

Effets des contraintes mécaniques cycliques sur la génération de thrombine à la surface des cellules musculaires lisses de rat

Xianquing Mao

▶ **To cite this version:**

Xianquing Mao. Effets des contraintes mécaniques cycliques sur la génération de thrombine à la surface des cellules musculaires lisses de rat. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0003 . tel-01749150

HAL Id: tel-01749150
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749150

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Ecole Doctorale BioSE (Biologie Santé Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par

Xianqing MAO

Effets des contraintes mécaniques cycliques sur la génération de thrombine à la surface des cellules musculaires lisses de rat

Soutenue le 9 Janvier 2012

Rapporteurs :

Mme Mary Osborne	Chargé de recherche, Inserm U698 Paris
Mr Matthias Mericskay	Chargé de recherche, UMPC Paris

Examinateurs:

Mr Denis Wahl	PUPH, CHU de Nancy
Mr Patrick Lacolley	Directeur de recherche Inserm U961, Nancy Directeur de thèse

Invités :

Mme Louis Huguette	Ingénieur, CHU de Nancy
Mr Zhenlin Li	Directeur de recherche, UMPC, Paris

Travail effectué au laboratoire INSERM U961
« Risque cardiovasculaire, rigidité, fibrose et hypercoagulabilité »
Faculté de Médecine de Nancy, Vandœuvre-lès-Nancy, Nancy Université

有志者事竟成

Nothing is impossible to a willing heart

A cœur vaillant rien d'impossible

Mes travaux ont été réalisés à **l'UMR-INSERM 961** à la faculté de médecine de l'Université de Nancy.

Au terme de ces travaux, je tiens avant tout à adresser mes remerciements les plus chaleureux à tous ceux qui m'ont aidée au cours de sa réalisation.

Tout d'abord, je tiens à manifester ma gratitude à mon Directeur de thèse le Docteur **Patrick Lacolley**, directeur du laboratoire, qui m'a fait l'honneur de m'accueillir et m'a permis de réaliser ces travaux dans son laboratoire. Je lui suis très reconnaissante pour sa confiance, ses remarques et son soutien scientifique. Cette thèse a été jalonnée de bons et de moins bons moments qui m'ont permis d'évoluer et d'en arriver là où j'en suis. En espérant avoir été à la hauteur de ses attentes.

Je tiens à remercier le Docteur **Mary Osborne**, pour avoir accepté la charge de juger ce travail de thèse en qualité de rapporteur. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma sincère gratitude et de l'expression de mes remerciements.

Je tiens à remercier le Docteur **Matthias Mericskay**, pour avoir également accepté de juger ce travail de thèse en qualité de rapporteur. Qu'il trouve ici l'assurance de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Je tiens à remercier le Professeur **Denis Wahl,** pour faire l'honneur de participer à ce jury en tant qu'examinateur. Je le remercie sincèrement pour ses conseisl pour ce travail.

Je tiens à remercier le Docteur **Zhenlin Li**, directeur du laboratoire de Biologie Moléculaire de la Différenciation à l'Université Paris 7. Je tiens également à lui exprimer toute ma reconnaissance pour ses précieux conseils et son implication dans cette thèse.

Je tiens à remercier très sincèrement le Docteur **Huguette Louis** pour son implication et son soutien technique dans ces travaux. Je voudrais saluer l'engagement et la disponibilité dont elle a fait preuve tout au long de mon doctorat et qui m'ont permis d'avancer dans mes travaux de recherche. Je lui adresse ici toute ma reconnaissance pour m'avoir soutenue et pour avoir fait preuve de ténacité durant les moments les plus difficiles. Je la remercie plus spécialement pour les nombreuses discussions et suggestions précieuses, pour la patience et le courage dont elle a fait preuve lors de la correction de ce manuscrit.

Remerciments

Je tiens à remercier très sincèrement Madame le Professeur **Jing-ping OUYANG,** directeur du laboratoire de Physiopathologie à Wuhan Université, pour m'avoir donné la possibilité de faire une thèse de biologie en France et son aide et ses conseils scientifiques lors de ma thèse de médecine en Chine.

Je tiens à remercier Madame le Docteur **Véronique Regnault** pour son intérêt et son implication dans ma thèse. Je la remercie pour m'avoir fait bénéficier de ses conseils lors de la réalisation de ces travaux.

Je tiens à remercier très sincèrement Madame le Docteur **Sylvie Fournel-Gigleux** pour m'avoir accueillie dans son équipe au sein du laboratoire UMR-CNRS 7561 de « Physiopathologie, Pharmacologie et Ingénierie Articulaires » à la fin de cette thèse. Je la remercie pour son implication constante et son soutien financier et scientifique dans mon parcours professionnel. Je tiens également à la remercier pour les bons moments passés en Ecosse avec Victor. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde sympathie et mes sincères remerciements.

Je tiens à remercier Monsieur le Proffeseur **Simon N Thornton**, INSERM U961 pour toutes les corrections en Anglais. Je tiens également à lui exprimer toute ma reconnaissance pour sa bonne humeur et ses conseils scientifiques dans cette thèse.

Je tiens à remercier Monsieur le Docteur **Jean-Pierre Max,** Ingénieur de Recherche INSERM, pour toutes les expériences de l'activité des phospholipides procoagulants. Je tiens également à lui exprimer toute ma reconnaissance pour son aide scientifique dans cette thèse.

Je tiens à remercier mon binôme Mademoiselle **Rose Saïd** pour toutes les expériences de thrombinographie. Qu'elle trouve ici l'assurance de ma sincère reconnaissance. Bon courage également !

Je tiens à remercier **Natalia, Natalie, Z'hor, Rosine, Armelle, Karima, Jérémy, Guillaume, Laurent, Natacha** et tous les membres du laboratoire d'Inserm U961 pour leurs soutiens, leurs bonnes humeurs et leurs conseils durant ces années de thèse.

Je tiens à remercier tous les membres des équipes à Dundee et de l'UMR-CNRS 7561 de Nancy où j'ai passé d'agréables moments en leur compagnie. Je leur adresse mes remerciements pour leurs accueils, leurs bonnes humeurs et leurs aides précieuses lors de mon parcours professionnel.

Je tiens à remercier Monsieur **Marc DALAUT** et sa famille pour leur gentillesse, leur encouragement et leur amitié. Je leur exprime ma profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier mes deux chères amies, Mademoiselle le Docteur **Tingting Ding** et Mademoiselle le Docteur **Xiaobai Zhou** pour m'avoir accompagnée tout au long de ces

années. Je leur adresse mes remerciements pour leurs sympathies, leurs soutiens et leurs amitiés.

Je tiens à remercier encore tous mes amis en France et en Chine : **Hui, Qi, Dandan, Wei, Ruijin, Jian, Xiaofei, Lifan, Min, Huahua, Dong, Jun, Zheng, Matthieu, Nick, Michael**…Je suis sure que j'ai encore oublié pleins de prénom. Mais je tiens à m'excuser et je leur adresse mes remerciements pour leurs sympathies, leurs soutiens et leurs amitiés.

Je tiens à remercier particulièrement mon cher ami, Monsieur **Bruno Demoulin** pour m'avoir accompagné tout au long de ces années. Je tiens également à lui exprimer toute ma reconnaissance pour m'apprendre le Français, la culture, et toutes les petites choses de la vie pendant mon séjour à Nancy. Je lui adresse mes remerciements pour les bons moments que nous avons passés ensemble. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde sympathie et mes sincères remerciements.

Et enfin, je tiens à remercier mes chers parents, **Jixin** et **Shuizhen** pour avoir toujours cru en moi, pour m'accompagner et pour m'avoir apporté le réconfort nécessaire avant, maintenant et toujours. Je les remercie d'avoir fait preuve d'écoute et de compréhension. Je tiens à leur adresser par ces quelques mots toute mon affection et ma reconnaissance.

