO might have CD131-dependent tissue-protective effects in the injured nervous system and heart. CD131-dependent EPO effects have also

been reported by Imamura *et al.* [42–44], who showed an increase in peritubular capillary endothelial cell number in a kidney ischemia/reperfusion injury model by using a carbamylated EPO (CEPO) as a synthetic variant of EPO that binds specifically to the CD131 subunit. In our work, we also observed that EPO effects were prevented *in vitro* by the use of EPOR antibody, suggesting that they required the availability of both CD131 and EPOR subunits. The mechanism by which EPO and its interaction with EPOR subunits potentiate ECFC activity *in vivo* remains unclear. Besides the observation that ECFCs promote angiogenic behavior *in vitro*, we point out, for the first time, the capacity of EPO priming to strengthen ECFC resistance to oxidative stress *in vitro*. This antiapoptotic effect is in line with previous vascular and neuronal system reports involving several transduction pathways, including the PI3K–Akt and extracellular signal-related kinase 1/2 pathways and the nuclear trafficking of FOXO3a, downstream of the activation of the EPO heterotrimeric receptor [14]. Here, we showed that EPO priming of ECFCs concentration-dependently increased the phosphorylation of Akt, and that this effect was blocked in the presence of LY29400, which is a PI3K inhibitor. Interestingly, we observed that CD131 silencing reversed the pAkt/Akt ratio, thus suggesting that the EPO-induced Ser473 phosphorylation of Akt required the CD131 subunit. Previous studies demonstrated that the PI3K–Akt pathway was markedly upregulated in CEPO-treated kidneys, thus preventing the ischemia/reperfusion injury-induced tubular epithelial apoptosis [42,45]. These effects observed with the use of CEPO suggest that the CD131-mediated EPO-induced activation of the PI3K–Akt pathway may upregulate antiapoptotic genes, such as those of the Bcl-2 family [46].

In our work, the *in vitro* resistance to oxidative stress afforded by EPO was associated with an enhancement of cell survival *in vivo* in the nude mouse bearing ECFCs seeded in Matrigel. Accordingly, it could be suggested that this increase in ECFC survival induced by EPO may represent a major way to improve the efficiency of cell therapy in ischemic diseases [47] that may involve the PI3K–Akt pathway, as we showed a loss of EPO benefits on perfusion recovery when priming ECFCs in the presence of LY294002.

Finally, we observed that VEGF mRNA expression (RT-PCR, data not shown) and protein secretion were not modified upon EPO exposure, indicating that promotion of ECFC activity did not involve VEGF upregulation. VEGF-independent effects of EPO have been previously reported, such as its proliferation-promoting effect on tumoral endothelial cells [48] *in vitro* or its direct effects on endothelial sprouting [49]. Interestingly, Sautina *et al.* [50] demonstrated that EPO-induced production of nitric oxide was independent of VEGF, whereas it involved an interaction between VEGFR-2 and CD131. By contrast, *in vivo*, stimulation of ischemia-induced neovascularization by EPO is commonly thought to occur through upregulation of the VEGF–VEGF receptor system [51], and several findings argue in favor of EPO-induced stimulation of VEGF secretion by various tissues [52,53]. It may be that the involvement of VEGF in EPO-induced

angiogenesis is cell-dependent, as Westenbrink *et al.* [49] showed, in rats with heart failure, that EPO fosters VEGF expression predominantly in cardiomyocytes but not in endothelial cells, which, in turn, stimulates myocardial endothelial proliferation and incorporation of EPCs into vessels.

In conclusion, these results are the first evidence that EPO priming of ECFCs may provide an effective, safe and innovative therapeutic strategy to improve overall ECFC graft efficiency in ischemic diseases. This effect requires the CD131 subunit and EPOR, and results from an increase in ECFC survival and improved angiogenic properties of ECFCs.

Addendum

Y. Bennis, G. Sarlon-bartoli, B. Guillet, L. Lucas, L. Pellegrini, L. Velly, M. Blot-Chabaud, F. Dignat-Georges, F. Sabatier, P. Pisano: wrote the paper; D. G. Françoise and P. Pascale: revised the intellectual content and approved the version to be published.

Acknowledgements

We thank K. Fallague, P. Stellmann and S. Pons for technical assistance. We thank P. Nguyen for kindly providing UT-7 cells. This work was supported by research funding from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

Disclosure of Conflict of Interests

The authors state that they have no conflict of interest.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Data S1. Supplemental materials.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

References

- Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzner NR, Bakal CW, Creager MA, Halperin JL, Hiratzka LF, Murphy WR, Olin JW, Puschett JB, Rosenfield KA, Sacks D, Stanley JC, Taylor LM Jr, White CJ, White J, White RA, Antman EM, Smith SC Jr, Adams CD, *et al.* ACC/AHA 2005 guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic). *J Am Coll Cardiol* 2006; **47**: 1239–312.
- Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med* 2004; **8**: 498–508.
- Burt RK, Testori A, Oyama Y, Rodriguez HE, Yaung K, Villa M, Bucha JM, Milanetti F, Sheehan J, Rajamannan N, Pearce WH. Autologous peripheral blood CD133+ cell implantation for limb salvage in patients with critical limb ischemia. *Bone Marrow Transplant* 2010; **45**: 111–16.
- Lawall H, Bramlage P, Amann B. Treatment of peripheral arterial disease using stem and progenitor cell therapy. *J Vasc Surg* 2011; **53**: 445–53.
- Ingram DA, Caplice NM, Yoder MC. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood* 2005; **106**: 1525–31.
- Pearson JD. Endothelial progenitor cells – an evolving story. *Microvasc Res* 2010; **79**: 162–8.
- Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, Oh BH, Lee MM, Park YB. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; **24**: 288–93.
- Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, Pollok K, Ferkowicz MJ, Gilley D, Yoder MC. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 2004; **104**: 2752–60.
- Oh BJ, Kim DK, Kim BJ, Yoon KS, Park SG, Park KS, Lee MS, Kim KW, Kim JH. Differences in donor CXCR4 expression levels are correlated with functional capacity and therapeutic outcome of angiogenic treatment with endothelial colony forming cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; **398**: 627–33.
- Foubert P, Silvestre JS, Souttou B, Barateau V, Martin C, Ebrahimi TG, Leré-Déan C, Contreras JO, Sulpice E, Levy BI, Plouët J, Tobelem G, Le Ricousse-Roussanne S. PSGL-1-mediated activation of EphB4 increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells. *J Clin Invest* 2007; **117**: 1527–37.
- Zemani F, Silvestre JS, Fauvel-Lafeve F, Bruel A, Vilar J, Bieche I, Laurendeau I, Galy-Fauroux I, Fischer AM, Boisson-Vidal C. Ex vivo priming of endothelial progenitor cells with SDF-1 before transplantation could increase their proangiogenic potential. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; **28**: 644–50.
- Maiese K, Chong ZZ, Li F, Shang YC. Erythropoietin: elucidating new cellular targets that broaden therapeutic strategies. *Prog Neurobiol* 2008; **85**: 194–213.
- Paschos N, Lykissas MG, Beris AE. The role of erythropoietin as an inhibitor of tissue ischemia. *Int J Biol Sci* 2008; **4**: 161–8.
- Velly L, Pellegrini L, Guillet B, Bruder N, Pisano P. Erythropoietin 2nd cerebral protection after acute injuries: a double-edged sword? *Pharmacol Ther* 2010; **128**: 445–59.
- Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dell'Era P, Nico B, Roncali L, Dammacco F. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization *in vivo*. *Blood* 1999; **93**: 2627–36.
- Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 2003; **102**: 1340–6.
- Zhang D, Zhang F, Zhang Y, Gao X, Li C, Ma W, Cao K. Erythropoietin enhances the angiogenic potency of autologous bone marrow stromal cells in a rat model of myocardial infarction. *Cardiology* 2007; **108**: 228–36.
- Oda M, Toba K, Ozawa T, Kato K, Yanagawa T, Ikarashi N, Takayama T, Suzuki T, Hanawa H, Fuse I, Nakata K, Narita M, Takahashi M, Aizawa Y. Establishment of culturing system for ex-vivo expansion of angiogenic immature erythroid cells, and its application for treatment of patients with chronic severe lower limb ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 2010; **49**: 347–53.
- Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, Sfacteria A, Ghezzi P, Fratelli M, Latini R, Xie QW, Smart J, Su-Rick CJ, Pobre E, Diaz D, Gomez D, Hand C, Coleman T, Cerami A. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 14907–12.
- Fiordaliso F, Chimenti S, Staszewsky L, Bai A, Carlo E, Cuccovillo I, Doni M, Mengozzi M, Tonelli R, Ghezzi P, Coleman T, Brines M,

- Cerami A, Latini R. A nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 2046–51.
- 21 Delorme B, Basire A, Gentile C, Sabatier F, Monsonis F, Desouches C, Blot-Chabaud M, Uzan G, Sampol J, Dignat-George F. Presence of endothelial progenitor cells, distinct from mature endothelial cells, within human CD146+ blood cells. *Thromb Haemost* 2005; **94**: 1270–9.
 - 22 Cuccini W, Poitevin S, Poitevin G, Dignat-George F, Cornillet-Lefebvre P, Sabatier F, Nguyen P. Tissue factor up-regulation in proinflammatory conditions confers thrombin generation capacity to endothelial colony-forming cells without influencing non-coagulant properties *in vitro*. *J Thromb Haemost* 2010; **8**: 2042–52.
 - 23 Shireman P, Quinones M. Differential necrosis despite similar perfusion in mouse strains after ischemia. *J Surg Res* 2005; **129**: 242–50.
 - 24 Pearson JD. Endothelial progenitor cells – hype or hope? *J Thromb Haemost* 2009; **7**: 255–62.
 - 25 George J, Goldstein E, Abashidze A, Wexler D, Hamed S, Shmilovich H, Deutsch V, Miller H, Keren G, Roth A. Erythropoietin promotes endothelial progenitor cell proliferative and adhesive properties in a PI 3-kinase-dependent manner. *Cardiovasc Res* 2005; **68**: 299–306.
 - 26 Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, Bosch-Marce M, Masuda H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T. Stromal cell-derived factor-1 effects on *ex vivo* expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 2003; **107**: 1322–8.
 - 27 Brunner S, Winograd J, Huber BC, Zaruba MM, Fischer R, David R, Assmann G, Herbach N, Wanke R, Mueller-Hoecker J, Franz WM. Erythropoietin administration after myocardial infarction in mice attenuates ischemic cardiomyopathy associated with enhanced homing of bone marrow-derived progenitor cells via the CXCR-4/SDF-1 axis. *FASEB J* 2009; **23**: 351–61.
 - 28 Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, Landry AL, Hertel B, Duckert T, Boehm SM, Menne J, Haller H, Fliser D. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood* 2004; **103**: 921–6.
 - 29 Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001; **89**: E1–7.
 - 30 Giannotti G, Doerries C, Mocharha PS, Mueller MF, Bahlmann FH, Horvath T, Jiang H, Sorrentino SA, Steenken N, Manes C, Marzilli M, Rudolph KL, Lüscher TF, Drexler H, Landmesser U. Impaired endothelial repair capacity of early endothelial progenitor cells in prehypertension: relation to endothelial dysfunction. *Hypertension* 2010; **55**: 1389–97.
 - 31 Silvestre JS, Bergaya S, Tamarat R, Duriez M, Boulanger CM, Levy BI. Proangiogenic effect of angiotensin-converting enzyme inhibition is mediated by the bradykinin B(2) receptor pathway. *Circ Res* 2001; **8**: 678–83.
 - 32 Setacci C, de Donato G, Teraa M, Moll FL, Ricco JB, Becker F, Robert-Ebadi H, Cao P, Eckstein HH, De Rango P, Diehm N, Schmidl J, Dick F, Davies AH, Lepántalo M, Apelqvist J. Treatment of critical limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2011; **42**(Suppl. 2): S43–59.
 - 33 Seeger FH, Tonn T, Krzossok N, Zeiher AM, Dimmeler S. Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2007; **28**: 766–72.
 - 34 Hou X, Wu X, Ma J, Lv X, Jin X. Erythropoietin augments the efficacy of therapeutic angiogenesis induced by allogenic bone marrow stromal cells in a rat model of limb ischemia. *Mol Biol Rep* 2010; **37**: 1467–75.
 - 35 Janmaat ML, Heerkens JL, de Bruin AM, Klous A, de Waard V, de Vries CJ. Erythropoietin accelerates smooth muscle cell-rich vascular lesion formation in mice through endothelial cell activation involving enhanced PDGF-BB release. *Blood* 2010; **115**: 1453–60.
 - 36 Beleslin-Cokic BB, Cokic VP, Yu X, Weksler BB, Schechter AN, Noguchi CT. Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells. *Blood* 2004; **104**: 2073–80.
 - 37 Elliott S, Busse L, Bass MB, Lu H, Sarosi I, Sinclair AM, Spahr C, Um M, Van G, Begley CG. Anti-Epo receptor antibodies do not predict Epo receptor expression. *Blood* 2006; **107**: 1892–5.
 - 38 Vittori D, Pregi N, Pérez G, Garbossa G, Nesse A. The distinct erythropoietin functions that promote cell survival and proliferation are affected by aluminum exposure through mechanisms involving erythropoietin receptor. *Biochim Biophys Acta* 2005; **2**: 29–36.
 - 39 Brines M, Cerami A. Discovering erythropoietin's extra-hematopoietic functions: biology and clinical promise. *Kidney Int* 2006; **70**: 246–50.
 - 40 D'Andrea RJ, Gonda TJ. A model for assembly and activation of the GM-CSF, IL-3 and IL-5 receptors: insights from activated mutants of the common beta subunit. *Exp Hematol* 2000; **28**: 231–43.
 - 41 Brines M, Cerami A. Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2005; **6**: 484–94.
 - 42 Imamura R, Isaka Y, Ichimaru N, Takahara S, Okuyama A. Carbamylated erythropoietin protects the kidneys from ischemia-reperfusion injury without stimulating erythropoiesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **3**: 786–92.
 - 43 Imamura R, Okumi M, Isaka Y, Ichimaru N, Moriyama T, Imai E, Nonomura N, Takahara S, Okuyama A. Carbamylated erythropoietin improves angiogenesis and protects the kidneys from ischemia-reperfusion injury. *Cell Transplant* 2008; **17**: 135–41.
 - 44 Leist M, Ghezzi P, Grasso G, Bianchi R, Villa P, Fratelli M, Savino C, Bianchi M, Nielsen J, Gerwien J, Kallunki P, Larsen AK, Helboe L, Christensen S, Pedersen LO, Nielsen M, Torup L, Sager T, Sfacteria A, Erbayraktar S, et al. Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science* 2004; **5681**: 239–42.
 - 45 Kitamura H, Isaka Y, Takabatake Y, Imamura R, Suzuki K, Takahara S, Imai E. Nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects against tubulointerstitial injury in a unilateral ureteral obstruction model. *Nephrol Dial Transplant* 2008; **23**: 1521–8.
 - 46 Marzo F, Lavorgna A, Coluzzi G, Santucci E, Tarantino F, Rio T, Conti E, Autore C, Agati L, Andreotti F. Erythropoietin in heart and vessels: focus on transcription and signalling pathways. *J Thromb Thrombolysis* 2008; **26**: 183–7.
 - 47 Hung HS, Shyu WC, Tsai CH, Hsu SH, Lin SZ. Transplantation of endothelial progenitor cells as therapeutics for cardiovascular diseases. *Cell Transplant* 2009; **18**: 1003–12.
 - 48 Tóvári J, Gilly R, Rásó E, Paku S, Bereczky B, Varga N, Vágó A, Timár J. Recombinant human erythropoietin alpha targets intratumoral blood vessels, improving chemotherapy in human xenograft models. *Cancer Res* 2005; **65**: 7186–93.
 - 49 Westenbrink BD, Ruirok WP, Voors AA, Tilton RG, van Veldhuisen DJ, Schoemaker RG, van Gilst WH, de Boer RA. Vascular endothelial growth factor is crucial for erythropoietin-induced improvement of cardiac function in heart failure. *Cardiovasc Res* 2010; **87**: 30–9.
 - 50 Sautina L, Sautin Y, Beem E, Zhou Z, Schuler A, Brennan J, Zharkov SI, Diao Y, Bungert J, Segal MS. Induction of nitric oxide by erythropoietin is mediated by the {beta} common receptor and requires interaction with VEGF receptor 2. *Blood* 2010; **115**: 896–905.
 - 51 Nakano M, Satoh K, Fukumoto Y, Ito Y, Kagaya Y, Ishii N, Sugamura K, Shimokawa H. Important role of erythropoietin receptor to promote VEGF expression and angiogenesis in peripheral ischemia in mice. *Circ Res* 2007; **100**: 662–9.
 - 52 Wang L, Chopp M, Gregg SR, Zhang RL, Teng H, Jiang A, Feng Y, Zhang ZG. Neural progenitor cells treated with EPO induce angiogenesis through the production of VEGF. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008; **28**: 1361–8.
 - 53 Koh SH, Noh MY, Cho GW, Kim KS, Kim SH. Erythropoietin increases the motility of human bone marrow-multipotent stromal cells (hBM-MSCs) and enhances the production of neurotrophic factors from hBM-MSCs. *Stem Cells Dev* 2009; **18**: 411–21.