我最亲爱的爸爸妈妈, 无论天涯海角, 我永远爱你们！祝你们身体健康, 万事如意！

Sommaire

I. Abréviations et Symboles 1

II. Contexte du sujet 3

III. Etude bibliographique 6

1. Déterminants des propriétés mécaniques artérielles 7

1.1. Structure de la paroi vasculaire 7

1.2. Les contraintes mécaniques sur la paroi artérielle 8

1.3. Réponse des cellules vasculaires aux contraintes mécaniques 9

1.3.1. Différenciation des CML induite par des contraintes mécaniques externes 9

1.3.2. Apoptose des CML induite par des contraintes mécaniques 15

1.4. Remodelage vasculaire 18

1.4.1. Déterminants structuraux de la rigidité artérielle 19

1.4.2. Déterminants matriciels de la rigidité artérielle via les intégrines 21

1.4.3. Métalloprotéases (MMP) dans le remodelage vasculaire 22

1.5. Thrombose et remodelage vasculaire 24

1.5.1. Coagulation physiologique 24

1.5.2. Etat hypercoagulant 25

1.5.3. Thrombine influe sur le remodelage vasculaire 26

2. Relation structure-fonction des intégrines 28

2.1. Famille des intégrines 28

2.2. Structure des intégrines 29

2.2.1. Structure des sous-unités α 29

2.2.2. Structure des sous-unités β 30

2.2.3. Structure de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ 30

2.3. Fonction des intégrines 31

2.4. Signalisation des intégrines 32

2.4.1. Signalisation « outside-in » 33

2.4.2. Signalisation « inside-out » 34

2.4.3. Adhésion focale 37

2.4.4. Protéines de signalisation associées aux intégrines 39

2.4.5. Signalisation des intégrines vers le cytosquelette d'actine 45

3. Intégrine $\alpha_v\beta_3$ 62

3.1. Etude physiopathologique de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans les CML 62

3.2. Rôle de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ dans les plaquettes 63

3.3. Ligands de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ 63

3.3.1. Vitronectine (VN) 63

3.3.2. Fibronectine (FN) 65

3.3.3. Prothrombine (FII) 66

3.4. Génération de thrombine et activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ 70

3.4.1. Fonction de la thrombine 70

3.4.2. Génération de la thrombine au niveau des CML 71

3.4.3. Effets de la thrombine sur l'activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ 72

IV. Objectifs de la thèse 73

V. Matériels et méthodes 76

1. Culture cellulaire 77

1.1. Isolement et culture des CML 77

1.2. Stimulation mécanique (modèle du flexcell) 77

1.2.1. Appareil de l'étirement des CML 77

1.2.2. Conditions de culture pendant la stimulation mécanique 78

1.3. Utilisation de peptides inhibiteurs 78

1.4. Utilisation des siARNs 79

2. Mesure de la génération de thrombine (thrombinographie) 80

2.1. Définition générale de la technique 80

2.2. Conditions de réalisation du test 80

2.3. Paramètres de thrombinographiques 81

2.4. Mise au point des conditions avec des CML de rat et du PP humain 82

3. Mesure de l'activité procoagulante des phospholipides (PPA) 83

4. Mesure de l'adhésion des CML à la prothrombine immobilisée 84

4.1. Adhésion 84

4.2. Marquage et quantification 84

5. Immunomarquage et analyse en microscopie confocale *85*

6. Etude de l'expression des protéines par Western blot *85*

7. Etude de l'expression des gènes par PCR en temps réel (PCRq) *87*

7.1. Extraction des ARN 87

7.2. Transcription inverse (RT) 87

7.3. Réaction de PCR quantitative en temps réel (PCRq) 87

8. Double marquage d'Annexin V-PI mesuré par Cytométrie en flux (FACS) *87*

9. Analyse statistiques *88*

VI. Résultats *89*

1. Expression des intégrines dans les CML de rat en réponse aux contraintes mécaniques cycliques *90*

1.1. Effet de l'étirement cyclique de longue durée 90

1.1.1. Expression des sous-unités α_v-β_3 90

1.1.2. Expression des sous-unités α_1-α5-β_1 91

1.2. Effet de l'étirement cyclique de courte durée 92

1.1.1. Expression des sous-unités α_v-β_3 92

1.1.2. Expression des sous-unités α_1-α5-β_1 95

2. Effet des contraintes mécanique cycliques sur le phénotype des CML de rat *97*

2.1. Différenciation des CML de rat 97

2.1.1. Structure du cytosquelette d'actine 97

2.1.2. Marqueurs de différenciation des CML 98

2.2. Marqueurs d'apoptose des CML 99

2.2.1. Annexin V/ PI 99

2.2.2. Clivage de Caspase 3 101

2.2.3. Ratio de Bax/Bcl2 101

2.2.4. Phosphorylation de p44/42 et p38 MAPK 102

3. Effet des l'étirement cyclique sur la signalisation des intégrines dans les CML de rat *105*

3.1. Phosphorylation de Src **105**

3.2. Phosphorylation de FAK **106**

3.3. Phosphorylation d'AKT **107**

3.4. Clivage de la taline **108**

3.5. Phosphorylation d'ILK **109**

4. Effet des contraintes mécaniques cycliques sur la génération de thrombine par les CML *110*

4.1. Adhésion des CML de rat à la prothrombine **110**

4.2. Activité procoagulante des phospholipides membranaires **110**

4.3. Potentiel thrombinique **111**

5. Implication de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans la génération de thrombine par les CML *111*

5.1. Réponse des CML dans la condition statique **111**

5.1.1. Peptides 111

5.1.2. siARN d'α_v 115

5.2. Réponse des CML à l'étirement cyclique **116**

5.2.1. Expression d'αv 116

5.2.2. Adhésion 118

5.2.3. ETP 119

6. Voies de signalisation impliquées dans l'activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ en réponse aux contraintes mécaniques cycliques *121*

6.1. Inhibition d'α_v **121**

6.1.1. Phosphorylation de Src 121

6.1.2. Phosphorylation de FAK 123

6.2.3. Phosphorylation d'AKT 124

6.2.4. Clivage de taline 126

6.2.5. Phosphorylation d'ILK 127

6.2. Effets du siARN ILK **129**

6.2.1. Expression de l'α_v 129

6.2.2. Signalisation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ 130

6.3. Effets du siARN taline **133**

6.3.1. Expression de l'α_v 134

6.3.2. Signalisation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ 135

VII. Conclusions et Discussion ***139***

1. Conclusion générale ***140***

2. Discussion ***140***

2.1. Phénotype du modèle cellulaire **140**

2.2. Génération de thrombine induite par les contraintes mécaniques **142**

2.3. Génération de thrombine induite par l'étirement mécanique cyclique dépendant de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ **143**

2.4. Molécules responsables de la signalisation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ activées par l'étirement mécanique cyclique impliqué dans la génération de thrombine **145**

2.5. Implication potentielle de la génération de thrombine à la surface des CML dans des conditions physiopathologiques *in vivo* **149**

VIII. Perspectives ***151***

IX. Références ***154***

X. Annexe ***181***

XI. Liste des figures ***185***

XII. Liste des tableaux ***190***

XIII. Articles et communications ***192***

I. Abreviations et Symboles

α-SMA	α-smooth muscle actin
AKT	protein kinase B
CE	Cellules Endothéliales
CML	Cellules Musculaires Lisses
cRADPV	Arg-Ala-Asp-D-Phe-Val
cRGDPV	Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FAK	Focal adhesion kinase
FN	Fibronectine
FVa	Facteur V activé
FXa	Facteur X activé
GSK3β	Glycogen synthase kinase-3
H-caldesmon	Heavy chain of caldesmon
ILK	Integrin-linked kinase
JAK/STAT	Janus kinase/signal transducers and activators of transcription
JNK	c-Jun N-terminal kinases
L-caldesmon	Light chain of caldesmon
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEC	Matrice extracellelaire
MEK	MAPK/ERK kinase
MEKK	MAPK/ERK kinase kinase
MKK	MAPK kinase
MK2	MAP kinase-activated protein kinase 2
MLK	Mixed-lineage kinase
MMPs	Métalloprotéases
MT1-MMP	Membrane type 1 metalloprotease
NO	Monoxyde d'azote
Ox-LDL	Oxidized low density lipoprotein
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDH_2	Prostaglandine H_2
PDK	3-phosphoinositide-dependent protein kinase
PGI_2	Prostacycline
PIP_2	Phosphatidyl inositol diphosphate

PKC	Protein kinase C
PIX	p21-activated kinase-interacting exchange factor
PKC	Protein kinase C
PL	Phospholipide
PLC	Phospholipase C
PPA	Activité Phospholipides Procoagulantes
PPP	Plasma pauvre en plaquettes
Raf	Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase
RGD	Arg-Gly-Asp
RIP	Receptor-interacting protein
ROCK	Rho-kinase
SFK	Src familly kinases
SM-MHC	Smooth muscle myosin heavy chain
SRF	Serum response factor
TF	Tissue factor
TGF-β	Tumor necrosis factor-β
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases
TXA_2	Thromboxane A2
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VN	Vitronectine
YAP	Yes-associated protein

II. Contexte du sujet

La coagulation sanguine est un processus complexe aboutissant à la formation de caillots sanguins. Elle est déterminée par la présence de plusieurs facteurs de coagulation, d'une surface de phospholipides procoagulants et des récepteurs (Butenas et al. 2002). C'est une partie importante de l'hémostase où la paroi endommagée d'un vaisseau sanguin se couvre d'un caillot de fibrine pour arrêter l'hémorragie. La lésion vasculaire déclenche la coagulation. Il s'agit d'une « cascade » faisant intervenir une série de facteurs de la coagulation. L'étape finale est la transformation du fibrinogène soluble en fibrine insoluble, sous l'action de la thrombine. Grâce aux interactions des cellules vasculaires avec le système de la coagulation sanguine, la paroi vasculaire fonctionne comme une surface anticoagulante. En générale, la surface cellulaire la plus connue sur laquelle se produit la thrombine est la membrane plaquettaire. Cependant, les cellules musculaires lisses (CML) vasculaires sont aussi capables de générer la thrombine sans plaquette ou microparticule d'origine plaquettaire (Flynn et al. 1997) (Bretschneider et al. 2000) (Pathak et al. 2006). Plus récemment, Campbell *et al.* ont montré que les CML vasculaires cultivées favorisent une forte génération de thrombine conduisant à la formation d'un réseau de fibrine stable et dense (Campbell et al. 2009). De plus, Vidwan *et al.* ont montré que les phases d'inhibition et de propagation de la génération de thrombine à la surface des CML aortiques humaines induite par le facteur tissulaire (TF) sont accélérées par l'α-thrombine à des concentrations faibles *via* les récepteurs « protease-activated receptor 3 et 4 » (PAR3 et 4) (Vidwan et al. 2010). L'accumulation des CML vasculaires indique la formation d'une prolifération néointimale qui sert de matrice pour les plaques d'athérosclérose. Les événements thrombotiques mortels en raison de la rupture des plaques indiquent un rôle important des CML vasculaires dans le processus de coagulation. En réponse à la lésion et à la stimulation par une série de changement de leur propriété adhésive, les CML participent donc aux événements prothrombotiques (Byzova et al. 1998) (Sueishi et al. 1995) (Taubman 1993) (Flynn et al. 1997). La génération de thrombine pariétale participe à la modulation de la prolifération et de la migration des CML (Borissoff et al. 2009) et aussi dans les réponses prothrombotiques des lésions vasculaires et des plaques d'athérosclérose (Leroyer et al. 2007).

Les CML sont les composants cellulaires principaux de la paroi artérielle, elles sont exposées constamment aux contraintes mécaniques. Les CML perçoivent le stimulus mécanique résultant de l'étirement pulsatile et le traduisent en signaux intracellulaires par des modifications fonctionnelles et structurales des vaisseaux (Haga et al. 2007). Les forces mécaniques cycliques régulent de nombreuses fonctions des CML vasculaires, et également amplifient l'activité de la thrombine *via* PAR1 (Nguyen et al. 2001). Dans notre laboratoire, nous avons montré *in vitro* sur des CML humaines qu'un étirement mécanique cyclique de

déformation de 10% à une fréquence de 1Hz augmente l'expression de facteurs anticoagulants (Regnault et al. 2011). Ainsi, nous proposons que l'étirement mécanique puisse être une stimulation nécessaire pour les CML vasculaires à produire des protéines procoagulantes, et par la suite à générer la thrombine aux surfaces des cellules. De nombreux récepteurs, présents à la surface des CML, les intégrines, reliant la matrice extracellulaire (MEC) aux sites d'adhérence focale et au cytosquelette, peuvent transmettre et moduler la tension mécanique dans les cellules (Romer et al. 2006). L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est un récepteur important de la paroi vasculaire normale et athéroscléreuse (Hoshiga et al. 1995), originairement identifiée comme un récepteur de vitronectine *via* un motif Arg-Gly-Asp (RGD) (Byzova et al. 1998). L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est impliquée dans la réponse prolifération et mécanosensible des CML vasculaires *via* la voie de signalisation « Phosphoinositide 3-Kinase » PI3K/AKT (Sedding et al. 2005). Cheng *et al.* ont montré que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ protège les CML de l'apoptose induite par l'« oxidized low density lipoprotein »' (Ox-LDL) (Cheng et al. 2007). L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a aussi été montré comme le seul récepteur de la prothrombine sur les CML (Byzova et al. 1998; Stouffer et al. 2003). Mais dans la littérature, il n'a jamais été montré qu'il y a une relation entre l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, l'adhésion de la prothrombine aux CML et la génération de thrombine.

Ces travaux nous permettront de comprendre les effets et les mécanismes des contraintes mécaniques *in vitro* sur la génération de thrombine sur les CML de rat, phénomène qui intervient en partie dans les pathologies de la paroi artérielle associant fibrose, rigidité et hypercoagulabilité.

III. Etude bibliographique

1. Déterminants des propriétés mécaniques artérielles

1.1. Structure de la paroi vasculaire

Les artères répondent toutes à un modèle commun d'organisation. Leur paroi est constituée de trois tuniques qui, de l'intérieur vers l'extérieur, sont : l'intima, la media et l'adventice (Figure 1).

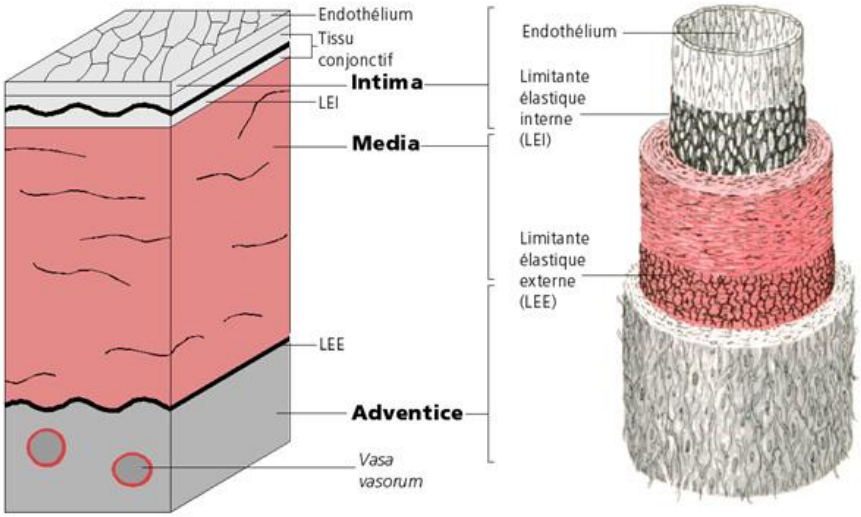


Figure 1 : Structure de la paroi artérielle.

La paroi artérielle est composée de trois tuniques disposées de façon concentriques. En périphérie, se trouve l'adventice constitué par le collagène, les fibres élastiques et les fibroblastes. Au niveau intermédiaire se trouve, la média, constituée par les CML et la matrice extracellulaire (MEC) et, tapissant la paroi intérieure, l'intima est constituée par une monocouche des cellules endothéliales.

L'intima est la tunique la plus interne et la plus fine. Elle est constituée d'une couche unique de cellules endothéliales (CE), imbriquées les unes dans les autres et formant une couverture étanche ; d'une couche de tissu conjonctif fibro-élastique, d'une lame de fibre élastique constituée d'élastine, la limitante élastique interne.

L'adventice est la tunique externe. Elle est constituée d'un tissu conjonctif peu organisé, riche en collagène et en fibres élastiques, contenant des fibroblastes et une enveloppe assurant l'ancrage des artères aux structures avoisinantes. Elle est irriguée par des *vasa vasorum* qui ont un rôle nourricier pour l'adventice elle-même et pour la partie externe de la média.

Entre ces deux tuniques, la média est la plus épaisse. Elle est constituée essentiellement des CML, empilées en couches concentriques appelées unités lamellaires et séparées par des fibres élastiques. Chaque unité lamellaire est composée de CML entourées d'une MEC

constituée des protéines fibreuses et élastiques (collagène et élastine) et de muco-polysaccharides (Figure 1). Le rôle de la média et de l'endothélium est de permettre la vasoconstriction et la vasodilatation.

1.2. Contraintes mécaniques sur la paroi artérielle

Les forces associées à la circulation sanguine sont les principaux déterminants de la morphogenèse et de la physiologie vasculaire. Le flux sanguin est crucial pour le développement des vaisseaux sanguins pendant l'embryogenèse et pour la régulation du diamètre du vaisseau dans la vie adulte (Hahn et al. 2009).

Les contractions périodiques du cœur provoquent des changements pulsatiles de la pression artérielle. Les grandes artères répondent passivement à la pression artérielle en raison de leur élasticité intrinsèque. Ces artères, en particulier l'aorte, s'étendent à chaque pic de pression du cœur (systole), puis, quand la pression du cœur baisse (diastole) se relachent progressivement, libérant le sang en aval. L'élasticité des gros vaisseaux atténue ainsi les variations périodiques de pression, permettant également la perfusion continue des organes et des tissus au cours du cycle cardiaque. Cet effet est dû aux propriétés viscoélastiques des parois artérielles.

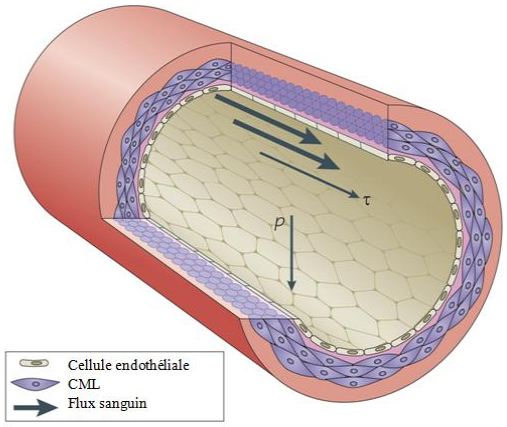


Figure 2 : Contraintes mécaniques sur la paroi artérielle.

Le flux sanguin exerce des contraintes mécaniques sur la paroi artérielle qui sont représentées par la pression exercée sur la paroi vasculaire (P) et la contrainte de cisaillement sur cette même paroi (τ).

Adaptée d'après (Hahn et al. 2009)

Les propriétés viscoélastiques des parois artérielles sont également un facteur déterminant de la vitesse de propagation de l'onde de pouls et de l'importance des ondes de réflexion. L'augmentation de la rigidité des artères est responsable de l'accélération de la vitesse de l'onde du pouls. De plus, elle est responsable d'un retour plus précoce des ondes de pression

réfléchies, qui se superposent à l'onde de pression incidente, et contribuent ainsi à l'augmentation de la pression pulsée et de la pression systolique (Figure 2).

1.3. Réponse des cellules vasculaires aux contraintes mécaniques

La pression artérielle est principalement déterminée par le diamètre des artères de résistance. Les CML dans ces vaisseaux répondent activement à l'évolution aiguë de la pression artérielle par un mécanisme appelé « effet myogénique » (Martinez-Lemus et al. 2003). La tension artérielle élevée déclenche la contraction des CML, ce qui permet de diminuer le calibre des petites artères résistives pour maintenir le débit sanguin constant dans les capillaires en aval. Si la pression reste élevée, pour résister à ces forces, il en résulte alors un remodelage artériel entraînant un épaississement de la paroi. Dans les conditions pathologiques où les pressions restent élevées, ce remodelage peut compromettre l'élasticité du vaisseau, diminuant alors sa capacité à s'adapter aux changements brusques de pression (Lehoux et al. 2003; Lin et al. 2008).

Les CE répondent également à l'étirement. Cependant, c'est la contrainte de cisaillement qui semble être le principal facteur déterminant dans la fonction des CE. En effet, en réponse à un écoulement accru de sang, les CE induisent un relâchement du muscle lisse les entourant. Le mécanisme implique la production, par ces cellules, de substances comme le monoxyde d'azote (NO) et la libération d'ions potassium K^+ par des canaux membranaires résultant alors en une hyperpolarisation du muscle lisse (Vanhoutte et al. 1995; Haddy et al. 2006; Campbell et al. 2007).

Les CML hyperpolarisées, sont moins sensibles aux activations par les canaux calciques voltage-dépendants qui s'ouvrent lorsque les cellules sont dépolarisées. Ces canaux activent la myosine et provoquent la contraction des CML. Cette réponse des CML au flux sanguin se produit durant quelques secondes à quelques minutes et se traduit par un élargissement du diamètre artériel, remettant les contraintes de cisaillement de la paroi aux niveaux initiaux. Dans le cas où la tension artérielle continue d'augmenter, l'adaptation cellulaire aux contraintes mécaniques entraînera un remodelage de la paroi artérielle à plus long terme (quelques semaines) (Di Stefano et al. 1998).

1.3.1. Différenciation des CML induite par contraintes mécaniques externes

1.3.1.1. Rôle des facteurs mécaniques sur la différenciation des CML

Plusieurs facteurs influencent la différenciation des CML : on peut noter l'état de différenciation, les interactions cellulaires notamment avec les CE, la MEC ainsi que les facteurs hémodynamiques et/ou des facteurs mécaniques. Dans notre projet, nous nous

sommes intéressés aux effets des contraintes mécaniques sur la différenciation des CML. La signalisation de la différenciation en réponse aux contraintes mécaniques s'effectue en parallèle à l'activation de la voie de « mitogen-activated protein kinases » (MAP kinases) (Halka et al. 2008). Ainsi, il a été montré que l'étirement actif (direct ou indirect) agit sur des protéines comme « focal adhesion kinase » (FAK) et « Proto-oncogene tyrosine-protein kinase » (Src) lors de l'adhésion focale des CML. Dans les artères, la Src et la FAK, sont phosphorylées au niveau des intégrines, et sont essentielles à la (dé) polymérisation de l'actine. Ceci peut être régulé par la voie Rho/ « Rho-associated protein kinase » (ROCK). La voie Rho/ROCK induite par l'étirement va ainsi transmettre un signal du cytoplasme au noyau en entraînant l'activation du « serum response factor » (SRF), facteur de transcription impliqué dans la différenciation (Landerholm et al. 1999). L'expression des marqueurs de la différenciation est renforcée dans cette condition. Parallèlement, l'activation d' « extracellular signal-regulated kinases 1/2 » (ERK1/2) de la famille des MAP Kinases par la voie Rho/ROCK induit la prolifération des cellules (Figure 3). Ainsi, la croissance induite par l'étirement dans un phénotype contractile préservé est le fruit d'une double activation des voies de signalisation régulant la croissance et la différenciation (Hellstrand et al. 2005; Wozniak et al. 2009).