3. DISCUSSION

3.1. Les microparticules leucocytaires et la lipoprotéine phospholipase A2 sont deux biomarqueurs innovants pour dépister les patients porteurs d'une sténose carotidienne à risque.

Nous montrons que les MPL et la Lp-PLA2 sont élevés de façon significative et indépendante chez les patients porteurs d'une sténose carotidienne serrée instable histologiquement. Ce résultat reste significatif et indépendant dans le groupe des patients asymptomatiques pour les MPL. Ces résultats sont concordants avec l'analyse des taux locaux de MPL et de Lp-PLA2 dans les plaques carotidiennes à risque (60, 85).

Leroyer *et coll.* ont montré chez 26 patients bénéficiant d'une endartériectomie (13 patients asymptomatiques) que 52% des MP extraites de la plaque carotidienne étaient issues des leucocytes dont 30% des macrophages, 15 des lymphocytes et 8% des polynucléaires. Le reste des MP locales de la plaque provenait des globules rouges dans 27%, des cellules endothéliales dans 8% et des CML dans 13%. Les taux circulants de MP étaient retrouvés à des proportions différentes mais les MPL restaient majoritaires (38%), il y avait 24% issues des globules rouges, 9% des cellules endothéliales, 29% des plaquettes et aucune des CML. Par contre, il n'y avait pas de différences entre les taux (locaux et circulants) de MP des patients symptomatiques et asymptomatiques et les auteurs ne disposaient pas d'analyse histologique de l'instabilité de la plaque pour pouvoir corréler les taux de MP à l'instabilité histologique. Suite à ces résultats, nous avons axés nos dosages

biologiques périphériques sur les MPL en partant du principe qu'elles étaient majoritaires dans la plaque carotidienne et dans la circulation systémique des patients porteurs d'une sténose carotidienne serrée. Pour mettre en évidence une différence entre les patients, nous avons augmenté le nombre d'inclusion et nous avons utilisé une nouvelle méthode de détection avec une cytométrie de flux de haute sensibilité. Nous avons choisi de comparer les patients en fonction des caractéristiques histologiques des plaques et non des symptômes neurologiques car notre but final était de pouvoir comparer les taux circulants de MPL des patients asymptomatiques en fonction de l'instabilité de leurs plaques. En effet, l'enjeu actuel en chirurgie et médecine vasculaire serait de pouvoir isoler parmi les patients asymptomatiques porteurs d'une sténose carotidienne serrée ceux qui présentent un fort risque neurologique et qui bénéficieraient donc le plus d'une chirurgie préventive. L'intérêt d'un biomarqueur dans ce cadre est sa disponibilité, sa simplicité d'utilisation et sa reproductibilité en comparaison à une technique d'imagerie. Certaines équipes ont montré des résultats intéressants pour la CRP-us et les MMP-9 dans cette indication mais leurs taux périphériques ne sont pas significativement différents chez les patients asymptomatiques (43, 44). Nous montrons donc pour la première fois qu'un biomarqueur, les MPL, est élevé de façon significative et indépendante chez des patients asymptomatiques porteurs d'une sténose carotidienne serrée instable histologiquement. Nous avons utilisé pour cela une nouvelle méthode de cytométrie de flux de haute sensibilité qui assure une haute résolution de détection et une baisse du bruit de fond pour détecter des sous-populations de petites MP indétectables par des techniques conventionnelles (166). Cette optimisation de la détection explique probablement notre capacité à obtenir des différences significatives même si le nombre de patients inclus reste limité. Nous avons testé deux types de sous-population de MPL, les CD11b66b et les CD15, et seules les CD11b66b sont indépendamment corrélées à la plaque instable après analyse multivariée. Cela peut s'expliquer par l'origine différente de ces MPL : les CD15 sont principalement issues des

polynucléaires alors que les CD11b66b sont issues des monocytes et de certains lymphocytes qui participent plus à la progression de l'athérosclérose (167). Il est difficile de prouver que l'augmentation des MPL circulantes est secondaire à une libération des MPL locales de la plaque vers la circulation sanguine lors de la rupture de la plaque instable, cependant les données de la littérature suggèrent fortement qu' en favorisant la diapédèse et l'accumulation des macrophages dans l'intima, en activant la néoangiogenèse de la plaque et en favorisant le thrombus intimal, les MPL sont fortement impliquées dans la genèse et la vulnérabilité de la plaque d'athérome (60-65).

En 2008, Mannheim *et coll.* ont évalué le niveau d'expression locale de Lp-PLA2 et de son produit d'hydrolyse, la lyso PC, au sein de la plaque de 167 pièces d'endartériectomie carotidienne (85). 107 patients étaient asymptomatiques et 60 patients symptomatiques. 65% des patients symptomatiques avaient fait un accident ischémique transitoire. Les taux de Lp-PLA2 et de lyso PC étaient plus élevés dans les plaques issues de patients symptomatiques que celles d'asymptomatiques ($p < 0,05$), cette différence est attribuable aux patients ayant fait un accident transitoire. La Lp-PLA2 était localisée dans le cœur lipidique et colocalisée avec les macrophages et les LDL oxydées. Les auteurs ne disposent pas d'analyse histologique pour définir une plaque comme stable ou instable selon la classification AHA (9). Nous montrons que le taux plasmatique de Lp-PLA2 est significativement plus élevé et ce de façon indépendante chez les patients ayant une plaque carotidienne histologiquement instable versus une plaque stable. Nous n'individualisons pas de différence significative entre le taux plasmatique de Lp-PLA2 des sujets symptomatiques et celui des sujets asymptomatiques. Cela s'explique par des populations différentes de sujets symptomatiques entre nos deux études : nous avons inclus 31% d'accidents transitoires alors que l'étude de Mannheim *et coll.* a inclus 65% de d'accidents transitoires, et ce sont ces mêmes patients

qui ont un taux d'expression locale de Lp-PLA2 plus élevé que les patients asymptomatiques. Cela explique peut-être que nous n'ayons pas de différence de taux plasmatique de Lp-PLA2 entre les sujets symptomatiques et asymptomatiques car la proportion de sujets avec accidents transitoires est relativement faible. Nos résultats sont cohérents avec ceux de la littérature, deux méta-analyses et une revue récentes confirment qu'après ajustement multivarié le taux plasmatique de Lp-PLA2 est un bon facteur prédictif de la survenue d'événements coronariens et cérébro-vasculaires (104-106). Bien qu'il n'y ait pas de recommandation sur le sujet, nous avons choisi de mesurer la masse et non l'activité de la Lp-PLA2. En effet, le dosage de l'activité de la Lp-PLA2 n'est actuellement pas commercialisé; il est réservé au domaine de la recherche et l'application de résultats portant sur l'activité de la Lp-PLA2 ne pourrait donc pas être réalisée rapidement en pratique clinique quotidienne. De plus, le taux et l'activité de Lp-PLA2 ont montré dans de nombreuses études la même sensibilité dans la détection du risque cardiovasculaire (88) avec une dépendance moindre entre le taux de LDL-cholestérol et la masse de Lp-PLA2 qu'entre le taux de LDL et l'activité de la Lp-PLA2 (89). Enfin, le consensus international de 2008 intégrant la Lp-PLA2 dans l'évaluation du risque de maladie cardiovasculaires utilise le dosage de la masse de Lp-PLA2 et non son activité (90). Notre travail a montré que les patients avec des signes neurologiques ou une plaque instable avaient des taux de CRP-us plus élevés significativement que les patients asymptomatiques ou une plaque stable. Ce résultat est similaire à celui d'Alvarez *et coll.* obtenu chez 62 patients (44). Cependant après analyse multivariée dans notre travail comme dans le leur, la CRP-us n'est plus associée de façon indépendante à l'instabilité histologique de la plaque. Ainsi, la CRP-us augmente peut-être suite à l'AVC, la Lp-PLA2 est ainsi un marqueur plus indépendant pour prédire la vulnérabilité d'une plaque. D'un point de vue physiopathologique, il est facile de comprendre qu'en favorisant l'oxydation des LDL et la formation de cellules spumeuses la Lp-PLA2 participe à la survenue de la

plaque d'athérome et leur instabilité, et peut être libérée dans la circulation générale lors de la rupture de plaque.

Si on compare la pertinence des deux nouveaux biomarqueurs mis en évidence par nos travaux, les résultats sur les MPL sont plus robustes car le taux de MPL sérique est significativement plus élevé chez les sujets asymptomatiques avec une plaque instable alors que l'augmentation du taux sérique de Lp-PLA2 chez ces patients n'est pas significative statistiquement. Nous avons aussi essayé de renforcer la prédiction de la plaque instable en associant les résultats des MPL et de la Lp-PLA2 mais cela ne donne pas de résultats probants.

Ces deux travaux ont les mêmes limites : tout d'abord le faible nombre de sujets inclus qui rend nos résultats statistiques fragiles. Par ailleurs, le problème d'un biomarqueur est qu'il reflète un état systémique sans cibler directement la plaque instable d'intérêt. Il sera peut-être nécessaire dans l'avenir de coupler une méthode d'imagerie simple et le dosage d'un biomarqueur pour mieux préciser les anomalies sur une localisation en particulier. Enfin, nous avons choisi de corrélérer les taux plasmatiques de biomarqueurs à l'instabilité histologique de la plaque. L'idéal dans l'avenir pour confirmer ces résultats préliminaires serait de pouvoir lors d'une étude suivre cliniquement et biologiquement les patients asymptomatiques ayant une sténose carotidienne serrée et corrélérer les taux plasmatiques à la survenue d'évènements cliniques mais cela soulève des questions éthiques.

3.2. Le prétraitement des progéniteurs endothéliaux tardifs par de l'érythropoïétine augmente leur potentiel angiogénique dans un modèle murin d'ischémie de patte.

Nous montrons que le pré-traitement *ex vivo* des progéniteurs endothéliaux tardifs par de l'EPO pendant 24 heures améliore les capacités angiogènes de ces cellules *in vitro* et *in vivo* dans un modèle d'ischémie de patte de souris nude. Ce pré-traitement avec de l'EPO pourrait être transposé à l'homme pour améliorer la néoangiogenèse des PEC tardifs périphériques et ainsi optimiser les résultats de la thérapie cellulaire dans l'ischémie critique des membres inférieurs et simplifier le protocole de prélèvement des progéniteurs.

Nous utilisons un modèle d'ischémie de patte de souris nude pour mimer une ischémie critique de membre inférieur, la souris est immunodéprimée pour éviter tout phénomène de rejet lié à l'injection de cellules humaines. Les PEC tardifs issus de sang de cordon sont mis au contact de l'EPO pendant 24 heures puis sont injectées par voie intraveineuse 24 heures après la chirurgie. Deux autres groupes d'animaux sont étudiés : un groupe reçoit du placebo et l'autre groupe reçoit des PEC tardifs non conditionnés. La reperfusion est appréciée à J14 par un système de laser doppler et par immunohistochimie. Nous avons ainsi montré une réduction du score clinique de nécrose, une amélioration significative de la perfusion à J14 et une augmentation significative de la densité capillaire pour le groupe pré-conditionné en comparaison aux deux autres groupes (placebo et PEC tardifs). Il s'agit de la première étude utilisant l'EPO comme molécule de pré-conditionnement. L'EPO co-injecté avec des cellules souches médullaires a montré une amélioration de l'angiogenèse induite par ces cellules dans un modèle d'ischémie de patte de rat et

dans un modèle d'ischémie myocardique (168, 169). Cependant, ces résultats doivent être mis en balance avec des travaux récents qui suggèrent que l'administration d'EPO entraîne une prolifération de CML dans la paroi carotidienne de souris (170). L'avantage du pré-traitement est que l'EPO est administré *ex vivo* et les cellules sont ensuite rincées ce qui limite au maximum les effets secondaires potentiels induits par l'EPO elle-même.

Le modèle animal d'ischémie de patte nous a permis aussi d'étudier les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la néoangiogenèse induite par le priming des PEC tardifs par l'EPO. Les effets de l'EPO semblent médiés par deux types de récepteur : les effets hématopoïétiques semblent médiés par l'EPOR formés de deux sous-unité EPOR ; et les effets non hématopoïétiques protecteurs tissulaires par l'EPOR associé à une sous-unité CD131 (163). Nous avons montré pour la première fois que les ECFC expriment EPOR et CD131 et que le traitement par l'EPO augmente cette expression. EPOR et CD131 co-immunoprécipitent et co-localisent au niveau des ECFC. Nous avons ensuite transfecté les ECFC avec un siRNA CD131 pour étudier l'effet de l'extinction de l'expression de CD131 par les ECFC et nous avons montré que les effets angiogéniques *in vitro* et *in vivo* de l'EPO sur les ECFC étaient abolis par la transfection. Nous supposons donc que les effets angiogéniques de l'EPO sur les ECFC sont médiés par la sous-unité CD131 du récepteur à l'EPO. Brines *et coll.* avaient déjà décrit un effet cytoprotecteur de l'EPO sur le système nerveux et le myocarde via la sous-unité CD131 (171). Imamura *et coll.* avaient montré une augmentation des cellules endothéliales des capillaires péri-tubulaires par l'EPO via la sous-unité CD131 dans un modèle rénal d'ischémie-reperfusion (172). Nos résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle l'EPO stimule l'angiogenèse via la sous-unité CD131 de son récepteur.

Nous avons choisi de stimuler les ECFC avec de l'EPO car il s'agit d'une molécule déjà connue et utilisée depuis de longues années dans la pathologie humaine pour stimuler l'érythropoïèse chez les insuffisants rénaux notamment. Il s'agit donc d'un traitement déjà commercialisé et bien toléré ce qui faciliterait son utilisation rapide en pratique quotidienne. Des effets pro-thrombotiques artériels et veineux ont été rapportés chez les patients traités par EPO au long cours (173) ce qui pourraient limiter son utilisation chez des patients en ischémie critique. L'avantage du traitement proposé ici est qu'il s'agit d'une stimulation *ex vivo* des ECFC par de l'EPO, et que les cellules sont ensuite rincées ce qui diminue grandement la quantité d'EPO injecté en comparaison à une injection directe d'EPO dans la circulation systémique. D'autres molécules ont été testées comme agents stimulants *ex vivo* la néoangiogenèse des PECs injectés *in vivo* (154, 156). Nous avons étudié lors d'un précédent travail l'effet du fucoïdane, polysaccharide sulfaté dérivé des algues brunes, sur la néoangiogenèse induite par les PEC tardifs dans le même modèle d'ischémie de patte de souris nude (157) (Article Annexe). Cependant ces molécules ne sont pas déjà commercialisées en pathologie humaine ce qui limiterait leur utilisation rapide comme agent stimulant la thérapie cellulaire.

Enfin, le modèle animal que nous avons choisi présente des avantages et des limites qu'il convient de discuter. Il s'agit tout d'abord d'un animal immunodéprimé ce qui limite la réaction d'immunité induite par l'injection de cellules humaines chez une souris. Cependant, les souris ne sont pas trop fragiles ce qui évite un trop fort taux de mortalité. La technique chirurgicale est reproductible après une phase d'apprentissage ce qui limite les variations de résultat liées à des niveaux d'ischémie différents pour les animaux. Les techniques utilisées pour apprécier la reperfusion sont validées et publiées ce qui renforce l'impact des résultats obtenus. La principale limite de ce modèle est que

l'induction de l'ischémie correspond plus à une ischémie aigue qu'à une ischémie critique, ainsi le risque est que les éléments de physiopathologie impliqués sont peut-être différents entre ce modèle animal et l'ischémie critique chez l'homme.