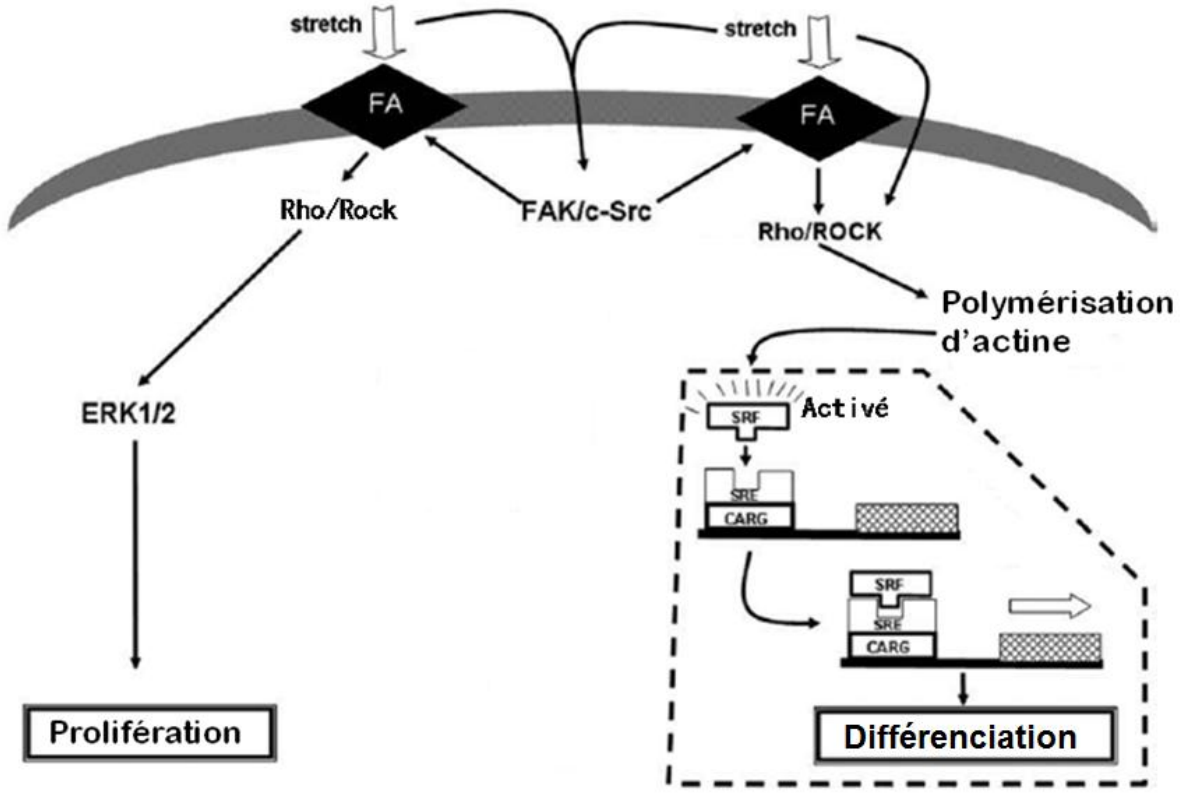


Figure 3 : Différenciation et croissance des CML induit par l'étirement.

Les CML sont constamment exposées aux contraintes mécaniques. Comparativement aux CE, l'étirement cyclique de la pression pulsée joue un rôle essentiel dans la modulation phénotypique des

CML. La voie de signalisation de l'intégrine-Rho/ROCK induit une polymérisation d'actine, puis l'activation de facteurs (SRF) induit la transcription des génes des marqueurs de la différenciation des CML. La différenciation maintient également le phénotype contractile des CML assurant sa fonction principale sur le plan mécanique. Par la voie de signalisation d'intégrine-FAK/Src, l'étirement cyclique peut aussi induire la prolifération *via* l'activation de la famille MAP kinases tel que ERK1/2. Adaptée d'après (Halka et al. 2008)

Il a été montré que la contrainte mécanique peut induire la prolifération (Wilson et al. 1993), la différenciation (Reusch et al. 1996) et l'apoptose (Wernig et al. 2003) des CML. Le phénotype cellulaire lui-même détermine aussi l'effet de l'étirement sur les CML (Su et al. 2006), en modifiant la structure et la fonction des CML (Shaw et al. 2003). Certains marqueurs des CML comme «α-smooth muscle actin » (α-SMA) et « smooth muscle-myosin heavy chain » (SM-MHC), sont ainsi diminués lorsque les CML ont perdu leur phénotype contractile, et ce processus s'appele « modulation phénotypique » (Owens 1996). Un exemple est celui de la formation de la néo-intima après une lésion de l'endothélium vasculaire induisant alors la migration et la prolifération des CML au détriment du phénotype contractile (Regan et al. 2000). Puisque les forces mécaniques sont transmises à l'intérieur des CML *via* les interactions des cellules avec la MEC, un environnement tissulaire intact est très important pour la réponse physiologique des cellules. Dans l'hypertension, la paroi artérielle devient plus épaisse et la lumière interne est réduite. Ce type de remodelage vasculaire est une façon de normaliser et de compenser le stress mécanique par unité de surface de la paroi (Lehoux et al. 2003).

1.3.1.2. Marqueurs majeurs de différenciation dans les CML

Les CML vasculaires jouent un rôle déterminant dans les réponses normales et pathologiques de la paroi artérielle. Dans les artères non pathologiques, les CML sont localisées dans la média et, par leur fonction contractile, assurent le tonus vasculaire et la vasomotricité indispensables à la régulation du débit sanguin des organes.

Les CML de la paroi vasculaire sont constamment soumises à des forces de distension par la pression intraluminale. Une élévation de la tension artérielle provoque l'expansion de la paroi vasculaire, caractérisée par l'hypertrophie des CML et le maintien de la différenciation dans un phénotype contractile.

L'état différencié de la cellule se caractérise ainsi par la présence de filaments contractiles de forme identique à celle observée dans les myocytes cardiaques, mais moins nombreux et moins organisés. L'état différencié de la CML se caractérise au niveau biochimique par l'expression de protéines contractiles, de protéines du cytosquelette et de protéines

membranaires et matricielles qui lui permettent d'assurer sa fonction de base qui est la contraction. L'ensemble de ces protéines sert à caractériser le niveau de différenciation de la CML (Owens 1995).

Cet état contractile des CML est le reflet d'un programme de différenciation qui permet l'expression de protéines, comme α-SMA, SM-MHC, smootheline et « heavy chain of caldesmon » (H-caldesmone) *etc*., formant un appareil contractile caractéristique des CML (Hellstrand et al. 2005).

1.3.1.2.1. α-SMA

L'actine est une protéine bi-globulaire de 5,46 nm de diamètre importante pour l'architecture et les mouvements cellulaires. Chez les mammifères, il existe 7 isotypes d'actine : 4 isoformes α (présentes dans les muscles lisses, les muscles striés quelettiques et cardiaque), 1 isoforme d'actine β (non musculaire) et 2 isoformes d'actines γ (présentes dans le muscle lisse entérique et dans les tissus non musculaires) et. Dans les cellules, on retrouve l'α-actine sous deux formes : l'actine G (l'actine globulaire) avec la forme monomérique soluble en solution aqueuse et l'actine F (l'actine filamenteuse) qui est un polymère de l'actine G (Figure 4).

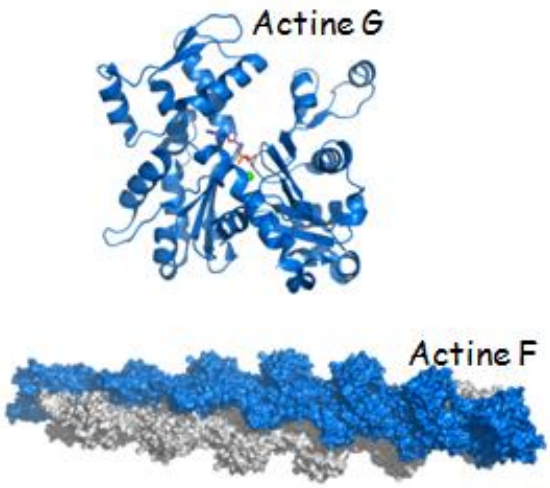


Figure 4 : Structure des actines G et F.

Pour être correctement structurée, le monomère d'actine G doit être associé à un cation bivalent (Mg^{2+} dans des conditions *in vivo*) et un nucléotide (ATP ou ADP). En présence de ces deux cofacteurs (Mg^{2+} et ATP), l'actine G polymérise et forme un microfilament de 7nm de diamètre environ, nommé actine F (filamenteuse). La thymosine bloque la polymérisation en s'associant aux monomères d'actine G liée à l'ATP.

Adaptée d'après http://fr.wikipedia.org/wiki/Actine

L' α-SMA est l'α-actine de muscule lisse, une protéine de 42kDa, qui fut le premier marqueur antigénique décrit dans les CML vasculaires (Gabbiani et al. 1981). Elle représente la forme d'actine la plus abondante des CML différenciées (40% des protéines cellulaires totales et

70% de l'actine totale) (Fatigati et al. 1984). Lors du développement embryonnaire, l'α-SMA est transitoirement exprimée par les muscles squelettiques et cardiaques (Woodcock-Mitchell et al. 1988). Elle est trouvée au contact des CE dans l'aorte au stade 12 (deuxième jour de gestation) chez le poulet (Duband et al. 1993) et les embryons de caille (Owens 1995). Bien qu'on ne puisse pas définir la lignée des CML seulement selon l'expression de l'α-SMA, elle est toutefois tissu-spécifique du muscle lisse vasculaire chez l'animal adulte (Woodcock-Mitchell et al. 1988). Chez l'animal adulte, elle est exprimée uniquement par les CML et les cellules proches des CML, telles que les péricytes (Newcomb et al. 1993) et les cellules du glomérule de Malpighi (Gomez et al. 1989). Elle est exprimée transitoirement par les cellules dérivées du mésoderme dans le processus de développement, de la réparation tissulaire et dans les tumeurs (revascularisation) (Darby et al. 1990; Sappino et al. 1990; Cintorino et al. 1991). L'α-SMA est donc non seulement un marqueur précoce des CML différenciées pendant le développement vasculaire, mais aussi un marqueur qui reste fortement exprimé par les CML quelque soit leur phénotype.

1.3.1.2.2. SM-MHC

La myosine est un composant majeur de l'appareil contractile des cellules musculaires squelettiques, cardiaques et lisses ainsi que des cellules non musculaires. La myosine fonctionnelle est un hexamère composé de deux chaînes lourdes (environ 200 kDa chacune) et de deux paires de chaînes légères, la chaîne 20 (20kDa, chaîne régulatrice phosphorylable) et la chaîne 17 (17kDa, chaîne essentielle) (Eddinger et al. 1997). La SM-MHC est constituée d'une tête globulaire et d'une queue en hélice α. La tête de myosine a une activité ATPasique et peut transformer l'énergie chimique due à l'hydrolyse de l'ATP en fonction mécanique permettant ainsi la contraction musculaire. Les queues en hélice α des MHC forment des tiges enroulées permettant l'assemblage d'une molécule de myosine individuelle en un filament épais fonctionnel (Figure 5).

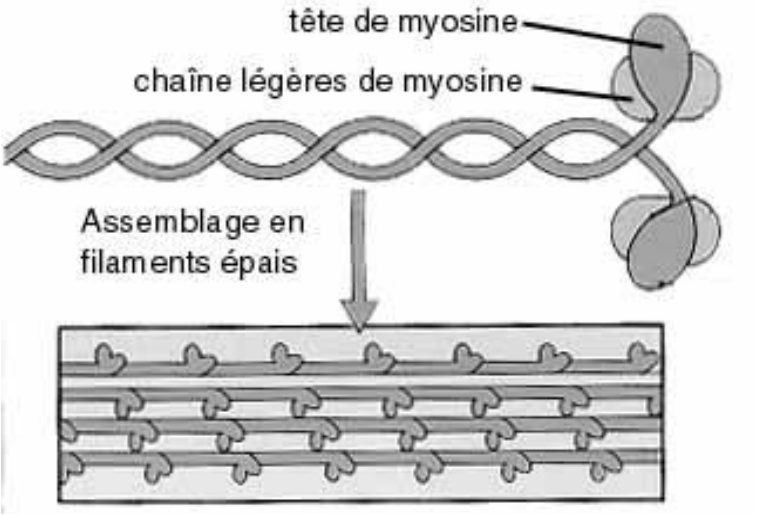


Figure 5 : Structure de la myosine.

La myosine est composée de deux chaînes lourdes avec des extrémités C-terminales en hélice α enroulées entre elles et conférant au complexe l'aspect d'un bâtonnet d'une longueur de 180nm, se terminant par des têtes N-terminales globulaires de 190 acides aminés constituant les domaines moteurs. Un domaine non hélicoïdal à l'extrémité C-terminal de la protéine permet une interaction queue-queue avec une autre myosine formant un dimère antiparallèle avec une superposition de 15nm. Les dimères s'associent ensuite un tétramère pour finalement former un octamère, permettant l'assemblage en filaments épais.

Dans les CML, il a été montré quatre MHC spécifiques du muscle lisse. L'expression de ces différentes isoformes est régulée par l'état de différenciation des CML (Loukianov et al. 1997). La myogenèse du muscle lisse commence à 10½ jours du développement embryonnaire chez les souris (Miano et al. 1994). Deux isoformes de SM-MHC ont été observées: SM1 (204kDa) et SM2 (200kDa). Ces deux isoformes sont codées par deux ARNm qui proviennent de l'épissage alternatif du même gène (Loukianov et al. 1997). L'ARNm de SM2 possède une insertion de 39 nucléotides, absente dans l'ARNm de SM1. Pendant le développement vasculaire, l'expression de SM1 et SM2 est différemment régulée : SM1 est exprimée de façon constitutive dès les premiers stades du développement (Miano et al. 1994) tandis que SM2 apparaît à la naissance chez le lapin (Gabbiani et al. 1981; Kuro-o et al. 1989; Aikawa et al. 1993). Il a été monté que des isoformes MHC des muscles lisses sont les marqueurs les plus rigoureux pour identifier l'état de différenciation des CML (Owens 1995).

D'ailleurs, le tissu musculaire lisse embryonnaire et les CML en culture de lapin et de rat expriment abondement les isoformes de « nonmuscule myosins » (NMHC). Elles sont aussi détectées dans les CML vasculaires chez l'homme adulte. Le clonage et l'analyse des cDNA de ces isoformes ont montré qu'il existe la NMHC-A et la NMHC-B. Chez le lapin, l'expression de la NMHC-B est prédominante dans les aortes embryonnaires et périnatales mais diminue avec le développement vasculaire corrélé à l'augmentation de SM2. Les isoformes de NMHC sont aussi exprimées dans les CML au cours du développement des aortes humaines. Il est probable que le passage des NMHC à SM1 et SM2 reflète le développement d'une fonction contractile caractéristique d'une CML adulte, différenciée (Loukianov et al. 1997).

1.3.1.2.3. Smootheline

Par rapport aux autres marqueurs de différenciation, la smootheline est exclusivement exprimée dans les CML pleinement différenciées, de phénotype contractile (van der Loop et

al. 1996). La smootheline est co-localisée avec l'actine au niveau des fibres de stress (Niessen et al. 2004). Elle possède au moins deux isoformes de masse molaire différentes (Kramer et al. 2001). L'isoforme courte de 59 kDa, la smootheline A est spécifique des CML viscérales, de l'intestin et de l'estomac, tandis que l'isoforme longue de 94 kDa, la smootheline B est retrouvée dans les CML vasculaires. Les deux isoformes de la smootheline humaine sont codées par un seul gène localisé sur le chromosome 22 (Engelen et al. 1997). En cas pathologique, l'expression de la smootheline se retrouve au niveau luminal des plaques d'athérome, ce qui indique l'arrêt de la prolifération des CML dans ces plaques, et contribue alors à l'intégrité et à la stabilité de la chape fibreuse. On peut donc l'utiliser comme marqueur pour vérifier la différenciation des CML dans la néo-intima et la média (Bar et al. 2002).

1.3.1.2.4. H-Caldesmone

La caldesmone est une protéine jouant un rôle régulateur capital dans le système contractile cellulaire. C'est aussi un constituant majeur du cytosquelette se liant à la SM α-actine dans les CML (Sobue et al. 1991). La caldesmone humaine est codée par le gène CALD1 (Huber 1997). La protéine se présente sous deux isoformes : une première isoforme de 140 kDa, spécifique des CML, nommée chaîne lourde de la caldesmone (H-Caldesmone). La deuxième isoforme de 60 kDa s'appelle la chaîne légère de la caldesmone (L-Caldesmone), qui est caractéristique des cellules non-musculaires. L'expression d'H-Caldesmone augmente progressivement dès le 13ème jour en parallèle de la desmine, de la SMMHC *etc.* L'H-caldesmone est un marqueur de différenciation tardive des CML par rapport à l'α-SMA (Drew et al. 1991). Elle est également une protéine se liant à la calmoduline, ce qui inhibe l'activité de l'ATPase de la SH-MHC (Gusev 2001).

1.3.2. Apoptose des CML induite par des contraintes mécaniques

L'apoptose des CML est un des plus importants événements associé au remodelage cardiovasculaire en réponse au stress mécanique. Elle est impliquée dans la formation et le développement des maladies de type artériosclérose (Mayr et al. 2001). Il a été montré que l'étirement mécanique provoque non seulement l'activation de plusieurs molécules de signalisation, incluant le calcium Ca^{2+}, et la famille des MAP Kinases [ERK, « c-Jun N-terminal kinases » (JNK) et P38 MAP Kinases] (Rosales et al. 1997; Hamada et al. 1998; Aikawa et al. 1999), ainsi que l'induction du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), du facteur de croissance des fibroblastes 2 (FGF2), et de l'interleukine-1 (IL-1) (Wilson et al. 1993; Cheng et al. 1997; Lee et al. 1997), mais aussi la sécrétion de la MEC comme le collagène (Kolpakov et al. 1995), et une augmentation de la mitose (Sudhir et al.

1993). Dans les lésions d'artérosclérose, les MAP kinases semblent impliquées dans l'apoptose des CML induite par les contraintes mécaniques (Mayr et al. 2000).

L'application de l'étirement cyclique sur les CML vasculaires a été utilisée comme un moyen *in vitro* pour étudier les événements moléculaires en réponse à une surcharge mécanique (Mayr et al. 2002; Apenberg et al. 2003; Cornelissen et al. 2004; Su et al. 2006; Cheng et al. 2007). Il a été démontré que la signalisation de la sous-unité β_1 des intégrines peut être un initiateur d'apoptose induite par le stress mécanique dans les CML (Wernig et al. 2003). L'activation des intégrines lors des contraintes mécaniques induit l'activation de la p38 MAP kinase et de JNK aboutissant à l'apoptose des CML. Par ailleurs, il semble que les dommages sur l'ADN associés à la voie Rac-p38 MAPK induites par ces contraintes mécaniques participent à l'apoptose p53-dépendant des CML. (Figure 6) (Mayr et al. 2000; Li et al. 2003; Cornelissen et al. 2004; Qi et al.). Il a été montré que l'inhibition de l'activation p38 MAP Kinases *via* la surexpression d'un mutant dominant négatif de la petite GTPase Rac ou MAPK phosphatase-1 peut abolir l'apoptose des CML induite par le stress mécanique (Mayr et al. 2000) (Li et al. 1999).

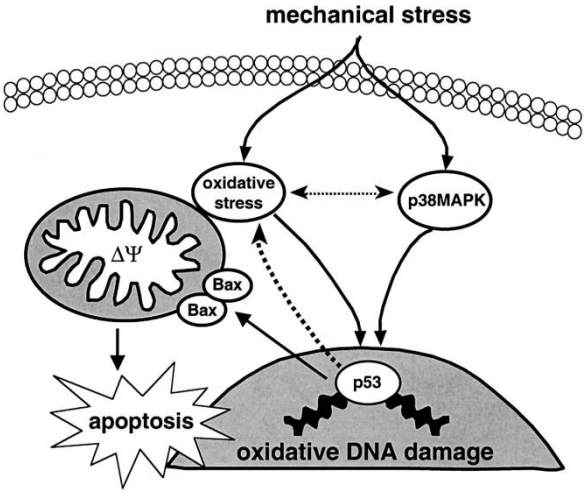


Figure 6 : Mécanisme général de l'apoptose induite par les contraintes mécaniques.