4. PERSPECTIVES

4.1. La sténose carotidienne à risque du sujet asymptomatique

Nous avons identifié deux biomarqueurs innovants pour diagnostiquer les plaques instables carotidiennes définies en histologie. Les MPL sont corrélées de façon significative et indépendante à l'instabilité de la plaque chez tous les patients et chez les patients asymptomatiques, la Lp-PLA2 est corrélée de façon significative et indépendante à l'instabilité de la plaque chez tous les patients.

Dans le futur, nous souhaitons nous concentrer sur l'étude des MPL dans cette indication en multipliant les tests biologiques et en affinant les caractéristiques des MPL en lien à la plaque instable. L'intégralité des tests dont notre laboratoire dispose n'a pas pu être réalisée du fait de l'absence de plasma en quantité suffisante. Il sera intéressant de poursuivre les prélèvements biologiques périphériques en effectuant des tests fonctionnels des MPL : potentiel fibrinolytique et procoagulant, caractérisation poussée du type cellulaire d'origine. Connaître plus précisément les caractéristiques des MPL impliquées dans l'instabilité de la plaque permettrait d'étudier les mécanismes physiopathologiques responsables de cette instabilité. Nous souhaitons aussi analyser les caractéristiques des MPL locales de la plaque et de les corréler à celles issues du sang périphérique pour mettre en relation directe les MPL de la plaque instable et celles retrouvées dans la circulation systémique. Nous souhaitons aussi répéter les dosages périphériques chez un même patient à plusieurs jours d'intervalle pour vérifier la reproductibilité de la technique et l'absence de variation majeure du taux de MPL dans cette pathologie chez un même sujet au cours du temps.

Nous souhaitons aussi augmenter le nombre de sujets étudiés pour renforcer et confirmer nos résultats. Pour cela, nous pouvons continuer à inclure des patients en pré-opératoire dans notre service et poursuivre la corrélation avec l'analyse histologique. Nous pouvons aussi étendre notre recrutement et envisager un travail multicentrique pour gagner en termes de temps et de validation de reproductibilité. L'idéal pour confirmer le rôle des MPL comme biomarqueur de la plaque instable serait de réaliser une étude multicentrique prospective chez des sujets asymptomatiques porteurs d'une sténose carotidienne serrée supérieure à 60% en dosant le taux de MPL semestriellement ou annuellement et en corrélant ces taux à la survenue d'évènements neurologiques ipsilatéraux à la sténose. Le problème est que cette étude soulève des questions éthiques quant au risque neurologique pris en conscience chez ces patients surveillés.

Nous souhaitons aussi associer à ce versant biologique un versant échographique pour coupler deux techniques simples d'utilisation et augmenter ainsi la spécificité de nos résultats. L'échographie est une technique séduisante pour apprécier des caractéristiques de plaque instable : l'irrégularité de surface, l'anéchogénicité, le score GSM bas. La technique échographique la plus récente est l'utilisation d'un produit de contraste intravasculaire capable de rehausser la plaque si elle est présente des néovaisseaux. Cette néoangiogenèse intraplaque est un signe d'instabilité. Les résultats sont pour l'instant séduisants mais il n'existe pas encore de score quantitatif permettant de standardiser cette technique (50). Un logiciel est commercialisé depuis peu dans la pathologie tumorale hépatique et rénale pour quantifier l'importance de la néoangiogenèse dans l'aide au diagnostic tumoral et à la surveillance de ces lésions (Sonotumor®, Bracco). Le constructeur est en cours de développement d'un logiciel identique mais appliqué à la pathologie carotidienne (Logiciel VueBox®, Bracco). Grâce au prêt temporaire du logiciel par le

constructeur, nous avons réalisé une étude préliminaire portant sur 10 patients et 11 plaques carotidiennes (**Figure 21**). La sensibilité de diagnostic d'instabilité d'une sténose était de 66,7% pour l'analyse en mode B (classification de Geroulakos), de 83,3% pour l'analyse semi-quantitative de la prise de contraste (Plaque instable : prise de contraste ; plaque stable : pas de prise de contraste) et de 100% pour l'analyse quantitative de la prise de contraste grâce au logiciel VueBox®, Bracco. La reproductibilité était bonne pour l'analyse semi-quantitative de la prise de contraste (kappa 0,81), mauvaise pour l'analyse quantitative de la prise de contraste et l'analyse en mode B (respectivement : kappa 0,40 et 0,29). Nous avons notamment été gênés par les artéfacts liés aux mouvements (déglutition, pulsatilité carotidienne), inconvénients non présents dans la pathologie hépatique ou rénale. Ces artéfacts entraînent des mouvements importants au cours du temps de la zone d'intérêt intra-plaque définie par le logiciel et modifient ainsi grandement les résultats. Nous avons ainsi conclu que l'analyse quantitative de la prise de contraste d'une plaque carotidienne à l'aide d'un logiciel spécifique avait une bonne sensibilité mais une mauvaise reproductibilité interindividuelle. La technique doit encore progresser pour pouvoir être utilisée dans l'avenir comme outil diagnostique de l'instabilité d'une sténose carotidienne asymptomatique. Il sera intéressant dans l'avenir lorsque le logiciel de quantification aura été adapté pour palier à ces artéfacts, de coupler les analyses biologiques et échographiques pour améliorer la reproductibilité et l'impact médical de ces nouvelles techniques.

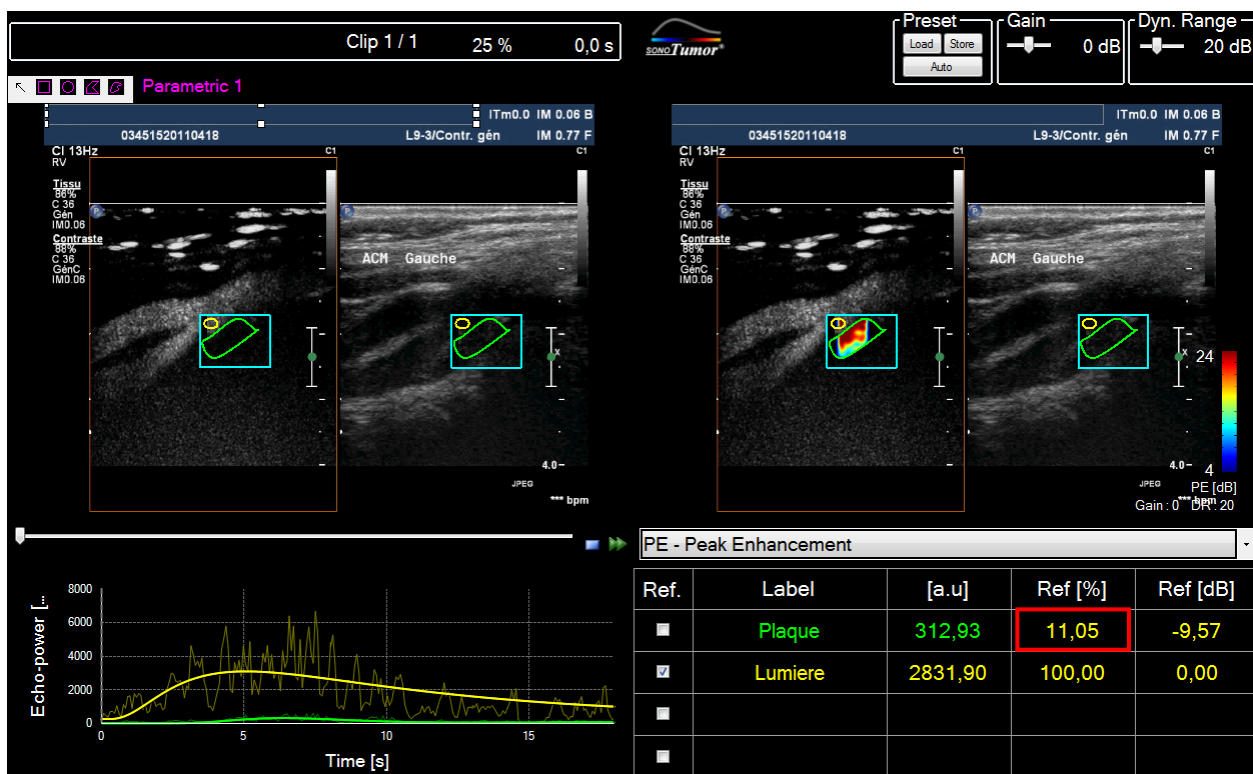


Figure 20 : exemple d'analyse quantitative de la prise de contraste d'une plaque carotidienne. Le rectangle bleu correspond à la zone d'intérêt au niveau de laquelle l'analyse va être faite. La zone d'intérêt verte correspond à l'analyse au niveau de la plaque, la zone jaune à l'analyse au niveau de la lumière artérielle. La courbe verte correspond à la prise de contraste au niveau de la plaque en fonction du temps, la courbe jaune à celle au niveau de la lumière. Le paramètre étudié est le rapport exprimé en pourcentage entre le pic d'intensité au niveau de la plaque et le pic d'intensité au niveau de la lumière.

4.2. L'optimisation de la thérapie cellulaire dans l'ischémie critique des membres inférieurs

Nous avons montré que le pré-traitement *ex vivo* des progéniteurs endothéliaux tardifs par de l'EPO améliore la néoangiogenèse de ces cellules *in vitro* et *in vivo* dans un modèle d'ischémie de patte de souris nude. Ce pré-traitement pourrait être transposé à l'homme pour améliorer la néoangiogenèse des PEC tardifs périphériques, optimiser les résultats de la thérapie cellulaire dans l'ischémie critique des membres inférieurs et simplifier le protocole de prélèvement des progéniteurs et de réalisation de la thérapie cellulaire. Pour affiner les résultats obtenus sur ce modèle préclinique et notamment établir le nombre de cellules ayant réellement migrées au site ischémique, nous avons prévu de quantifier le nombre d'ECFC présentes au niveau du muscle ischémié par imagerie SPECT après marquage avec du 18Fluoro-deoxy-glucose, en collaboration avec le CERIMED (Centre Européen de Recherche en Imagerie) qui sera fonctionnel au dernier trimestre 2012. De plus, nous souhaiterions tester des agents agonistes sélectifs de la sous-unité CD131 du récepteur à l'EPO dans ce modèle préclinique pour confirmer l'implication de cette sous-unité dans la néoangiogenèse et s'affranchir ainsi du risque thrombotique inhérent à la stimulation du récepteur à l'EPO.

Par ailleurs, nous souhaiterions étendre cette stratégie de conditionnement à d'autres molécules stimulant les ECFCs. Nous avons pour cela déposé un dossier d'Appels d'Offre de Recherche Clinique auprès de l'Assistance publique Hôpitaux de Marseille (AP-HM) le 3 septembre 2012. Ce projet utilise le CD146 soluble : elle a été identifiée récemment par notre unité INSERM et possède

des effets angiogéniques importants et complémentaires de ceux du VEGF. Cette molécule pourrait ainsi constituer un adjuvant majeur pour le développement d'un produit de thérapie cellulaire performant à partir du sang périphérique. Notre étude pilote a pour but d'utiliser la molécule CD146 soluble pour amplifier et stimuler les propriétés angiogéniques des progéniteurs endothéliaux issus directement du sang périphérique de patients atteints d'ischémie critique des membres inférieurs. L'objectif principal de l'étude sera d'évaluer l'efficacité du CD146 soluble sur l'augmentation *in vitro* du nombre d'ECFC issues du sang périphérique de patients en ischémie critique, et sur la stimulation du potentiel de régénération vasculaire de ces cellules. Il s'agira d'une étude biologique à visée exploratoire réalisée dans le service de chirurgie vasculaire du Pr MAGNAN, et associée à notre laboratoire de recherche. Cette étude si elle est acceptée permettra de confirmer le rôle majeur du CD146 dans la néoangiogenèse post-natale. Cette molécule qui fait l'objet d'un dépôt de brevet par notre laboratoire pourrait servir de molécule de choix pour baser un protocole de thérapie cellulaire simplifier en prélevant des cellules progénitrices endothéliales périphériques, en stimulant ces cellules *ex vivo* et en les réinjectant au site ischémique pour améliorer la néoangiogenèse et éviter ainsi l'amputation des patients en ischémie critique.

ORIGINAL ARTICLE

Therapeutic effect of fucoidan-stimulated endothelial colony-forming cells in peripheral ischemia

G. SARLON,*†¹ F. ZEMANI,†¹ L. DAVID,§ J.-P. DUONG VAN HUYEN,¶ B. DIZIER,**†† F. GRELAC,**†† S. COLLIEC-JOUAULT,‡‡ I. GALY-FAUROUX,**†† P. BRUNEVAL,¶ A.-M. FISCHER,**††§§ J. EMMERICH**††¶¶ and C. BOISSON-VIDAL**††

*INSERM UMR5608, Marseille; †Department of Vascular Medicine and Surgery, Hôpital La Timone, AP-HM, Marseille, France; ‡Department of Molecular Genetics, Université Mohamed Boudiaf, Oran, Algeria; §Therapol, Paris; ¶Department of Pathology, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris; **INSERM UMR5765, Paris; ††Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité; ‡‡IFREMER, Nantes; §§Department of Haematology, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris; and ¶¶Department of Vascular Medicine, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris, France

To cite this article: Sarlon G, Zemani F, David L, Duong Van Huyen JP, Dizier B, Grelac F, Collic-Jouault S, Galy-Fauroux I, Bruneval P, Fischer AM, Emmerich J, Boisson-Vidal C. Therapeutic effect of fucoidan-stimulated endothelial colony-forming cells in peripheral ischemia. *J Thromb Haemost* 2012; 10: 38–48.

Summary. *Background:* Fucoidan, an antithrombotic polysaccharide, can induce endothelial colony-forming cells (ECFC) to adopt an angiogenic phenotype *in vitro*. *Objectives:* We evaluated the effect of fucoidan on vasculogenesis induced by ECFC *in vivo*. *Methods:* We used a murine hindlimb ischemia model to probe the synergic role of fucoidan-treatment and ECFC infusion during tissue repair. *Results:* We found that exposure of ECFC to fucoidan prior to their intravenous injection improved residual muscle blood flow and increased collateral vessel formation. Necrosis of ischemic tissue was significantly reduced on day 14, to 12.1% of the gastronectomus cross-sectional surface area compared with 40.1% in animals injected with untreated-ECFC. ECFC stimulation with fucoidan caused a rapid increase in cell adhesion to activated endothelium in flow conditions, and enhanced transendothelial extravasation. Fucoidan-stimulated ECFC were resistant to shear stresses of up to 21 dyn cm⁻². Direct binding assays showed strong interaction of fucoidan with displaceable binding sites on the ECFC membrane. Bolus intramuscular administration of fucoidan 1 day after surgery reduces rhabdomyolysis. Mice injected with fucoidan (15 mg kg⁻¹) had significantly lower mean serum creatine phosphokinase (CPK) activity than control animals. This CPK reduction was correlated with muscle preservation against necrosis ($P < 0.001$). *Conclusions:*

Fucoidan greatly increases ECFC-mediated angiogenesis *in vivo*. Its angiogenic effect would be due in part to its transportation to the ischemic site and its release after displacement by proteoglycans present in the extracellular matrix. The use of ECFC and fucoidan together, will be an efficient angiogenesis strategy to provide therapeutic neovascularization.

Keywords: angiogenesis, endothelial colony-forming cells, fucoidan, ischemia, revascularization.

Introduction

Cardiovascular disease, due essentially to atherosclerosis, causes about half of all deaths in western countries. Peripheral vascular disease of the lower limbs is characterized by chronic obstruction of the arteries supplying the leg, gradually leading to critical limb ischemia. In end-stage disease, severe hypoperfusion results in ischemic ulceration and gangrene, with a high risk of amputation (10%–40%) in the first years [1]. Limb loss is best prevented by revascularization with endovascular or surgical approaches but this is impossible in 30% of patients with critical limb ischemia. No medical treatments have been shown to reduce the amputation rate at 6 months [2]. In this context, activation of local angiogenesis is a promising approach.

Infusion of *in vitro*-expanded bone marrow progenitor cells can enhance neovascularization in animal models of hindlimb ischemia [3,4]. Among these cells, endothelial progenitor cells are involved in regeneration of injured endothelium and neoangiogenesis after tissue ischemia, and are therefore a candidate cell therapy product [3,5,6]. Different cell populations have been isolated, which play a role in angiogenesis, but only one population, called 'endothelial colony-forming cells' (ECFC) has been shown to possess all the characteristics of

Correspondence: Catherine Boisson-Vidal, INSERM U765, Faculté de Pharmacie, 4 av. de l'Observatoire, 75006 Paris, France.

Tel.: +33 1 53 73 96 36; fax: +33 1 44 07 17 72.

E-mail: catherine.boisson-vidal@parisdescartes.fr

¹These authors contributed equally to this study.

Received 5 March 2011, accepted 27 October 2011

true endothelial progenitor and to form neovessel *in vivo* [3,4,7,8]. However, proangiogenic approaches to critical limb ischemia have so far given disappointing results, owing partly to insufficient homing and survival of transplanted progenitor cells at the ischemic site [2,9–13]. The ability of these cells to mobilize and migrate to ischemic sites appears to be an important factor in the success of such therapy [3,9,14,15]. Proangiogenic potential can be enhanced by activating ECFC prior to their injection and thereby amplifying the biochemical signaling cascades that contribute to the production of cytokines involved in the neovascularization process [3,4,6,16–18].

We have previously reported that fucoidan enhances the proangiogenic properties of ECFC *in vitro* [19]. Fucoidan is a marine sulphated polysaccharide with antithrombotic properties, which contrary to heparin does not significantly increase the bleeding risk, as it has a lower capacity to activate antithrombin [20]. Like proteoglycans, fucoidan interacts with a wide range of proteins and thus exhibits other biological properties including anti-inflammatory activity. It may act as a regulator of tissue remodelling [21] and has been shown to promote neovascularization when infused intramuscularly, together with the proangiogenic growth factor FGF-2, in a rat model of hindlimb ischemia [20,22]. Here we studied the interaction of fucoidan with infused ECFC during functional neovascularization in an athymic nude mouse model of hindlimb ischemia. We also investigated the mechanisms by which fucoidan enhances angiogenesis.

Methods

Cell culture, characterization and pretreatment

Endothelial cells from human umbilical cords (HUVEC) and ECFC from human umbilical cord blood collected from consenting mothers ($n = 20$), were isolated, expanded and characterized as previously described [19]. The study was approved by the local ethics committee of 'Hôpital des Instructions et des Armées de Bégin' (201008043234797) and protocol conformed to ethical guidelines of the Declaration of Helsinki. Flow cytometry was used to assess cell surface antigen expression of the endothelial lineage [18]. One day before all experiments, cells were growth-arrested for 24 h in EBM-2, 2% FCS and released from growth arrest by adding EBM-2, 5% FCS, with or without $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ of fucoidan concentrations for 24 or 72 h at 37°C , then washed, detached with versene/0.01% collagenase (1/1) and washed twice with buffered Hank's, 0.5% BSA, before use in angiogenesis and adhesion assays as previously described [18]. Supernatants and cells were separately analyzed after fucoidan stimulation. All the following experiments were performed in triplicate during the first 30 days of culture.

Mouse model of hindlimb ischemia

Animal care conformed to French guidelines (Services Vétérinaires de la Santé et de la Production Animale). The

experiments were approved by the IDF Paris Institutional Research Ethics Committee (CREEA, P2.CBV.031.07). Unilateral hindlimb ischemia was induced by femoral artery ligation in 7-week-old male athymic nude mice (Harlan) as previously described [18]. Five hours later the animals received an intravenous injection of normal saline ($n = 10$), ECFC (10^5 cells per animal; $n = 10$) or ECFC incubated in starvation medium overnight then stimulated with fucoidan $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ for 24 h, and washed (10^5 cells per animal; $n = 10$). To evaluate the effect of fucoidan on critical ischemia, three groups of animals underwent the surgical procedure and received two intramuscular injections 1 and 2 days after surgery of normal saline, fucoidan solution (15 mg kg^{-1}) or low-molecular-weight heparin (Lovenox, 2.5 mg kg^{-1} ; Sanofi Aventis, Paris, France). Laser Doppler perfusion imaging (Perimed France, Craponne, France) was used to appreciate revascularization on day 14 [18]. Hindlimb macroscopic necrosis was quantified before sacrifice as previously described [23]. A score was calculated for each animal, as follows: 0, no necrosis; 1, necrosis of one toe; 2, necrosis of two or more toes; 3, foot necrosis; 4, leg necrosis; 5, autoamputation of the entire leg. Vessel density was evaluated by high-definition microangiography Erase (Trophy system) and was expressed as the ratio of the ischemic to non-ischemic leg percentage of pixels per image in the quantification area occupied by vessels [18]. Peripheral venous blood samples were collected 14 days after surgery. The quantitative determination of total creatine phosphokinase (CPK) and lactate dehydrogenase (LDH) concentrations in plasma were determined by enzymatic assays according to procedures provided by Beckman Coulter (Villepinte, France).

Computed-assisted histomorphometric analysis

The gastronemius muscles from both hindlimbs were fixed in 4% formol and embedded in paraffin. Histological studies were based on computed-assisted analysis of different area (ICS framework viewer; Tribvn, Chatillon, France) as previously described [12]. For each muscle, four sections, $4 \mu\text{m}$ thick and $300 \mu\text{m}$ apart, were stained with hematoxylin and eosin (H&E) then digitized for further analysis. The mean of surface area of each tissue type (necrotic, ischemic or healthy) was quantified in each muscle and reported as a percentage of the entire surface area of the section ($n = 4$). The ratio between the mean entire cross-sectional areas of the ischemic and non-ischemic gastronemius muscles in each animal was used as an index of muscular trophicity.

Shear-flow adhesion assays

Tethering, rolling and flow adhesion experiments were conducted with a parallel-plate flow chamber in physiological shear stress conditions as previously described [18]. To distinguish between the adhesion of pretreated ECFC and that of detached endothelial cells, ECFC were stained with calcein. HUVEC monolayers (7.5×10^5) were grown on coverslips,

maintained at 37 °C for 6 days, then placed in the flow chamber and stimulated by exposure to a shear rate of 0.4 dyn cm⁻² for 30 min. Calcein-labeled ECFC in adhesion buffer (cation-free HBSS, 10 mM HEPES, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 2 mg mL⁻¹ BSA, pH 7.4) were then perfused for 15 min at 37 °C at a shear rate of 0.4 dyn cm⁻² and the coverslips were washed with adhesion buffer for 10 min. Adherent cells were visualized by phase-contrast microscopy. All experiments were performed in real time and videotaped for offline analysis. Images from 60 random microscope fields (1 cm²) were collected. Data are expressed as the number of adherent cells per cm². Detachment of adherent ECFC was studied by increasing the flow rate from 0.4 to 22 dyn cm⁻². In some experiments, fucoidan-stimulated or untreated ECFC were pretreated for 2 h at 37 °C with 0.5 U mL⁻¹ heparinase I, 0.1 U mL⁻¹ heparinase III and 0.2 U mL⁻¹ chondroitinases ABC (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

Rat aortic ring assay

Angiogenesis was also studied with aortic explants cultured in three-dimensional matrix gels as described by Zhu *et al.* [24]. Experiments conformed to the guidelines of the University Paris-Descartes Institutional Animal Care and Use Committee (C75.06.02). The thoracic aorta was isolated from 8-week-old male Wistar rats (Charles River Breeders; Charles River, L'Arbresle, France), immediately transferred to a culture dish containing warm serum-free minimum essential medium, and sliced into 1–2-mm rings after carefully removing fibroadipose tissue. The aortic rings were rinsed and embedded in rat tail type I collagen gel. The gels were overlaid with DMEM-10% FCS supplemented with 100 U mL⁻¹ penicillin and 100 µg mL⁻¹ streptomycin. Fucoidan (10 µg mL⁻¹), FGF-2 (50 ng mL⁻¹) or vascular endothelial growth factor (VEGF) (40 ng mL⁻¹) was added to the medium in the appropriate wells. The medium was changed on days 3, 6 and 9 of culture. Angiogenesis was scored by counting the number of branching endothelial sprouts.

Statistical analysis

Data are expressed as means ± SEM of at least three independent experiments. Significant differences were identified by ANOVA and Fisher's test. The Statview software package (SAS France, Brie Comte Robert, France) was used for all analyses. Differences with probability values below 0.05 were considered significant.

Results

Having previously shown that fucoidan can induce ECFC to adopt a proangiogenic phenotype *in vitro* [19], we first assessed the ability of fucoidan-stimulated ECFC to promote neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. We focused on ECFC because this cell type is currently proposed as the cell type at the origin of newly formed vessels [7]. Cells were isolated from human umbilical cord blood on the basis of

CD34 expression. The presence of Weibel-Palade bodies and combined expression of endothelial markers (CD31, Tie-2, KDR, Flt-1, CD144) unequivocally confirmed the endothelial phenotype of the ECFC thus obtained. Furthermore, ECFC do not express leuko-monocytic markers such as CD14 and CD45 [18].

Mice treated with fucoidan-stimulated ECFC are protected from ischemia-induced necrosis

Respectively, 30% and 25% of mice that received normal saline or untreated ECFC exhibited macroscopic necrosis (Fig. 1A). No mice treated with fucoidan-stimulated ECFC had macroscopic necrosis ($P < 0.05$ vs. CTRL, $n = 10$).

Fucoidan-stimulated ECFC enhance post-ischemic neovascularization

Hindlimb perfusion was, respectively, 34% and 99% higher with fucoidan-stimulated ECFC than with untreated ECFC ($P < 0.001$) and normal saline ($P < 0.001$) (Fig. 1B). The ischemic/non-ischemic limb angiography score was 11% higher with fucoidan-stimulated ECFC than with untreated ECFC, but the difference was not statistically significant (Fig. 1C).

Fucoidan-stimulated ECFC protect ischemic tissue against necrosis

The results of histomorphometric analysis of distal gastrocnemius muscle sections on day 14 in mice treated with normal saline, control ECFC and fucoidan-stimulated ECFC are shown in Fig. 2. Digitized muscle sections were divided into three areas: (i) preserved areas with a normal histology (Fig. 2C), (ii) ischemic areas containing cellular alterations but no necrosis (Fig. 2D) and (iii) necrotic tissue with muscle cell destruction (Fig. 2E). Animals treated with fucoidan-stimulated ECFC showed less necrosis ($P < 0.01$; Fig. 2E) and better muscle preservation than animals treated with control ECFC ($P < 0.05$; Fig. 2C) or with saline solution alone ($P < 0.01$; Fig. 2C).

Cellular and molecular mechanisms involved in fucoidan enhancement of proangiogenic activity

We next examined the potential mechanisms by which fucoidan-stimulation improved proangiogenic properties of ECFC. We investigated whether ECFC stimulation with fucoidan enhances their homing to ischemic tissue via ECFC adhesion to activated endothelium, their extravasation and differentiation into a vascular network.

Fucoidan-stimulated ECFC show enhanced adhesion to activated HUVEC in flow conditions

We used a flow-based adhesion assay with HUVEC to investigate the effect of fucoidan stimulation on treated

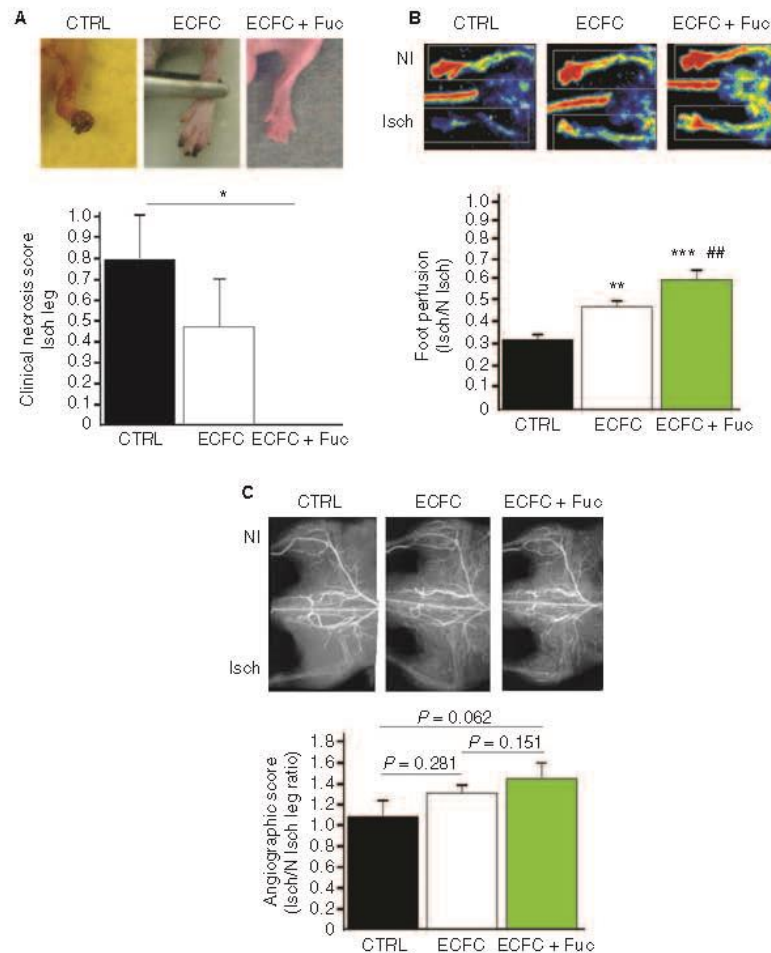


Fig. 1. Stimulation of endothelial colony-forming cells (ECFC) by fucoidan increases neovascularization in hindlimb ischemia. Cumulative incidence of clinical necrosis (A), foot perfusion (B), and quantitative analysis of angiographic score (C) of normal-saline (CTRL, ■), untreated ECFC (ECFC, □) and fucoidan-stimulated ECFC (ECFC + Fuc, ■) transplanted mice 14 days after femoral artery ligation. Values are expressed as means $\pm$ SEM ($n = 10$ per group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. normal saline-injected mice, # $P < 0.01$ vs. ECFC-injected mice. Representative photomicrographs are shown.

ECFC adhesion to activated endothelium in conditions simulating the shear forces encountered by ECFC when they adhere to vascular endothelial cells. In our experimental conditions, fucoidan-stimulated ECFC adhered much more rapidly than control ECFC. As shown in Fig. 3(A), short ECFC exposure to fucoidan caused a rapid increase in adhesion to HUVEC (1000 treated cells cm^{-2} vs. 545 control cells cm^{-2} ; $P < 0.001$). Fucoidan-stimulated ECFC adhered firmly to the endothelium and were more resistant than control cells to washing at shear rates up to 21 dyn cm^{-2} (Fig. 3B). This property is not correlated to fucoidan stimulation on cell surface integrins $\alpha_L\beta_2$ (LFA-1), $\alpha_M\beta_2$

(MAC-1) or $\alpha_4\beta_1$ (VLA4) expression levels and gene expression (data not shown).

Fucoidan stimulated ECFC show enhanced transmigration through activated HUVEC and enhanced differentiation into vascular tubes

Fluorescence microscopy of labelled fucoidan-stimulated ECFC that migrated through the activated endothelium showed that fucoidan enhanced ECFC motility by a factor of 2.5 compared with 40 ng mL^{-1} VEGF ($P < 0.01$) (Fig. 3C). Similar results were obtained when VEGF was present in the

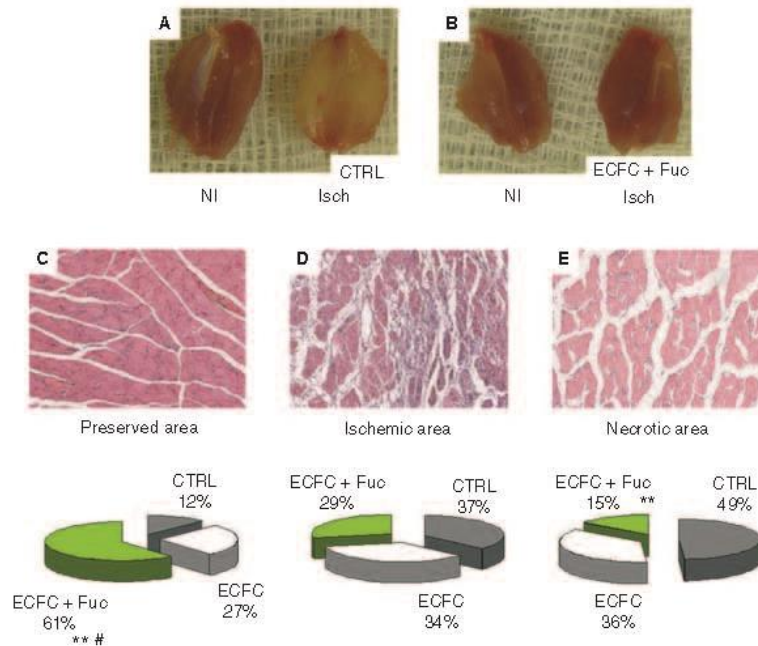


Fig. 2. Representative histological analysis showing tissue protection in nude mice treated with fucoidan-stimulated endothelial colony-forming cells (ECFC). Macroscopic aspects of ECFC-injected mice (A) and fucoidan-ECFC-injected mice (B). Hematoxylin and eosin (H&E) staining of the same distal gastrocnemius muscle sections on day 14 and quantification of histologically preserved area (C), ischemic infiltrated area (D) and necrotic area (E) type surface. The surface of each area type is reported as a percentage of the entire histological section surface. Values are expressed as means $\pm$ SEM ($n = 15$). ** $P < 0.01$ vs. normal saline-injected mice (CTRL), $P < 0.05$ vs. ECFC-injected mice. NI, non-ischemic hindlimb, isch, ischemic hindlimb.

bottom well of the chamber. Fucoidan enhanced ECFC transmigration through activated HUVEC monolayers towards VEGF ($P < 0.01$). Fucoidan also enhanced the proangiogenic activity of heparin growth factors present in EGM-2 culture medium ($P < 0.05$) (Fig. 3D). Real-time RT-PCR showed no change in mRNA levels of the proangiogenic cytokines VEGF-A, FGF-2, angiopoietin and SDF-1 (data not shown). In the same experimental conditions, no significant increase in proangiogenic cytokine release was observed in media conditioned by fucoidan-stimulated ECFC, as measured by ELISA. However, gelatine zymography of the same conditioned medium revealed that tube formation coincided with increased secretion of pro-MMP-9 (2-fold, $P < 0.05$; Fig. 4A,B).