Les contraintes mécaniques entraînent parallèlement l'activation de la voie Rac-p38 MAPK et la production d'espèces réactives de l'oxygène. Ces deux signaux aboutissent à l'activation de p53. La voie empruntant p38 entraîne la phosphorylation de p53 qui provoquera des lésions oxydatives de l'ADN. En parallèle, p38 MAPK peut activer indirectement p53 en modulant l'activation d'oxydase. Activée, p53 stimule rétroactivement la production de radicaux libres et également l'expression de Bax provoquant une dysfonction mitochondriale induisant l'apoptose des CML.

Ainsi, la transformation d'une force mécanique en réponse biologique pourrait impliquer des voies de type réceptrice-dépendante et indépendant (les intégrine et le stress oxydatif respectivement).

Adaptée d'après (Mayr et al. 2002)

Dans les processus d'apoptose ou de la prolifération, l'ensemble des protéines Bcl-2, Bax, Bad a un effet régulateur permettant la fermeture ou l'ouverture des mégapores des mitochondries ; et aussi de libérer des substances (cytochrome C notamment) qui activent des protéases à cystéine, clivant les protéines spécifiquement au niveau d'un aspartate (d'où le nom de caspase).

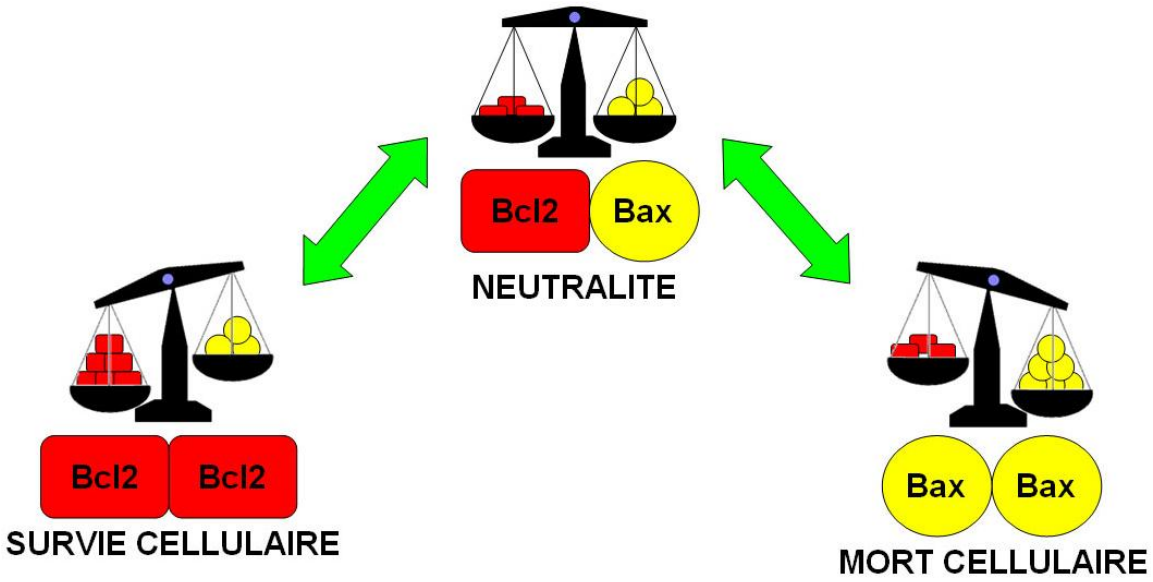


Figure 7 : Ratio Bax/Bcl2.

La direction ou non vers l'apoptose dans une cellule, est définie par le ratio entre les protéines proapoptotiques (comme Bax) et antiapoptotiques (comme Bcl2). Bcl2 et Bax se lient entre elles et se neutralisent. Un excès de Bcl2 détermine la survie cellulaire et un excès de Bax détermine la mort cellulaire ou apoptose.

Adaptée d'après http://masterbiologie.fr/M1_web/index2.php?id=4&p=6

Il a été montré que la protéine Bcl2 fonctionne comme un facteur anti-apoptotique, tandis que la protéine Bax, dont l'expression est sous le contrôle de p53, est plutôt caractérisée comme un facteur pro-apoptotique (Oltvai et al. 1993). Le ratio Bax/Bcl2 élevé révèle l'apoptose cellulaire ou la mort cellulaire (Perlman et al. 1999) (Figure 7). Ainsi, Bcl2 est une protéine qui joue un rôle important dans la voie de signalisation intrinsèque de l'apoptose. Cette molécule anti-apoptotique intervient dans la survie cellulaire en empêchant l'apoptose.

Il a été montré que l'intégrine αvβ3 protège les CML de l'apoptose. Le mécanisme impliquerait une augmentation de l'intégrine αvβ3 en réponse aux contraintes mécaniques via le maintien de l'expression de « particularly interesting Cys-His-rich protein-1 » (PINCH-1) qui inhiberait l'apoptose induite par l'Ox-LDL (Cheng et al. 2007). PINCH-1 est une molécule qui existe dans la plaque d'adhésion focale et qui forme un complexe avec l'« integrin-linked kinase » (ILK) pour stabiliser le cytosquelette (Fukuda et al. 2003). Le

déséquilibre entre survie et apoptose des CML s'expliquerait par l'accumulation des CML dans le processus du remodelage vasculaire lors de la formation des lésions d'athérosclérose (Cheng et al. 2007) (Figure 8). Les événements apoptotiques survenant dans l'activation des intégrines par mécanotransduction ne sont donc pas encore clairement compris.

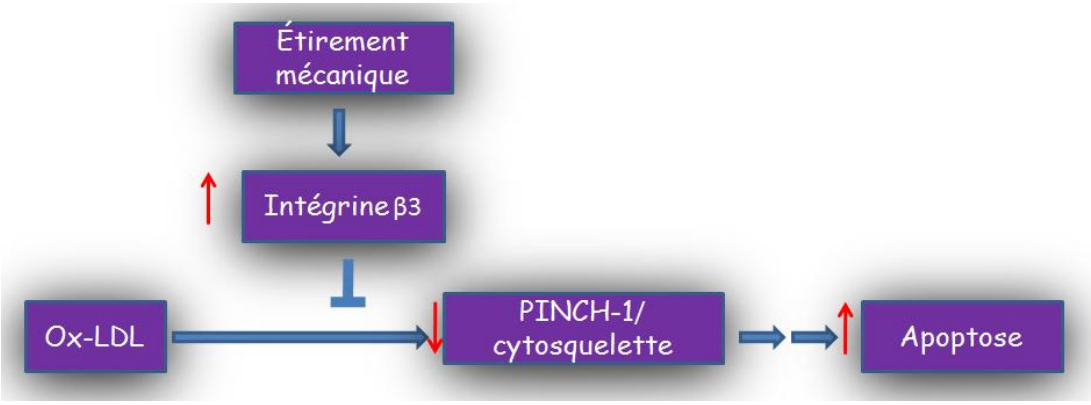


Figure 8 : Implication de l'intégrine β3 dans l'apoptose induite par les Ox-LDL.

L'étirement cyclique (10%, 1Hz) peut protéger les CML de l'apoptose induite par l'Ox-LDL. Le mécanisme concerne la stabilisation de la protéine PINCH-1 par l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Cette stabilisation empêche la désorganisation du cytosquelette et finalement désactive Bax.

Adaptée d'après (Cheng et al. 2007)

1.4. Remodelage vasculaire

Le remodelage de la paroi vasculaire peut être induit en réponse aux changements durables de la circulation artérielle et / ou de la pression artérielle. Pour l'organisme, le problème primordial serait de maintenir la tension et les contraintes de cisaillement dans un état relativement stable (De Mey et al. 2005). Ceci pourrait ainsi expliquer les réponses hypertrophiques de la paroi artérielle dans certains types d'hypertension. La pression intra-vasculaire élevée augmente la tension de la paroi. L'hypertrophie vasculaire conduit à une augmentation de la résistance de la paroi, et par conséquent, à une normalisation du stress artériel (Mulvany 2002). De plus, la tension de la paroi peut aussi être normalisée par le rétrécissement de la lumière des vaisseaux. En revanche, la diminution chronique du débit sanguin peut réduire la résistance artérielle et la masse de la paroi artérielle (Coats et al. 2003; De Mey et al. 2005). En réponse aux altérations hémodynamiques, les changements de structure de la paroi peuvent être initialement adaptatifs, mais finissent par devenir dysfonctionnels et compromettent alors la fonction des artères en conduisant à la rigidité artérielle (Heerkens et al. 2007).

Le remodelage vasculaire est donc un mécanisme pathophysiologique qui se produit à la suite de modifications hémodynamiques. Le remodelage vasculaire implique des processus

cellulaires tels que: 1) la prolifération ou l'hypertrophie cellulaire ; 2) la migration cellulaire ; 3) la production ou la dégradation de la MEC ; 4) l'apoptose ; 5) l'inflammation. Ces processus dépendent des interactions dynamiques entre facteurs de croissance produits localement, substances vasoactives, et stimuli hémodynamiques. Ce type de remodelage peut ainsi s'observer sur tous les sites vasculaires, qu'il s'agisse d'artérioles ou de gros troncs artériels, au cours de l'hypertension, de l'insuffisance cardiaque, de l'athérosclérose, et de la resténose après angioplastie (Figure 9).

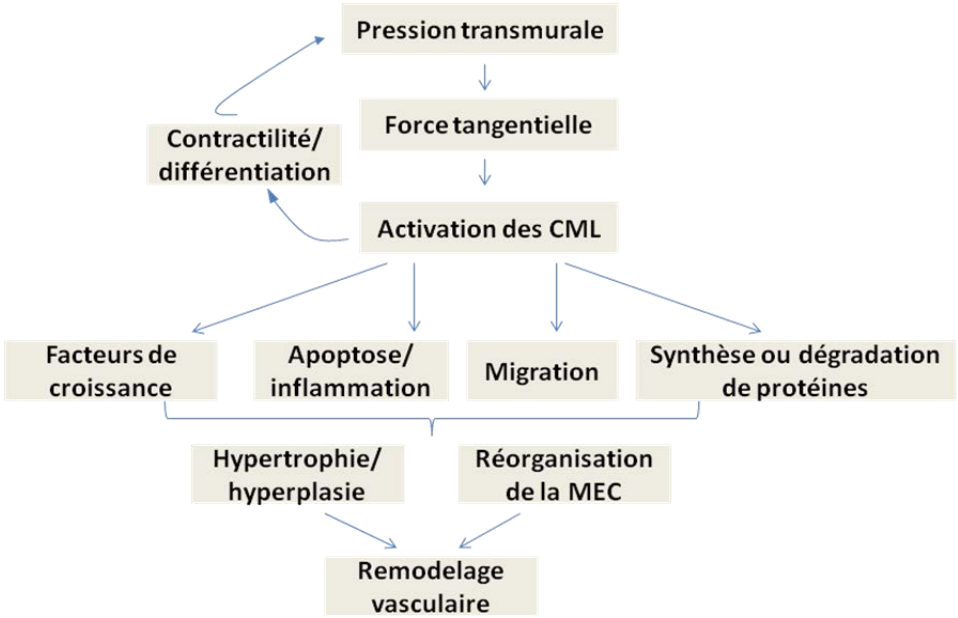


Figure 9 : Réponse des CML à la pression transmurale.