Fucoidan binds to the ECFC surface

Fluorescent DTAF-fucoidan that retains its full proangiogenic activity bound rapidly to the ECFC outer membrane in a time-dependent manner (Fig. S1A) and was internalized within 15 min at 37 °C, probably by endocytosis. After 24 h of incubation, DTAF-fucoidan was found in endocytotic vesicles that localized in the perinuclear region (Fig. S1B). DTAF-fucoidan interacted with displaceable binding sites on ECFC, as heparin and cold fucoidan both induced concentration-

dependent displacement of labelled fucoidan when added to the culture medium ($P < 0.001$; Fig. S1C).

Bound fucoidan acts as a glycosaminoglycan

Because fucoidan is a sulphated polysaccharide and as heparan-sulphate proteoglycans (HSPG) play key roles in the angiogenic process, presenting chemokines to circulating cells, we investigated the role of fucoidan bound to the ECFC surface in ECFC adhesion and differentiation processes. ECFC were treated for 120 min with enzymes that selectively degrade either heparan sulphate or chondroitin sulphate, and were then incubated with $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ fucoidan at 37 °C overnight. Enzyme treatment abolished ECFC adhesion to the endothelium in flow conditions (-65% , $P < 0.001$; Fig. 3A) and also reduced tube formation in Matrigel (-50% , $P < 0.01$). Preincubation of enzyme-treated cells with fucoidan enhanced ECFC adhesion by 82% ($342 \text{ cells cm}^{-2}$ with fucoidan-stimulated ECFC without HSPG [HSPGd] vs. $187 \text{ cells cm}^{-2}$ with HSPGd-ECFC; $P < 0.001$) (Fig. 3A). These fucoidan-pretreated HSPGd-ECFC showed poor resistance to detachment when tested at shear stresses up to 20 dyn cm^{-2} (Fig. 3B). This fucoidan pretreatment had no effect on HSPGd-ECFC extravasation or tube formation (data not shown).

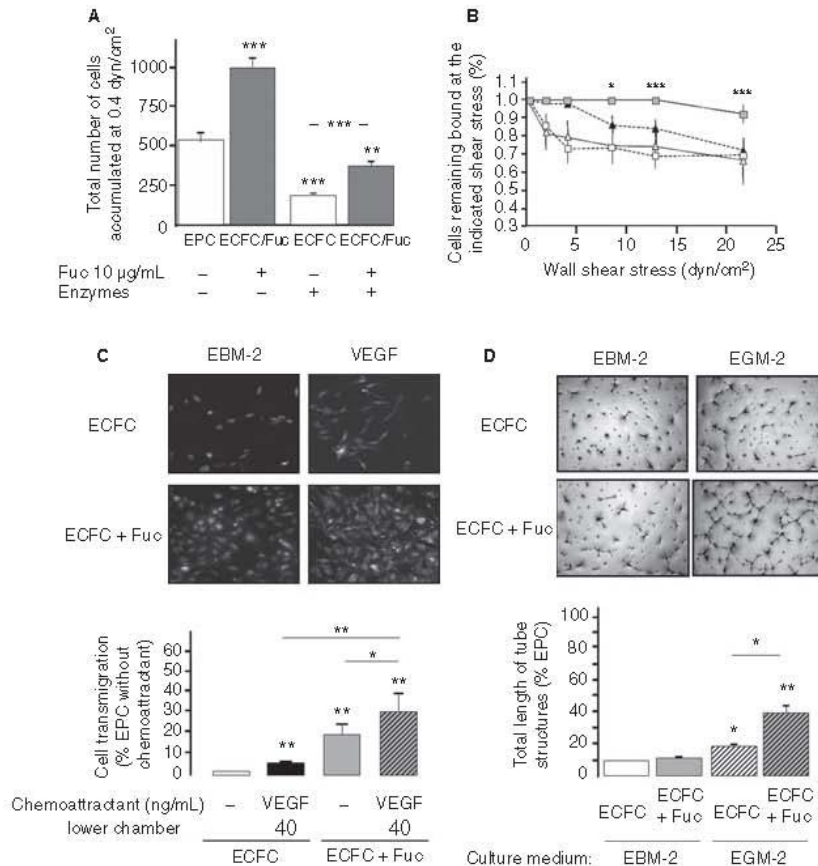


Fig. 3. Calcein-labelled fucoidan-stimulated endothelial colony-forming cells (ECFC) showed enhanced adhesion to activated endothelium at 0.4 dyn cm⁻², and enhanced motility and migration through activated endothelium. (A) Adherence of calcein-stimulated ECFC to activated Endothelial cells from human umbilical cords (HUVEC) under dynamic conditions. When indicated (enzymes +), ECFC were treated with appropriate enzymes (heparinase I and III, chondroitinases) to selectively degrade heparan sulphate and chondroitin sulphate on cell surface. (B) Resistance to detachment by incremented shear stresses from 0.4 to 22 dyn cm⁻². Control ECFC (□), fucoidan-stimulated ECFC (■), ECFC devoid of heparan-sulphate proteoglycans (HSPG) (Δ), fucoidan-stimulated ECFC devoid of HSPG (Δ). (C) Representative calcein-labelled untreated ECFC (ECFC, □, ■) and fucoidan-stimulated ECFC (ECFC + Fuc, □, ■) accumulated under the membrane (obj4). Extravasation assay was performed in a chemotaxis chamber with (VEGF, ■, ■) or without (EBM-2, □, □) vascular endothelial growth factor (VEGF) 40 ng mL⁻¹ as a chemoattractant. Fucoidan pretreatment enhances heparin-like growth factors-induced tubular morphogenesis by ECFC in Matrigel. (D) Tubular morphogenesis induced by control ECFC (ECFC, □, ■) and fucoidan-stimulated ECFC (ECFC + Fuc, □, ■) in EBM-2 5% FCS (EBM-2, □, □) and EGM-2 (■, ■) on matrigel. Phase-contrast micrograph, original ×4. Data are presented as percentages vs. untreated ECFC. Values are expressed as mean ± SEM: **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *n* = 3.

Fucoidan promotes angiogenesis in the aortic ring model

Rings of rat aorta embedded in collagen gel immediately after excision generate branching microvessels, and this process was enhanced by FGF-2 and VEGF in a concentration-dependent manner, as previously reported [24]. Unstimulated control rings exhibited only rare and short endothelial sprouts. As shown in Fig. 5, aorta rings treated with FGF-2 (Fig. 5A) and VEGF (Fig. 5B) showed approximate 2.5- and 2-fold increases in microvessel outgrowth, respectively, after 9 days of culture. Fucoidan significantly increased the number of neovessel sprouts induced by FGF-2 (Fig. 5A; *P* < 0.01) but not by VEGF

(Fig. 5B). The distance between the ring and the edge of the cell front around the ring, which reflects both cell proliferation and migration, was 1.4-fold longer in the presence of both fucoidan and FGF-2 than in the presence of FGF-2 alone (Fig. 5C).

Fucoidan protects ischemic tissue against necrosis better than heparin

Histomorphometric analysis of distal gastronemius muscle sections on day 14 in mice treated with intramuscular injection of normal saline, low-molecular-weight heparin (2.5 mg kg⁻¹)

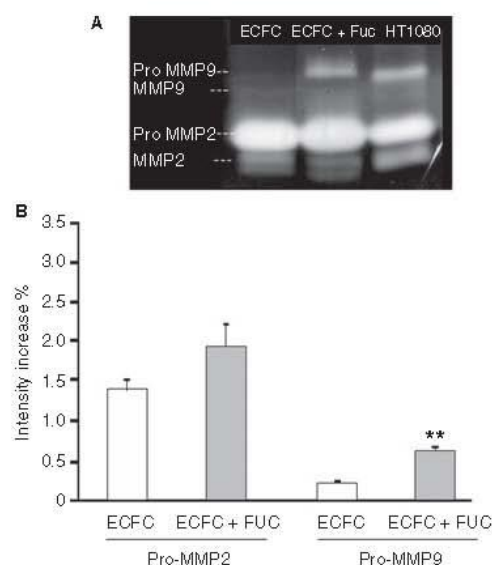


Fig. 4. Fucoidan-stimulated endothelial colony-forming cells (ECFC) showed enhanced pro-MMP9 secretion. (A) Gelatinolytic activities of metalloproteinases detected in culture supernatants by zymography. HT1080 cell conditioned medium was used as standard. This established cell line constitutively releases proMMP-2 and proMMP-9 into the culture medium. (B) Quantitative analysis of gelatinolytic activities 24 h (□, □) after prestimulation with (□) or without (□) fucoidan. Results referred to gelatinolytic activities of HT1080 media. Values are expressed as means $\pm$ SEM vs. untreated-ECFC. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$.

and fucoidan (15 mg kg^{-1}) is shown in Fig. 6. Animals treated with fucoidan showed less necrosis and better muscle preservation than animals treated with saline solution alone and heparin-treated animals ($P < 0.001$ and $P < 0.01$, respectively; Fig. 6A, C). This correlates with a significant decrease of blood levels of CPK 14 days after surgery (Fig. 6D). Serum CPK and LDH are enzymes whose levels can increase significantly when muscle damage or inflammation has occurred. In the control animals, a serum CPK activity of 2200 ± 600 per IU was observed. Fucoidan pretreatment markedly attenuated the CPK activity ($\approx 70\%$ $P = 0.002$, $\approx 60\%$ $P = 0.0320$) compared with the control and heparin groups. No significant changes were observed regarding the serum lactate dehydrogenase activity.

Discussion

Fucoidan, an antithrombotic polysaccharide, can induce ECFC to adopt an angiogenic phenotype *in vitro* [19]. Human ECFC treatment with fucoidan induced a proangiogenic phenotype, involving both an early angiogenic event (proliferation and migration) and a late event (differentiation into vascular cords). This study shows that the beneficial effect of ECFC infusion in a mouse model of hindlimb ischemia is

amplified significantly by fucoidan pretreatment, preventing necrosis. This tissue protection is associated with enhanced neoangiogenesis and reduction of rhabdomyolysis.

The angiogenic process involves ECFC rolling and adhesion to activated endothelium and their extravasation to target sites. Our results provide strong evidence that fucoidan prestimulation enhanced each of these steps, by inducing pro-MMP-9 secretion involved in cell homing [25]. These actions were associated with direct fucoidan interaction with the ECFC surface. Fucoidan bound to the cell membrane and was internalized. We have previously shown that fucoidan stimulation leads to ECFC actin cytoskeleton changes, which may be involved in extravasation [19]. Experiments underway in our laboratory indicate that fucoidan interaction is partially inhibited by blocking antibodies against *P*-selectin, CD11b (α_M) and CD18 (β_2) (30–40%, $P < 0.001$). This is in keeping with the reported high affinity of selectin and integrin $\alpha_M\beta_2$ for a high-molecular-weight commercial fucoidan preparation [26,27]. Because of its spatial structure, fucoidan can mimic the clustering of sulphated, sialylated and fucosylated oligosaccharides on the cell surface and can provide the appropriate structural backbone for selectin binding. Fucoidan interaction with *P*-selectin does not affect the ECFC arrest on activated endothelium in flow conditions, as VLA4 ($\alpha_4\beta_1$) can mediate both tethering and firm adhesion [28]. The possible interaction of $\alpha_M\beta_2$ or other integrins with fucoidan remains to be addressed. We found that fucoidan interacted with displaceable binding sites on ECFC, allowing it to be released in the ischemic tissue environment after displacement by heparan sulphate present in extracellular matrix. There, it can interact with heparin-like growth factors and enhance neoangiogenesis through the transduction of intracellular signals required to induce the angiogenic phenotype. Its effect on signaling pathways is under investigation.

Tissue ischemia is also accompanied by inflammation and fucoidan has been shown to possess anti-inflammatory properties [20]. Parenchymal tissue protection against inflammatory processes and myofibroblastic remodelling have been observed after daily subcutaneous injection of fucoidan in a rat cardiac allograft model [29]. During ischemia, hindlimb muscle destruction causes permeabilization of muscle fibers and the release of their contents into the bloodstream, including muscle enzyme such as CPK. Serum CPK activity will thus reflect the magnitude of acute muscle damage due to ischemia. Bolus administration of fucoidan injected directly in the quadriceps muscle of ischemic mice was shown to induce 70% and 60% reduction in elevated CPK activities compared with, respectively, control and heparin mice. This could account for the anti-necrotic effect observed here, although further investigations are needed. This effect seems to be specific to the polyfucose; intramuscular injection of low-molecular-weight heparin in the same experimental conditions does not protect the muscle from necrosis. This is in keeping with previous studies showing the important role of the fucosyl backbone in fucoidan properties [20]. Finally,

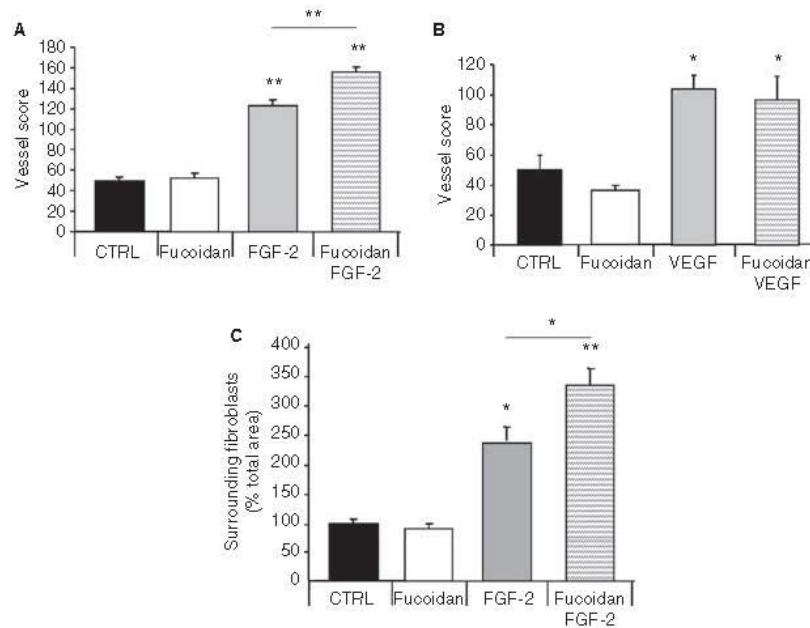


Fig. 5. Fucoidan promotes capillary outward sprouting of rat aorta rings. (A–B) Microvessel sprouts were counted after 9 days of culture in DMEM 10% FCS for untreated control rings (CTRL, ■) or DMEM 10% FCS supplemented with 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fucoidan alone (□), 50 ng mL^{-1} FGF-2 (A), 40 ng mL^{-1} vascular endothelial growth factor (VEGF) (B) in the presence (■) or in the absence (□) of fucoidan. (C) Effect of fucoidan on fibroblast proliferation and migration around rings. Values are expressed as means $\pm$ SEM: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

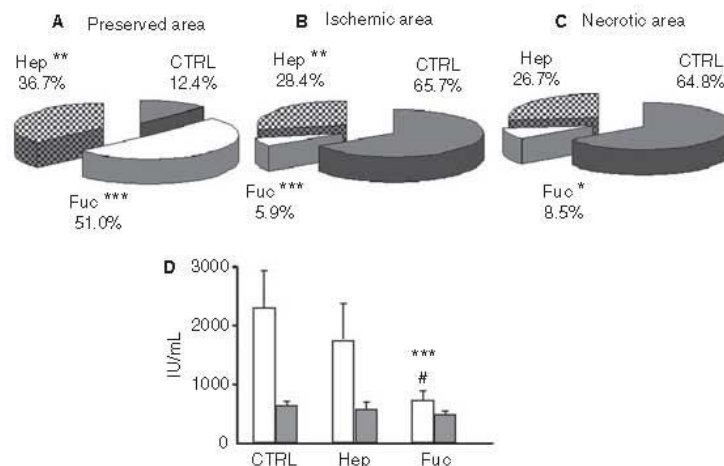


Fig. 6. Fucoidan protects ischemic tissue against necrosis. Quantification of histologically preserved area (A), ischemic infiltrated area (B) and necrotic area (C) types surface 14 days after surgery and intramuscular bolus administration of fucoidan (15 mg kg^{-1} Fuc), heparin (2.5 mg kg^{-1} Hep) or normal saline (CTRL) at day 1 and 2. *** $P < 0.01$ vs. normal saline-injected mice (CTRL). (D) Serum levels of creatine phosphokinase (CPK, □) and lactate dehydrogenase (LDH, ■) among Fucoidan, Heparin and Control groups measured 14 days after surgery.

in the aortic ring model, the angiogenic activity of fucoidan in the presence of FGF-2 stems from its ability to potentiate FGF-2 proangiogenic activity. These results corroborate the

ones observed by Luyt *et al.* [22] showing that fucoidan can induce angiogenesis *in vivo* by modulating the proangiogenic properties of heparin-binding growth factor FGF-2.

However, regeneration of ischemic tissue was only observed when fucoidan was associated with FGF-2 [22] (C. Boisson-Vidal, unpublished data). Therefore, the angiogenic potency of the fucoidan-stimulated ECFC is likely to be attributable to both the beneficial effects of fucoidan on the proangiogenic potential of transplanted ECFC and the influence of fucoidan and ECFC on the ischemic hindlimb.

So far, efforts to stimulate angiogenesis have been limited to the introduction of exogenous growth factors such as FGF-2 or VEGF by means of protein delivery or gene transfer. Our results indicate that a similar response could be obtained with a sulphated polysaccharide. Of particular interest, fucoidan partially restored the adhesion of ECFC to activated endothelium after their treatment with enzymes that remove HSPG located at the cell surface or in the extracellular matrix and that play crucial roles in physiological processes and tissue remodeling [30]. Fucoidan shares several characteristics with HSPG, including sulphate groups and short polysaccharide chains. Owing to its ionic structure, fucoidan also mimics some properties of heparan sulphate and can thus bind proangiogenic heparin-binding growth factors, thereby increasing local concentrations at the cell surface or protecting these factors against enzymatic degradation [20,31]. We cannot rule out the possibility that free and cell-associated fucoidan may bind proangiogenic growth factors and confer a stable, receptor-compatible conformational change upon growth factors, which might increase their affinity for their receptors and improve the

angiogenesis process. Fucoidan can modulate the biological activity of growth factors and disrupt heparan sulphate-growth factor/cytokine complexes, thus releasing chemokines sequestered by heparan sulphate [19,20,32]. Intramuscular fucoidan injection increases plasma levels of SDF-1 and is thus able to promote ECFC mobilization [20,32]. Fucoidan can also act on surrounding cells such as smooth muscle cells, neutrophils and/or macrophages attracted by cytokines released by the ischemic site.

Figure 7 summarizes the multiple roles of fucoidan in therapeutic angiogenesis and in the proangiogenic activity of transplanted ECFC. Fucoidan immobilization on transplanted ECFC allows these cells to home rapidly to ischemic sites, by enhancing ECFC adhesion to activated endothelium and extravasation. These effects involve upregulating the secretion of pro-MMP-9 involved in stem cell homing. Locally released fucoidan binds heparin-like growth factors and regulates their mitogenic activity, leading to increased angiogenesis. Fucoidan can also specifically displace sequestered SDF-1 from its HSPG anchors and thus contribute to its release into the circulation, promoting ECFC mobilization.

In conclusion, our results show that the therapeutic effects of fucoidan-stimulated ECFC are due to both individual and synergistic effects of the two agents. The fucoidan-ECFC tandem warrants further studies as a means of promoting revascularization of ischemic tissues and as a potential candidate for cell therapy in peripheral ischemia.

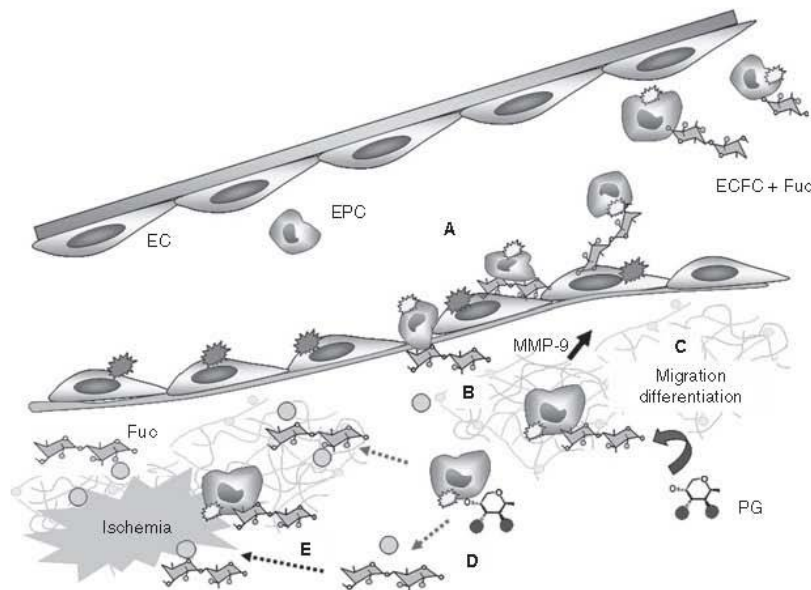


Fig. 7. Proposed mechanisms involved in beneficial effects of fucoidan on endothelial colony-forming cell (ECFC) proangiogenic function in peripheral ischemia. Fucoidan induces a proangiogenic phenotype in ECFC via pro-MMP-9 secretion promoting their adhesion to activated endothelium (A), extravasation (B) and migration (C) in the ECM. Released in the tissue, it binds heparin-like growth factors (PG) (D) and activates their mitogenic activity, leading to increased angiogenesis (E). PG, proteoglycans; EC, endothelial cells; EPC, endothelial progenitor cells; Fuco, fucoidan.

Addendum

G. Sarlon, F. Zemani and C. Boisson-Vidal designed and performed the research, analyzed the data and wrote the manuscript. L. David: rat aortic ring experiments, data collection and image analysis. J. P. Duong Van Huyen: computed-assisted histomorphometric analysis, data collection and interpretation of the results. B. Dizier: *in vivo* experiments, data collection and Doppler analysis. F. Grelac: zymography, data collection and image analysis. S. Collic-Jouault: obtained funding. I. Galy-Fauroux: cell culture supervisor. P. Bruneval: histomorphometric study supervisor. J. Emmerich, A. M. Fischer: critical revisions of the manuscript for important intellectual content.

Acknowledgements

We thank A. Lokajczyk for technical assistance, J. Vilar and J. S. Silvestre for angiographic assays, M. Tible for completing computed-assisted histomorphometric analyses, C. D'Audigier, D. Smadja and the Biochemistry Laboratory of HEGP for evaluating levels of serum muscular enzymes, and C. Martin and all the technicians from the animal facilities of IMTCE. We are indebted to the nursing services of Hôpital des Diaconesses (Paris, France) and Hôpital des Instructions et des Armées de Begin (Saint Mandé, France) for providing umbilical cord blood samples. This work was supported by funds from the French Research Institute for Exploitation of the Sea (IFREMER, GDR-08/5210007) and from Fondation de France (RAF05030KKP). F. Zemani was the recipient of grants from Groupe d'Etude et de Recherches sur l'Hémostase and the French Hematology Society. G. Sarlon was supported by the Société de Chirurgie Vasculaire de Langue Française. CNRS paid the salary of C. Boisson-Vidal. Therapol paid the salary of L. David.

Disclosure of Conflict of Interests

The authors state that they have no conflict of interest.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1. Binding and internalization of fluorescent DTAF-fucoidan in ECFC. (A) Time course of DTAF-fucoidan binding to ECFC membrane realized at 4 °C. (B) Fixation and internalization of DTAF-fucoidan in ECFC after 1 h of incubation at 37 °C observed by fluorescent microscopy. (C) Displacement experiments of ECFC cell-bound DTAF-fucoidan (DTAF Fuc) by 100-fold excess of unlabelled fucoidan and unlabelled-heparin. Values are expressed as means $\pm$ SEM ($n = 15$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. CTRL. Scale bar = 30 μ m.

Data S1. Expanded methods.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

References

- Gray BH, Conte MS, Dake MD, Jaff MR, Kandarpa K, Ramee SR, Rundback J, Waksman R. Atherosclerotic peripheral vascular disease symposium ii: lower-extremity revascularization: state of the art. *Circulation* 2008; **118**: 2864–72.
- Emmerich J. Current state and perspective on medical treatment of critical leg ischemia: gene and cell therapy. *Int J Low Extrem Wounds* 2005; **4**: 234–41.
- Napoli C, Balestrieri A, Ignarro LJ. Therapeutic approaches in vascular repair induced by adult bone marrow cells and circulating progenitor endothelial cells. *Curr Pharm Des* 2007; **13**: 3245–51.
- Pearson JD. Endothelial progenitor cells – hype or hope? *J Thromb Haemost* 2009; **7**: 255–62.
- Kawamoto A, Asahara T. Role of progenitor endothelial cells in cardiovascular disease and upcoming therapies. *Catheter Cardiovasc Interv* 2007; **70**: 477–84.
- Tongers J, Roncalli JG, Losordo DW. Role of endothelial progenitor cells during ischemia-induced vasculogenesis and collateral formation. *Microvasc Res* 2010; **79**: 200–6.
- Critser PJ, Yoder MC. Endothelial colony-forming cell role in neo-angiogenesis and tissue repair. *Curr Opin Organ Transplant* 2010; **15**: 68–72.
- Yoder MC. Defining human endothelial progenitor cells. *J Thromb Haemost* 2009; **7**: 49–52.
- Kahiguchi M, Kondo T, Izawa H, Kobayashi M, Yamamoto K, Shintani S, Numaguchi Y, Naoe T, Takamatsu J, Komori K, Murohara T. Safety and efficacy of autologous progenitor cell transplantation for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia. *Circ J* 2007; **71**: 196–201.
- Miyamoto K, Nishigami K, Nagaya N, Akutsu K, Chiku M, Kamei M, Sona T, Miyata S, Higashi M, Tanaka R, Nakutani T, Nonogi H, Takeshita S. Unblinded pilot study of autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells in patients with thromboangiitis obliterans. *Circulation* 2006; **114**: 2679–84.
- Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG. Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASCII). *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2007; **33**: S1–75.
- Duong Van Huyen JP, Smadja DM, Bruneval P, Gaussem P, Dal-Cortivo L, Julia P, Fiessinger JN, Cavazzana-Calvo M, Aiach M, Emmerich J. Bone marrow-derived mononuclear cell therapy induces distal angiogenesis after local injection in critical leg ischemia. *Mod Pathol* 2008; **21**: 837–46.
- Miller-Kasprzak E, Jagodzinski PP. Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair. *Arch Immunol Ther Exp* 2007; **55**: 247–59.
- Napoli C, William-Ignarro S, Byrns R, Balestrieri ML, Crimi E, Farzati B, Mancini FP, de Nigris F, Matarazzo A, D'Amora M, Abbondanza C, Fiorito C, Giovane A, Florio A, Varricchio E, Palagiano A, Minucci PB, Tecce MF, Giordano A, Pavan A, *et al.* Therapeutic targeting of the stem cell niche in experimental hindlimb ischemia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2008; **5**: 571–9.
- Chavakis E, Urbich C, Dimmeler S. Homing and engraftment of progenitor cells: a prerequisite for cell therapy. *J Mol Cell Cardiol* 2008; **45**: 514–22.
- Hristov M, Weber C. Progenitor cell trafficking in the vascular wall. *J Thromb Haemost* 2009; **7**: 31–4.
- Khoo CP, Pozzilli P, Alison MR. Endothelial progenitor cells and their potential therapeutic applications. *Regen Med* 2008; **6**: 863–76.
- Zemani F, Silvestre JS, Fauvel-Lafeve F, Bruel A, Vilar J, Bieche I, Laurendeau I, Galy-Fauroux I, Fischer AM, Boisson-Vidal C. Ex vivo

- priming of endothelial progenitor cells with SDF-1 before transplantation could increase their proangiogenic potential. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; **28**: 644–50.
- 19 Zemani F, Benisvy D, Galy-Fauroux I, Lokajczyk A, Collic-Jouault S, Uzan G, Fischer AM, Boisson-Vidal C. Low-molecular-weight fucoidan enhances the proangiogenic phenotype of endothelial progenitor cells. *Biochem Pharmacol* 2005; **70**: 1167–75.
- 20 Boisson-Vidal C, Zemani F, Caligiuri G, Galy-Fauroux I, Collic-Jouault S, Helley D, Fischer A-M. Neoangiogenesis induced by progenitor endothelial cells: effect of fucoidan from marine algae. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2007; **5**: 67–79.
- 21 Senni K, Gueniche F, Foucault-Bertaud A, Igondjo-Tchen S, Fioretti F, Collic-Jouault S, Durand P, Guezennec J, Godeau G, Letourneur D. Fucoidan a sulfated polysaccharide from brown algae is a potent modulator of connective tissue proteolysis. *Arch Biochem Biophys* 2006; **445**: 56–64.
- 22 Luyt CE, Meddahi-Pellé A, Ho-Tin-Noe B, Collic-Jouault S, Guezennec J, Louedec L, Prats H, Jacob MP. Low-molecular-weight fucoidan promotes therapeutic revascularization in a rat model of critical hindlimb ischemia. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; **305**: 24–30.
- 23 Shireman P, Quinones M. Differential necrosis despite similar perfusion in mouse strains after ischemia. *J Surg Res* 2005; **129**: 242–50.
- 24 Zhu WH, Nicosia RF. The thin prep rat aortic ring assay: a modified method for the characterization of angiogenesis in whole mounts. *Angiogenesis* 2002; **5**: 81–6.
- 25 Huang PH, Chen YH, Wang CH, Chen JS, Tsai HY, Lin FY, Lo WY, Wu TC, Sata M, Chen JW, Lin SJ. Matrix metalloproteinase-9 is essential for ischemia-induced neovascularization by modulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; **29**: 1179–84.
- 26 Hidalgo A., Peired AJ, Weiss LA, Katayama Y, Frenette PS. The integrin α M β 2 anchors hematopoietic progenitors in the bone marrow during enforced mobilization. *Blood* 2004; **104**: 993–1001.
- 27 Bachelet L, Bertholon I, Lavigne D, Vassy R, Jandrot-Perrus M, Chaubet F, Letourneur D. Affinity of low-molecular-weight fucoidan for P-selectin triggers its binding to activated human platelets. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1790**: 141–6.
- 28 Alon R, Kassner PD, Carr MW, Finger EB, Hemler ME, Springer TA. The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol* 1995; **128**: 1243–53.
- 29 Alkhatib B, Freguin-Bouilland C, Lallemand F, Henry JP, Litzler PY, Marie JP, Richard V, Thuillez C, Plissonnier D. Low-molecular-weight fucan prevents transplant coronaropathy in rat cardiac allograft model. *Transpl Immunol* 2006; **16**: 14–9.
- 30 Shriver Z, Raguram S, Sasisekharan R. Glycomics: a pathway to a class of new and improved therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2004; **3**: 863–73.
- 31 Lake AC, Vassy R, Di Benedetto M, Lavigne D, Le Visage C, Perret GY, Letourneur D. Low-molecular-weight fucoidan increases VEGF165-induced endothelial cell migration by enhancing VEGF165 binding to VEGFR-2 and NRP1. *J Biol Chem* 2006; **281**: 37844–52.
- 32 Sweeney EA, Lortat-Jacob H, Priestley GV, Nakamoto B, Papayanopoulou T. Sulfated polysaccharides increase plasma levels of SDF-1 in monkeys and mice: involvement in mobilization of stem/progenitor cells. *Blood* 2003; **99**: 44–51.