1.4.1. Déterminants structuraux de la rigidité artérielle

La rigidité artérielle est un caractère principal du remodelage vasculaire hypertensif. Les propriétés mécaniques des gros troncs artériels dépendent du contenu de leurs principaux constituants en élastine (distensible), collagène (peu distensible) et CML (tonus musculaire) ainsi que des arrangements géométriques et des interactions mécaniques qui relient ces composants entre eux.

Le nombre de liaisons entre les composants de la média organisés sous forme de plaques denses a une influence sur le comportement mécanique de la paroi. L'augmentation du nombre d'attachements limite la déformabilité de la paroi, ce qui correspond à une augmentation de la rigidité. Dans le sens d'une rigidification en cas d'augmentation du tonus, c'est le degré d'activation des CML qui modifie le comportement de la paroi. La rigidité globale de la paroi est la somme d'une rigidité passive, correspondant aux composants de la matrice, et d'une rigidité active due au tonus musculaire. Dans les conditions basales, le comportement global est très proche du comportement purement passif indiquant que les

cellules sont proches de la relaxation maximale. En cas de sollicitation importante, le comportement mécanique dépend davantage du tonus musculaire et des fibres de collagène.

La fonction élastique des vaisseaux est assurée par la présence de fibres élastiques en lames concentriques fenestrées, parallèles à la surface des vaisseaux. L'élastine est le principal composant des fibres élastiques (environ 90%). Structuralement, les modifications quantitatives des fibres élastiques jouent un rôle important dans la modification de la rigidité de la paroi artérielle (Figure 10). Au cours du vieillissement artériel, la fragmentation et l'altération du réseau de fibres élastiques conduisent, pour une pression non modifiée, à une distension de la paroi entraînant un recrutement prématuré des fibres de collagène plus rigides. Les souris « knock-out » (KO) pour l'élastine meurtent d'une maladie obstructive artérielle, qui résulte de la prolifération cellulaire sous-endothéliale et de la réorganisation des CML ; ces modifications cellulaires sont similaires à celles observées dans l'athérosclérose ; cependant, le défaut d'élastine n'est associé ni à une thrombose, ni à une inflammation endothéliale, qui sont pourtant tous impliquées dans les modèles de l'athérosclérose. Ainsi l'élastine a une fonction de régulation pendant le développement artérielle, qui est de contrôler la prolifération des CML et de stabiliser la structure artérielle (Li et al. 1998)

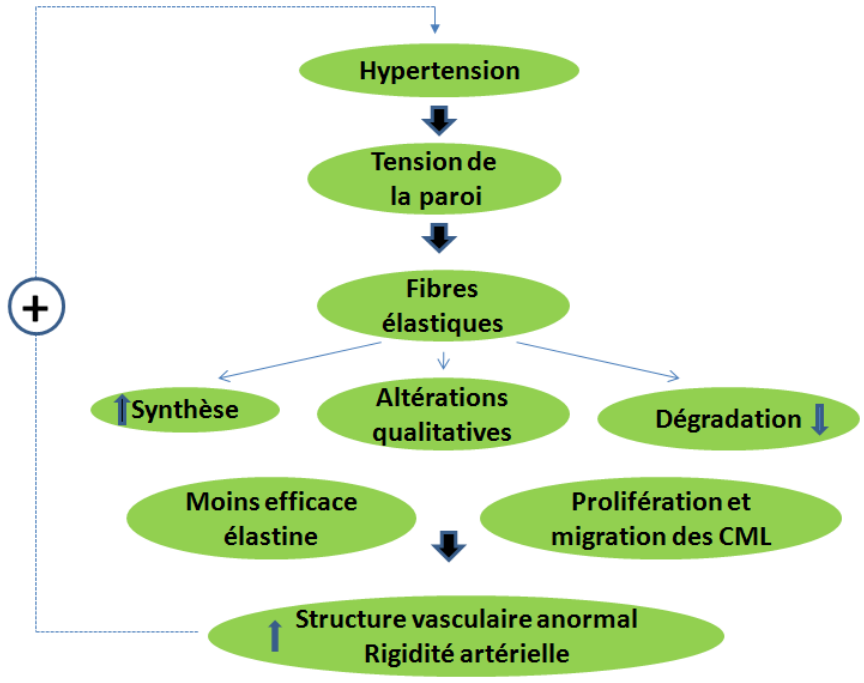


Figure 10 : Implication de l'élastine dans la rigidité artérielle.

L'hypertension induit une augmentation de la tension de la paroi artérielle, qui en retour déséquilibre la synthèse et la dégradation des fibres élastiques en menant des altérations qualitatives. Avec le temps, ces changements conduisent à une élastine moins efficace et à une augmentation des peptides d'élastine participant aux processus de prolifération et de migration. A la fin, l'ensemble de

remodelage vasculaire a contribué à la rigidité artérielle qui participe encore à l'entretien de l'hypertension.

Les collagènes de type fibrillaire sont constitués par l'assemblage de trois sous-unités α codées par le même gène ou par des gènes différents. Les collagènes sont des protéines très rigides dont la fonction est de limiter la distension des vaisseaux (Dobrin 1978). S'il y a un dépôt excessif de collagène dans la paroi vasculaire, cela peut conduire à la fibrose et à la rigidité artérielle. Dans la paroi vasculaire, la stucture en triple hélice des collagènes I et III assure la fonction de résistance du tissu artériel (Bishop et al. 1999). Ce sont aussi les collagènes qui jouent un rôle très important dans le contrôle de la prolifération des CML par les contraintes mécaniques. Wilson *et al*. ont mis en évidence que les CML cultivées en présence de collagène et de fibronectine (FN) proliféraient de manière plus importante qu'en présence de laminine et d'élastine, démontrant ainsi l'importance de la composition de la MEC dans le phénotype des CML.

1.4.2. Déterminants matriciels de la rigidité artérielle *via* les intégrines

Les protéines de la MEC s'associent entre elles et avec les CML selon une organisation tridimensionnelle extrêmement complexe. Cet assemblage en réseau va conditionner la cohésion du tissu vasculaire. Compte-tenu de la composition de la paroi, les liaisons entre les différents composants sont de type matrice-matrice ou cellules-matrice. Les candidats impliqués dans ces interactions sont les protéines d'adhésion de la MEC et leurs récepteurs membranaires, les intégrines (Ingber 1991; Heerkens et al. 2007).

Les intégrines sont des récepteurs membranaires dont les ligands peuvent êtres situés sur la MEC ou sur des cellules : elles interviennent dans les processus d'adhésion cellules-cellules et cellules-MEC. Elles participent à la mécanotransduction cellulaire (Martinez-Lemus et al. 2005) et sont impliquées dans la réorganisation du cytosquelette. Le complexe de signalisation se compose des intégrines, de la partie cytoplasmique (la vinculine, l'α-actinine et la taline) qui se lient avec le cytosquelette d'actine. L'association « MEC-intégrine-cytosquelette » permet aux CML de détecter des changements hémodynamiques, d'y répondre en induisant par exemple le remodelage vasculaire (Heerkens et al. 2007) (Figure 11).

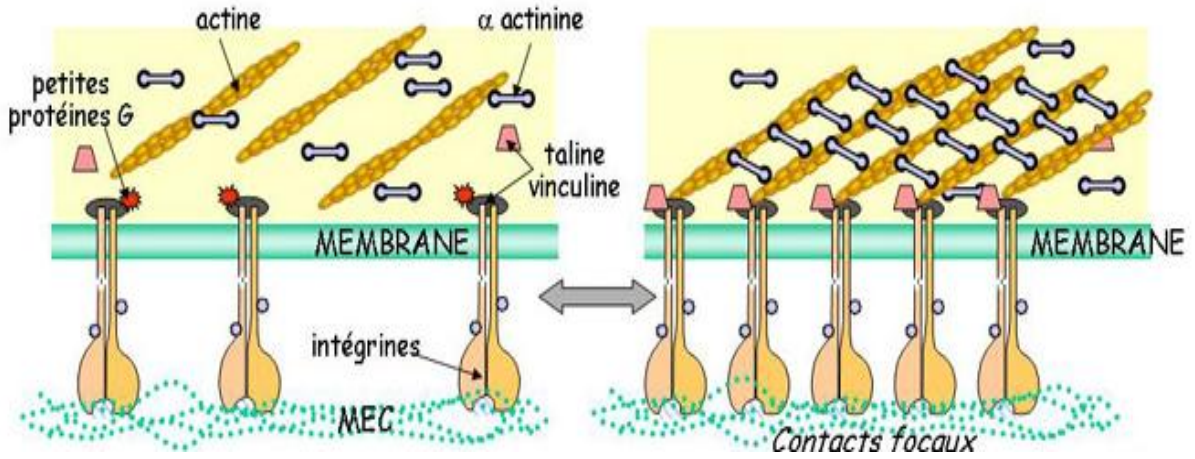


Figure 11 : Réorganisation du cytosquelette *via* les intégrines.

L'adhésion de la MEC à la surface des cellules *via* les intégrines entraîne la signalisation et la clusterisation des intégrines. Le complexe de signalisation se compose des intégrines, de la partie cytoplasmique (la vinculine, l'α-actinine et la taline) qui se lient avec le cytosquelette d'actine. La signalisation des intégrines conduit à l'activation ou à l'inactivation de petites protéines G (par exemple, Rho et Rac). Ces protéines G affectent la polymérisation d'actine et la contractilité de l'actomyosine. Les interactions entre ces protéines dans le complexe d'adhésion focale permettent de moduler le complexe actine/myosine afin de réaliser la réorganisation du cytosquelette *via* les intégrines.