REFERENCES

1. Tendera M, Aboyans V, Bartelink ML, Baumgartner I, Clement D, Collet JP, et al. ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases: Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries: the Task Force on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Artery Diseases of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2011 Nov;32(22):2851-906.
2. Houssin D. Surveillance épidémiologique des causes de décès en France. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*. 2007;35-36:305-16.
3. Sabouret P, Cacoub P, Dallongeville J, Krempf M, Mas JL, Pinel JF, et al. REACH: international prospective observational registry in patients at risk of atherothrombotic events. Results for the French arm at baseline and one year. *Arch Cardiovasc Dis*. 2008 Feb;101(2):81-8.
4. Smolderen KG, Wang K, de Pouvourville G, Bruggenjurgen B, Rother J, Zeymer U, et al. Two-year vascular hospitalisation rates and associated costs in patients at risk of atherothrombosis in France and Germany: highest burden for peripheral arterial disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2012 Feb;43(2):198-207.
5. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med*. 1976 Aug 12;295(7):369-77.
6. Libby P, Hansson GK. Involvement of the immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions. *Lab Invest*. 1991 Jan;64(1):5-15.
7. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999 Jan 14;340(2):115-26.
8. Libby P. The active roles of cells of the blood vessel wall in health and disease. *Mol Aspects Med*. 1987;9(6):499-567.
9. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995 Sep 1;92(5):1355-74.
10. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1987 May 28;316(22):1371-5.
11. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation*. 1995 Jun 1;91(11):2844-50.
12. Baudin B. Données épidémiologiques des maladies cardiovasculaires et prise en charge des accidents cardiovasculaires. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2009;409:27-39.
13. HAS. Prise en charge des patients atteints d'hypertension artérielle essentielle. 2005.
14. Baigent C, Blackwell L, Collins R, Emberson J, Godwin J, Peto R, et al. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet*. 2009 May 30;373(9678):1849-60.
15. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet*. 1996 Nov 16;348(9038):1329-39.
16. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2002 Jul 6;360(9326):7-22.
17. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. 2000 Jan 20;342(3):145-53.
18. Beyot Y. Epidémiologie des accidents vasculaires cérébraux. : Médecine/Sciences; 2009.
19. Touze E. Natural history of asymptomatic carotid artery stenosis. *Rev Neurol (Paris)*. 2008 Oct;164(10):793-800.
20. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N Engl J Med*. 1991 Aug 15;325(7):445-53.

21. Barnett HJ, Taylor DW, Eliasziw M, Fox AJ, Ferguson GG, Haynes RB, et al. Benefit of carotid endarterectomy in patients with symptomatic moderate or severe stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N Engl J Med*. 1998 Nov 12;339(20):1415-25.
22. MRC European Carotid Surgery Trial: interim results for symptomatic patients with severe (70-99%) or with mild (0-29%) carotid stenosis. European Carotid Surgery Trialists' Collaborative Group. *Lancet*. 1991 May 25;337(8752):1235-43.
23. Endarterectomy for asymptomatic carotid artery stenosis. Executive Committee for the Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study. *JAMA*. 1995 May 10;273(18):1421-8.
24. Halliday A, Mansfield A, Marro J, Peto C, Peto R, Potter J, et al. Prevention of disabling and fatal strokes by successful carotid endarterectomy in patients without recent neurological symptoms: randomised controlled trial. *Lancet*. 2004 May 8;363(9420):1491-502.
25. Halliday A, Harrison M, Hayter E, Kong X, Mansfield A, Marro J, et al. 10-year stroke prevention after successful carotid endarterectomy for asymptomatic stenosis (ACST-1): a multicentre randomised trial. *Lancet*. 2010 Sep 25;376(9746):1074-84.
26. Nadareishvili ZG, Rothwell PM, Beletsky V, Pagniello A, Norris JW. Long-term risk of stroke and other vascular events in patients with asymptomatic carotid artery stenosis. *Arch Neurol*. 2002 Jul;59(7):1162-6.
27. Marquardt L, Geraghty OC, Mehta Z, Rothwell PM. Low risk of ipsilateral stroke in patients with asymptomatic carotid stenosis on best medical treatment: a prospective, population-based study. *Stroke*. 2010 Jan;41(1):e11-7.
28. Rothwell PM, Eliasziw M, Gutnikov SA, Fox AJ, Taylor DW, Mayberg MR, et al. Analysis of pooled data from the randomised controlled trials of endarterectomy for symptomatic carotid stenosis. *Lancet*. 2003 Jan 11;361(9352):107-16.
29. HAS. Stratégie de prise en charge des sténoses de la bifurcation carotidienne - Indications des techniques de revascularisation. 2007.
30. Abbott AL. Medical (nonsurgical) intervention alone is now best for prevention of stroke associated with asymptomatic severe carotid stenosis: results of a systematic review and analysis. *Stroke*. 2009 Oct;40(10):e573-83.
31. Schneider PA, Naylor AR. Transatlantic debate. Asymptomatic carotid artery stenosis--medical therapy alone versus medical therapy plus carotid endarterectomy or stenting. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2010 Aug;40(2):274-81.
32. Schneider PA, Naylor AR. Asymptomatic carotid artery stenosis--medical therapy alone versus medical therapy plus carotid endarterectomy or stenting. *J Vasc Surg*. 2010 Aug;52(2):499-507.
33. Muller JE, Tofler GH, Stone PH. Circadian variation and triggers of onset of acute cardiovascular disease. *Circulation*. 1989 Apr;79(4):733-43.
34. Muller JE, Abela GS, Nesto RW, Tofler GH. Triggers, acute risk factors and vulnerable plaques: the lexicon of a new frontier. *J Am Coll Cardiol*. 1994 Mar 1;23(3):809-13.
35. Sarlon-Bartoli G, Boudes A, Buffat C, Bartoli MA, Piercecchi-Marti MD, Sarlon E, et al. Circulating lipoprotein-associated phospholipase A2 in high-grade carotid stenosis: a new biomarker for predicting unstable plaque. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2012 Feb;43(2):154-9.
36. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation*. 2003 Oct 7;108(14):1664-72.
37. Redgrave JN, Lovett JK, Gallagher PJ, Rothwell PM. Histological assessment of 526 symptomatic carotid plaques in relation to the nature and timing of ischemic symptoms: the Oxford plaque study. *Circulation*. 2006 May 16;113(19):2320-8.
38. Heider P, Pfaffle N, Pelisek J, Wildgruber M, Poppert H, Rudelius M, et al. Is serum pregnancy-associated plasma protein A really a potential marker of atherosclerotic carotid plaque stability? *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2010 Jun;39(6):668-75.
39. Pelisek J, Rudelius M, Zepper P, Poppert H, Reeps C, Schuster T, et al. Multiple biological predictors for vulnerable carotid lesions. *Cerebrovasc Dis*. 2009;28(6):601-10.

40. Sugioka K, Naruko T, Hozumi T, Nakagawa M, Kitabayashi C, Ikura Y, et al. Elevated levels of neopterin are associated with carotid plaques with complex morphology in patients with stable angina pectoris. *Atherosclerosis*. 2010 Feb;208(2):524-30.
41. Papas TT, Maltezos CK, Papanas N, Kopadis G, Marakis J, Maltezos E, et al. High-sensitivity CRP is correlated with neurologic symptoms and plaque instability in patients with severe stenosis of the carotid bifurcation. *Vasc Endovascular Surg*. 2008 Jun-Jul;42(3):249-55.
42. Krupinski J, Turu MM, Font MA, Ahmed N, Sullivan M, Rubio F, et al. Increased tissue factor, MMP-8, and D-dimer expression in diabetic patients with unstable advanced carotid atherosclerosis. *Vasc Health Risk Manag*. 2007;3(4):405-12.
43. Alvarez B, Ruiz C, Chacon P, Alvarez-Sabin J, Matas M. Serum values of metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 as related to unstable plaque and inflammatory cells in patients with greater than 70% carotid artery stenosis. *J Vasc Surg*. 2004 Sep;40(3):469-75.
44. Alvarez Garcia B, Ruiz C, Chacon P, Sabin JA, Matas M. High-sensitivity C-reactive protein in high-grade carotid stenosis: risk marker for unstable carotid plaque. *J Vasc Surg*. 2003 Nov;38(5):1018-24.
45. ten Kate GL, Sijbrands EJ, Staub D, Coll B, ten Cate FJ, Feinstein SB, et al. Noninvasive imaging of the vulnerable atherosclerotic plaque. *Curr Probl Cardiol*. 2010 Nov;35(11):556-91.
46. Geroulakos G, Domjan J, Nicolaides A, Stevens J, Labropoulos N, Ramaswami G, et al. Ultrasonic carotid artery plaque structure and the risk of cerebral infarction on computed tomography. *J Vasc Surg*. 1994 Aug;20(2):263-6.
47. El-Barghouty NM, Levine T, Ladvá S, Flanagan A, Nicolaides A. Histological verification of computerised carotid plaque characterisation. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1996 May;11(4):414-6.
48. Ruiz-Ares G, Fuentes B, Martinez-Sanchez P, Martinez-Martinez M, Diez-Tejedor E. Utility of the assessment of echogenicity in the identification of symptomatic carotid artery atheroma plaques in ischemic stroke patients. *Cerebrovasc Dis*. 2011;32(6):535-41.
49. Denzel C, Fellner F, Wutke R, Bazler K, Muller KM, Lang W. Ultrasonographic analysis of arteriosclerotic plaques in the internal carotid artery. *Eur J Ultrasound*. 2003 Feb;16(3):161-7.
50. Faggioli GL, Pini R, Mauro R, Pasquinelli G, Fittipaldi S, Freyrie A, et al. Identification of carotid 'vulnerable plaque' by contrast-enhanced ultrasonography: correlation with plaque histology, symptoms and cerebral computed tomography. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2011 Feb;41(2):238-48.
51. Touze E, Toussaint JF, Coste J, Schmitt E, Bonneville F, Vandermarcq P, et al. Reproducibility of high-resolution MRI for the identification and the quantification of carotid atherosclerotic plaque components: consequences for prognosis studies and therapeutic trials. *Stroke*. 2007 Jun;38(6):1812-9.
52. Takaya N, Yuan C, Chu B, Saam T, Underhill H, Cai J, et al. Association between carotid plaque characteristics and subsequent ischemic cerebrovascular events: a prospective assessment with MRI--initial results. *Stroke*. 2006 Mar;37(3):818-23.
53. Oppenheim C, Naggara O, Touze E, Lacour JC, Schmitt E, Bonneville F, et al. High-resolution MR imaging of the cervical arterial wall: what the radiologist needs to know. *Radiographics*. 2009 Sep-Oct;29(5):1413-31.
54. Figueroa AL, Subramanian SS, Cury RC, Truong QA, Gardecki JA, Tearney GJ, et al. Distribution of inflammation within carotid atherosclerotic plaques with high-risk morphological features: a comparison between positron emission tomography activity, plaque morphology, and histopathology. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2012 Jan;5(1):69-77.
55. Sabatier F, Lacroix R, Leroyer AS, Cointe S, Dignat-George F. [Cell-derived microparticles: key players at the crossroad between inflammation and thrombosis]. *Transfus Clin Biol*. 2011 Apr;18(2):62-9.
56. Morel O, Morel N, Hugel B, Jesel L, Vinzio S, Goichot B, et al. [The significance of circulating microparticles in physiology, inflammatory and thrombotic diseases]. *Rev Med Interne*. 2005 Oct;26(10):791-801.
57. Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension*. 2006 Aug;48(2):180-6.

58. Flaumenhaft R, Dilks JR, Richardson J, Alden E, Patel-Hett SR, Battinelli E, et al. Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. *Blood*. 2009 Jan 29;113(5):1112-21.
59. Angelillo-Scherrer A. Leukocyte-derived microparticles in vascular homeostasis. *Circ Res*. 2012 Jan 20;110(2):356-69.
60. Leroyer AS, Isobe H, Leseche G, Castier Y, Wassef M, Mallat Z, et al. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Feb 20;49(7):772-7.
61. Rautou PE, Leroyer AS, Ramkhalawon B, Devue C, Duflaut D, Vion AC, et al. Microparticles from human atherosclerotic plaques promote endothelial ICAM-1-dependent monocyte adhesion and transendothelial migration. *Circ Res*. 2011 Feb 4;108(3):335-43.
62. Distler JH, Huber LC, Hueber AJ, Reich CF, 3rd, Gay S, Distler O, et al. The release of microparticles by apoptotic cells and their effects on macrophages. *Apoptosis*. 2005 Aug;10(4):731-41.
63. Huber LC, Jungel A, Distler JH, Moritz F, Gay RE, Michel BA, et al. The role of membrane lipids in the induction of macrophage apoptosis by microparticles. *Apoptosis*. 2007 Feb;12(2):363-74.
64. 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 Oct 14;52(16):1302-11.
65. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med*. 2008 Aug 28;359(9):938-49.
66. Lacroix R, Judicone C, Poncelet P, Robert S, Arnaud L, Sampol J, et al. Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. *J Thromb Haemost*. 2012 Mar;10(3):437-46.
67. Balducci E. Microparticules circulantes, acteurs et marqueurs émergents en pathologie humaine. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2012;433.
68. Morel O, Morel N, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. Microparticles: a critical component in the nexus between inflammation, immunity, and thrombosis. *Semin Immunopathol*. 2011 Sep;33(5):469-86.
69. Nomura S, Kanazawa S, Fukuhara S. Effects of efonidipine on platelet and monocyte activation markers in hypertensive patients with and without type 2 diabetes mellitus. *J Hum Hypertens*. 2002 Aug;16(8):539-47.
70. Holschermann H, Terhalle HM, Zakel U, Maus U, Parviz B, Tillmanns H, et al. Monocyte tissue factor expression is enhanced in women who smoke and use oral contraceptives. *Thromb Haemost*. 1999 Dec;82(6):1614-20.
71. Churg A, Wang X, Wang RD, Meixner SC, Prydzial EL, Wright JL. Alpha1-antitrypsin suppresses TNF-alpha and MMP-12 production by cigarette smoke-stimulated macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007 Aug;37(2):144-51.
72. Li M, Yu D, Williams KJ, Liu ML. Tobacco smoke induces the generation of procoagulant microvesicles from human monocytes/macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010 Sep;30(9):1818-24.
73. Nomura S. Dynamic role of microparticles in type 2 diabetes mellitus. *Curr Diabetes Rev*. 2009 Nov;5(4):245-51.
74. Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Nishikawa M, Iwasaka T. Effects of losartan and simvastatin on monocyte-derived microparticles in hypertensive patients with and without type 2 diabetes mellitus. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2004 Apr;10(2):133-41.
75. Chironi G, Simon A, Hugel B, Del Pino M, Gariepy J, Freyssinet JM, et al. Circulating leukocyte-derived microparticles predict subclinical atherosclerosis burden in asymptomatic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Dec;26(12):2775-80.
76. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. 2000 Feb 29;101(8):841-3.

77. Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Kosiol S, Nickenig G. Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Jan;26(1):112-6.
78. Epps KC, Wilensky RL. Lp-PLA(2)- a novel risk factor for high-risk coronary and carotid artery disease. *J Intern Med.* 2011 Jan;269(1):94-106.
79. Stafforini DM, McIntyre TM, Carter ME, Prescott SM. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Association with lipoprotein particles and role in the degradation of platelet-activating factor. *J Biol Chem.* 1987 Mar 25;262(9):4215-22.
80. Hakkinen T, Luoma JS, Hiltunen MO, Macphee CH, Milliner KJ, Patel L, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A(2), platelet-activating factor acetylhydrolase, is expressed by macrophages in human and rabbit atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Dec;19(12):2909-17.
81. Benitez S, Camacho M, Arcelus R, Vila L, Bancells C, Ordonez-Llanos J, et al. Increased lysophosphatidylcholine and non-esterified fatty acid content in LDL induces chemokine release in endothelial cells. Relationship with electronegative LDL. *Atherosclerosis.* 2004 Dec;177(2):299-305.
82. Quinn MT, Parthasarathy S, Steinberg D. Lysophosphatidylcholine: a chemotactic factor for human monocytes and its potential role in atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Apr;85(8):2805-9.
83. Shi Y, Zhang P, Zhang L, Osman H, Mohler ER, 3rd, Macphee C, et al. Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in leukocyte activation and inflammatory responses. *Atherosclerosis.* 2007 Mar;191(1):54-62.
84. Kolodgie FD, Burke AP, Skorija KS, Ladich E, Kutys R, Makuria AT, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 protein expression in the natural progression of human coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Nov;26(11):2523-9.
85. Mannheim D, Herrmann J, Versari D, Gossel M, Meyer FB, McConnell JP, et al. Enhanced expression of Lp-PLA2 and lysophosphatidylcholine in symptomatic carotid atherosclerotic plaques. *Stroke.* 2008 May;39(5):1448-55.
86. Persson M, Nilsson JA, Nelson JJ, Hedblad B, Berglund G. The epidemiology of Lp-PLA(2): distribution and correlation with cardiovascular risk factors in a population-based cohort. *Atherosclerosis.* 2007 Feb;190(2):388-96.
87. Brilakis ES, Khera A, McGuire DK, See R, Banerjee S, Murphy SA, et al. Influence of race and sex on lipoprotein-associated phospholipase A2 levels: observations from the Dallas Heart Study. *Atherosclerosis.* 2008 Jul;199(1):110-5.
88. Koenig W, Khuseynova N, Lowel H, Trischler G, Meisinger C. Lipoprotein-associated phospholipase A2 adds to risk prediction of incident coronary events by C-reactive protein in apparently healthy middle-aged men from the general population: results from the 14-year follow-up of a large cohort from southern Germany. *Circulation.* 2004 Oct 5;110(14):1903-8.
89. Koenig W, Twardella D, Brenner H, Rothenbacher D. Lipoprotein-associated phospholipase A2 predicts future cardiovascular events in patients with coronary heart disease independently of traditional risk factors, markers of inflammation, renal function, and hemodynamic stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Jul;26(7):1586-93.
90. Davidson MH, Corson MA, Alberts MJ, Anderson JL, Gorelick PB, Jones PH, et al. Consensus panel recommendation for incorporating lipoprotein-associated phospholipase A2 testing into cardiovascular disease risk assessment guidelines. *Am J Cardiol.* 2008 Jun 16;101(12A):51F-7F.
91. Caslake MJ, Packard CJ, Suckling KE, Holmes SD, Chamberlain P, Macphee CH. Lipoprotein-associated phospholipase A(2), platelet-activating factor acetylhydrolase: a potential new risk factor for coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2000 Jun;150(2):413-9.
92. Packard CJ, O'Reilly DS, Caslake MJ, McMahon AD, Ford I, Cooney J, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med.* 2000 Oct 19;343(16):1148-55.
93. Oei HH, van der Meer IM, Hofman A, Koudstaal PJ, Stijnen T, Breteler MM, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is associated with risk of coronary heart disease and ischemic stroke: the Rotterdam Study. *Circulation.* 2005 Feb 8;111(5):570-5.

94. Anderson JL. Lipoprotein-associated phospholipase A2: an independent predictor of coronary artery disease events in primary and secondary prevention. *Am J Cardiol.* 2008 Jun 16;101(12A):23F-33F.
95. Persson M, Berglund G, Nelson JJ, Hedblad B. Lp-PLA2 activity and mass are associated with increased incidence of ischemic stroke: a population-based cohort study from Malmo, Sweden. *Atherosclerosis.* 2008 Sep;200(1):191-8.
96. Tsimikas S, Willeit J, Knoflach M, Mayr M, Egger G, Notdurfter M, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity, ferritin levels, metabolic syndrome, and 10-year cardiovascular and non-cardiovascular mortality: results from the Bruneck study. *Eur Heart J.* 2009 Jan;30(1):107-15.
97. Kardys I, Oei HH, Hofman A, Oudkerk M, Witteman JC. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and coronary calcification. The Rotterdam Coronary Calcification Study. *Atherosclerosis.* 2007 Apr;191(2):377-83.
98. Campo S, Sardo MA, Bitto A, Bonaiuto A, Trimarchi G, Bonaiuto M, et al. Platelet-activating factor acetylhydrolase is not associated with carotid intima-media thickness in hypercholesterolemic Sicilian individuals. *Clin Chem.* 2004 Nov;50(11):2077-82.
99. Sabatine MS, Morrow DA, O'Donoghue M, Jablonski KA, Rice MM, Solomon S, et al. Prognostic utility of lipoprotein-associated phospholipase A2 for cardiovascular outcomes in patients with stable coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Nov;27(11):2463-9.
100. Oldgren J, James SK, Siegbahn A, Wallentin L. Lipoprotein-associated phospholipase A2 does not predict mortality or new ischaemic events in acute coronary syndrome patients. *Eur Heart J.* 2007 Mar;28(6):699-704.
101. O'Donoghue M, Morrow DA, Sabatine MS, Murphy SA, McCabe CH, Cannon CP, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and its association with cardiovascular outcomes in patients with acute coronary syndromes in the PROVE IT-TIMI 22 (PRavastatin Or atorVastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis In Myocardial Infarction) trial. *Circulation.* 2006 Apr 11;113(14):1745-52.
102. Elkind MS, Tai W, Coates K, Paik MC, Sacco RL. Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity and risk of recurrent stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2009;27(1):42-50.
103. Cucchiara BL, Messe SR, Sansing L, MacKenzie L, Taylor RA, Pacelli J, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and C-reactive protein for risk-stratification of patients with TIA. *Stroke.* 2009 Jul;40(7):2332-6.
104. Madjid M, Ali M, Willerson JT. Lipoprotein-associated phospholipase A2 as a novel risk marker for cardiovascular disease: a systematic review of the literature. *Tex Heart Inst J.* 2010;37(1):25-39.
105. Mallat Z, Lambeau G, Tedgui A. Lipoprotein-associated and secreted phospholipases A(2) in cardiovascular disease: roles as biological effectors and biomarkers. *Circulation.* 2010 Nov 23;122(21):2183-200.
106. Thompson A, Gao P, Orfei L, Watson S, Di Angelantonio E, Kaptoge S, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A(2) and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies. *Lancet.* 2010 May 1;375(9725):1536-44.
107. Blackie JA, Bloomer JC, Brown MJ, Cheng HY, Hammond B, Hickey DM, et al. The identification of clinical candidate SB-480848: a potent inhibitor of lipoprotein-associated phospholipase A2. *Bioorg Med Chem Lett.* 2003 Mar 24;13(6):1067-70.
108. Second European Consensus Document on chronic critical leg ischemia. *Circulation.* 1991 Nov;84(4 Suppl):IV1-26.
109. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG, et al. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2007;33 Suppl 1:S1-75.
110. HAS. Prise en charge de l'artériopathie chronique oblitérante athéroscléreuse des membres inférieurs (indications médicamenteuses, de revascularisation et de rééducation). 2006.
111. Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzner NR, Bakal CW, Creager MA, Halperin JL, et al. ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society

- for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation. *Circulation*. 2006 Mar 21;113(11):e463-654.
112. Bhatt DL, Steg PG, Ohman EM, Hirsch AT, Ikeda Y, Mas JL, et al. International prevalence, recognition, and treatment of cardiovascular risk factors in outpatients with atherothrombosis. *JAMA*. 2006 Jan 11;295(2):180-9.
 113. Dormandy JA, Rutherford RB. Management of peripheral arterial disease (PAD). TASC Working Group. TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC). *J Vasc Surg*. 2000 Jan;31(1 Pt 2):S1-S296.
 114. Vraux H, Bertoncello N. Subintimal angioplasty of tibial vessel occlusions in critical limb ischaemia: a good opportunity? *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2006 Dec;32(6):663-7.
 115. Slovut DP, Sullivan TM. Critical limb ischemia: medical and surgical management. *Vasc Med*. 2008 Aug;13(3):281-91.
 116. Kranke P, Bennett MH, Martyn-St James M, Schnabel A, Debus SE. Hyperbaric oxygen therapy for chronic wounds. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;4:CD004123.
 117. Flamme I, Frolich T, Risau W. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol*. 1997 Nov;173(2):206-10.
 118. Folkman J. Angiogenesis: initiation and control. *Ann N Y Acad Sci*. 1982;401:212-27.
 119. 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 Feb 14;275(5302):964-7.
 120. Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*. 1998 Jul 15;92(2):362-7.
 121. Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhauser M, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*. 2004;22(3):377-84.
 122. Al-Khalidi A, Al-Sabti H, Galipeau J, Lachapelle K. Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model. *Ann Thorac Surg*. 2003 Jan;75(1):204-9.
 123. Reyes M, Verfaillie CM. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2001 Jun;938:231-3; discussion 3-5.
 124. Miranville A, Heeschen C, Sengenes C, Curat CA, Busse R, Bouloumie A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*. 2004 Jul 20;110(3):349-55.
 125. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003 Sep 19;114(6):763-76.
 126. Ingram DA, Mead LE, Moore DB, Woodard W, Fenoglio A, Yoder MC. Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood*. 2005 Apr 1;105(7):2783-6.
 127. Leri A, Kajstura J. Endothelial progenitor cells: unexpected disclosures. *Circ Res*. 2005 Aug 19;97(4):299-301.
 128. 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 Feb 1;95(3):952-8.
 129. Ceradini DJ, Gurtner GC. Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue. *Trends Cardiovasc Med*. 2005 Feb;15(2):57-63.
 130. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J*. 1999 Jul 15;18(14):3964-72.
 131. 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 Jun;938:36-45; discussion -7.

132. 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 Aug 15;102(4):1340-6.
133. Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, Landry AL, Hertel B, Duckert T, et al. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood*. 2004 Feb 1;103(3):921-6.
134. Lapidot T. Mechanism of human stem cell migration and repopulation of NOD/SCID and B2mnull NOD/SCID mice. The role of SDF-1/CXCR4 interactions. *Ann N Y Acad Sci*. 2001 Jun;938:83-95.
135. 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 Jun 16;197(12):1755-65.
136. Tamura M, Unno K, Yonezawa S, Hattori K, Nakashima E, Tsukada H, et al. In vivo trafficking of endothelial progenitor cells their possible involvement in the tumor neovascularization. *Life Sci*. 2004 Jun 18;75(5):575-84.
137. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*. 2004 Aug 20;95(4):343-53.
138. 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 Nov 28;93(11):1023-5.
139. 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 neovasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Feb;24(2):288-93.
140. Krenning G, Moonen JR, van Luyn MJ, Harmsen MC. Generating new blood flow: integrating developmental biology and tissue engineering. *Trends Cardiovasc Med*. 2008 Nov;18(8):312-23.
141. 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 Apr 1;103(7):2577-84.
142. Timmermans F, Plum J, Yoder MC, Ingram DA, Vandekerckhove B, Case J. Endothelial progenitor cells: identity defined? *J Cell Mol Med*. 2009 Jan;13(1):87-102.
143. Kirton JP, Xu Q. Endothelial precursors in vascular repair. *Microvasc Res*. 2010 May;79(3):193-9.
144. Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T, et al. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet*. 1996 Aug 10;348(9024):370-4.
145. Nikol S, Baumgartner I, Van Belle E, Diehm C, Visona A, Capogrossi MC, et al. Therapeutic angiogenesis with intramuscular NV1FGF improves amputation-free survival in patients with critical limb ischemia. *Mol Ther*. 2008 May;16(5):972-8.
146. Belch J, Hiatt WR, Baumgartner I, Driver IV, Nikol S, Norgren L, et al. Effect of fibroblast growth factor NV1FGF on amputation and death: a randomised placebo-controlled trial of gene therapy in critical limb ischaemia. *Lancet*. 2011 Jun 4;377(9781):1929-37.
147. 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 Mar 28;97(7):3422-7.
148. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002 Aug 10;360(9331):427-35.
149. Fadini GP, Agostini C, Avogaro A. Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease meta-analysis and systematic review of the literature. *Atherosclerosis*. 2010 Mar;209(1):10-7.
150. Moazzami K, Majdzadeh R, Nedjat S. Local intramuscular transplantation of autologous mononuclear cells for critical lower limb ischaemia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011(12):CD008347.
151. Chang EI, Loh SA, Ceradini DJ, Lin SE, Bastidas N, Aarabi S, et al. Age decreases endothelial progenitor cell recruitment through decreases in hypoxia-inducible factor 1alpha stabilization during ischemia. *Circulation*. 2007 Dec 11;116(24):2818-29.

152. Heeschen C, Lehmann R, Honold J, Assmus B, Aicher A, Walter DH, et al. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation*. 2004 Apr 6;109(13):1615-22.
153. Couffinhal T, Silver M, Zheng LP, Kearney M, Witzenbichler B, Isner JM. Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol*. 1998 Jun;152(6):1667-79.
154. 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 Jun;117(6):1527-37.
155. Hamada Y, Gonda K, Takeda M, Sato A, Watanabe M, Yambe T, et al. In vivo imaging of the molecular distribution of the VEGF receptor during angiogenesis in a mouse model of ischemia. *Blood*. 2011 Sep 29;118(13):e93-e100.
156. 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 Apr;28(4):644-50.
157. Sarlon G, Zemani F, David L, Duong Van Huyen JP, Dizier B, Grelac F, et al. Therapeutic effect of fucoidan-stimulated endothelial colony-forming cells in peripheral ischemia. *J Thromb Haemost*. 2012 Jan;10(1):38-48.
158. Zemani F, Benisvy D, Galy-Fauroux I, Lokajczyk A, Collic-Jouault S, Uzan G, et al. Low-molecular-weight fucoidan enhances the proangiogenic phenotype of endothelial progenitor cells. *Biochem Pharmacol*. 2005 Oct 15;70(8):1167-75.
159. Maiese K, Chong ZZ, Li F, Shang YC. Erythropoietin: elucidating new cellular targets that broaden therapeutic strategies. *Prog Neurobiol*. 2008 Jun;85(2):194-213.
160. Paschos N, Lykissas MG, Beris AE. The role of erythropoietin as an inhibitor of tissue ischemia. *Int J Biol Sci*. 2008;4(3):161-8.
161. Velly L, Pellegrini L, Guillet B, Bruder N, Pisano P. Erythropoietin 2nd cerebral protection after acute injuries: a double-edged sword? *Pharmacol Ther*. 2010 Dec;128(3):445-59.
162. Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dell'Era P, et al. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood*. 1999 Apr 15;93(8):2627-36.
163. Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, Sfacteria A, Ghezzi P, Fratelli M, et al. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Oct 12;101(41):14907-12.
164. Fiordaliso F, Chimenti S, Staszewsky L, Bai A, Carlo E, Cuccovillo I, et al. A nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Feb 8;102(6):2046-51.
165. Arcasoy MO. The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin. *Br J Haematol*. 2008 Apr;141(1):14-31.
166. Robert S, Lacroix R, Poncelet P, Harhour K, Bouriche T, Judicone C, et al. High-sensitivity flow cytometry provides access to standardized measurement of small-size microparticles--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Apr;32(4):1054-8.
167. Shimada K. Immune system and atherosclerotic disease: heterogeneity of leukocyte subsets participating in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ J*. 2009 Jun;73(6):994-1001.
168. Hou X, Wu X, Ma J, Lv X, Jin X. Erythropoietin augments the efficacy of therapeutic angiogenesis induced by allogenic bone marrow stromal cells in a rat model of limb ischemia. *Mol Biol Rep*. 2010 Mar;37(3):1467-75.
169. Zhang D, Zhang F, Zhang Y, Gao X, Li C, Ma W, et al. Erythropoietin enhances the angiogenic potency of autologous bone marrow stromal cells in a rat model of myocardial infarction. *Cardiology*. 2007;108(4):228-36.
170. Janmaat ML, Heerkens JL, de Bruin AM, Klous A, de Waard V, de Vries CJ. Erythropoietin accelerates smooth muscle cell-rich vascular lesion formation in mice through endothelial cell activation involving enhanced PDGF-BB release. *Blood*. 2010 Feb 18;115(7):1453-60.

171. Brines M, Cerami A. Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 2005 Jun;6(6):484-94.
172. Imamura R, Okumi M, Isaka Y, Ichimaru N, Moriyama T, Imai E, et al. Carbamylated erythropoietin improves angiogenesis and protects the kidneys from ischemia-reperfusion injury. *Cell Transplant.* 2008;17(1-2):135-41.
173. Chavez-MacGregor M, Zhao H, Fang S, Srokowski TP, Hortobagyi GN, Giordano SH. Complications associated with erythropoietin-stimulating agents in patients with metastatic breast cancer: a Surveillance, Epidemiology, and End Results-Medicare study. *Cancer.* 2011 Aug 15;117(16):3641-9.