Dans les intégrines, l'$\alpha_v\beta_3$ est un récepteur multifonctionnel qui se lie à la séquence RGD (Arg-Gly-Asp) et participe à la migration et l'adhésion des CML (Sajid et al. 2002; Heerkens et al. 2007) (Martinez-Lemus et al. 2004). L'intégrine $\alpha_5\beta_1$ est le récepteur principal de la FN qui est aussi impliqué dans l'adhésion des CML (Cai et al. 2009). Au cours du remodelage artériel, les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_5\beta_1$ sont responsables de l'initiation et du maintien de la contraction musculaire pour réguler la réponse myogénique des composants contractiles (Wu et al. 2001). Il a été montré qu'une augmentation des métalloprotéases (MMPs) est aussi provoquée par l'activation de l'intégrine αvβ3, ce qui facilite la mobilité des CML (Bendeck et al. 2000; Bendeck et al. 2001).

1.4.3. Métalloprotéases (MMPs) dans le remodelage vasculaire

Le remodelage de la paroi vasculaire, qu'il soit physiologique ou pathologique, est associé à une dégradation, une réorganisation et/ou à une accumulation de la MEC. Ces phénomènes nécessitent l'implication de protéases spécifiques, par exemple, les collagènases (MMP1 et 13) et gélatinases (MMP2 et 9), ces MMPs sont capables de dégrader la MEC et peuvent moduler le remodelage vasculaire (Intengan et al. 2001) (Figure 12).

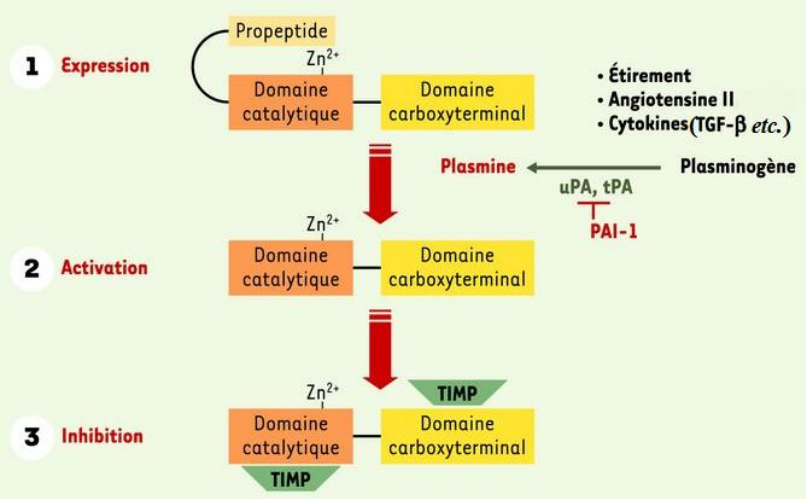


Figure 12 : Régulation de l'activité des MMPs.

L'expression des MMPs peut être stimulée par l'étirement mécanique, par des peptides comme l'angiotensine II, ou par certaines cytokines comme le « tumor necrosis factor-β » (TGF-β). Ces MMPs sont sécrétées sous forme de zymogène et activées par d'autres MMPs, ou par des sérine-protéases telles que la plasmine. L'activité protéolytique des MMPs peut être inhibée par des « tissue inhibitors of metalloproteinases » (TIMPs). Les MMPs constituent une famille de protéases impliquées dans la dégradation protéolytique de nombreuses protéines de la MEC mais aussi de protéines non matricielles. « urokinase-type plasminogen activateur » (uPA) ; « tissue-type plasminogen activator » (tPA) ; « plasminogen activator inhibitor-1 » (PAI-1)

Adaptée d'après http://www.erudit.org/revue/ms/2004/v20/n6-7/008683ar.html

Dans la famille des MMPs, les gélatinases possédant des propriétés élastolytiques sont principalement MMP2 (gélatinase A, 72 kDa) et MMP9 (gélatinase B, 92 kDa). Ces gélatinases sont impliquées dans la migration des CML et aussi dans la formation de la néo-intima par leurs capacités à se lier aux cellules et à dégrader les protéines adhésives cellulaires. Ces MMPs peuvent également de façon indirecte activer les facteurs de croissance, par exemple, le « vascular endothelial growth factor » (VEGF), et participent donc à la prolifération et la survie des CML notamment par activation de la voie FAK-PI3K (Newby 2006). Les MMPs peuvent aussi influer sur l'apoptose des CML par clivage de ligands tels que le « tumor necrosis factor-α » (TNF-α), le ligand Fas et leurs récepteurs, ce qui provoquent l'apoptose en agissant de façon autocrine ou paracrine (Newby 2006). Les MMPs également jouent des rôles importants dans le développement et la réparation tissulaire (Woessner 1991; Woessner et al. 1991). Elles peuvent soit remodeler les composants membranaires basiques en favorisant la migration de laminine, de collagène de type IV ou des cellules libres, soit dégrader des composants membranaires comme le collagène de type I.

Ainsi, les MMPs régule le comportement des CML vasculaire par clivage de substrats de matrice et non-matrice (Newby 2006).

1.5. Thrombose et remodelage vasculaire

1.5.1. Coagulation physiologique

Le système de la coagulation comprend 3 éléments : 1) l'adhésion, l'activation, et l'agrégation plaquettaire ; 2) la formation de fibrine ; 3) la fibrinolyse. Physiologiquement, c'est une partie importante de l'hémostase où la paroi endommagée d'un vaisseau sanguin est recouverte d'un caillot de fibrine pour arrêter l'hémorragie. La formation du thrombus repose sur deux systèmes : la mise en route du système de la coagulation d'une part, l'activation plaquettaire d'autre part. L'activation de l'un ou l'autre système se fait selon des conditions environnementales différentes. Les flux sanguins lents favorisent la coagulation plasmatique, alors que les flux rapides favorisent la participation des plaquettes et leur activation (Figure 13).

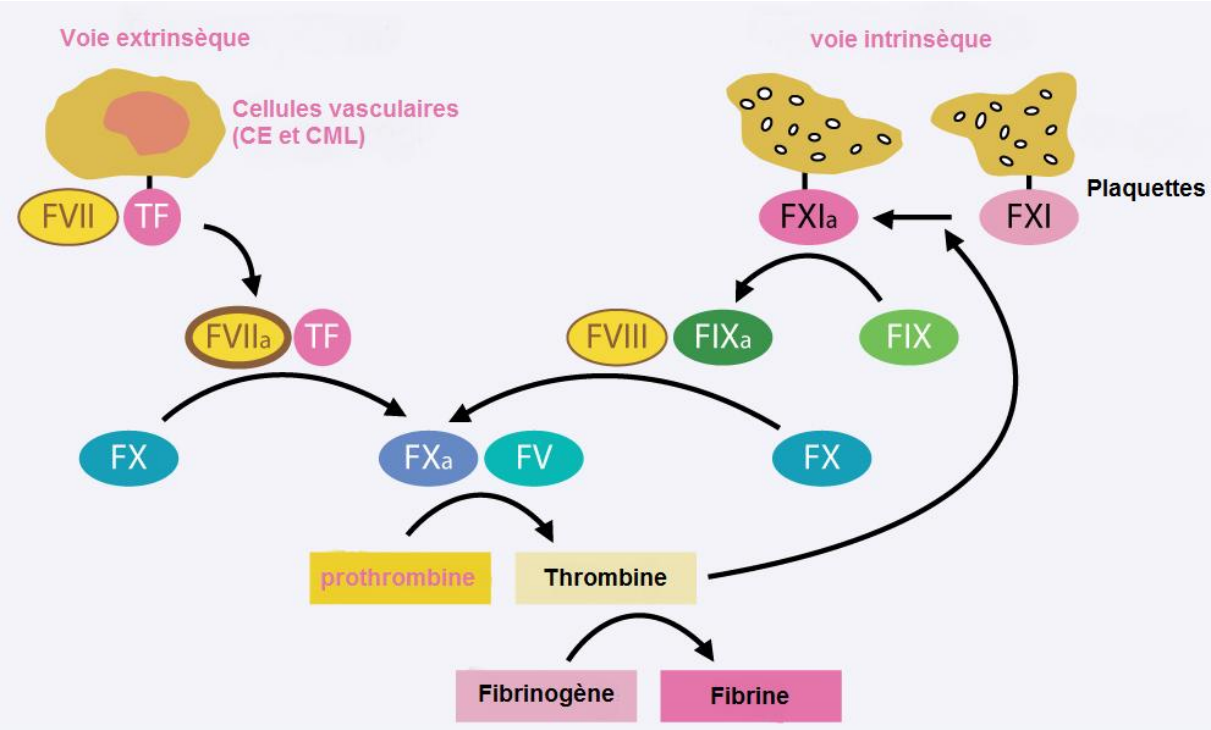


Figure 13 : Cascade de la coagulation.

La formation de la fibrine à partir du fibrinogène, est régulée par un réseau de sérine-protéases plasmatiques activées séquentiellement aboutissant en l'activation de la thrombine. La production de fibrine peut être initiée par l'activation de la cascade de la coagulation par la voie extrinsèque, initiant la coagulation en réponse à une lésion tissulaire (cas de traumatismes ou de chirurgies) et par la voie intrinsèque, impliquant la présence de tous les éléments nécessaires à la coagulation sanguine même en l'absence de blessure.

Adaptée d'après http://www.briankelley.com/tara/cat/moduleArticle?id=2

Dans les conditions physiologiques, le système hémostatique est mis en action par un stimulus démasqué par la brèche vasculaire et reste localisé. L'étape-clé de la coagulation est la génération de thrombine (Butenas et al. 2002). La thrombine n'a pas, contrairement à son précurseur, la prothrombine, de domaine de liaison aux phospholipides chargés négativement, elle peut donc diffuser, mais rencontre des inhibiteurs comme l'antithrombine. Les traitements anticoagulants à visée antithrombotique sont des inhibiteurs de la thrombine ou de sa génération.

1.5.2. Etat hypercoagulant

La pathophysiologie de l'hypertension essentielle et de ses complications semble reposer principalement sur l'inflammation et sur la dysfonction endothéliale. L'inflammation peut provoquer la dysfonction endothéliale et les deux sont impliquées dans la thrombogénèse et dans l'athérogénèse (Lip et al. 1998; Kakar et al. 2007). L'hypertension est donc associée à un état pro-thrombotique et hypercoagulant. Ainsi, l'activation du système plaquettaire entraîne la formation d'un thrombus qui va être renforcé du fait de l'état hypercoagulant. Le premier système impliqué repose sur des mécanismes d'activation cellulaire et aboutit à l'agrégation plaquettaire. Le second système est un système moléculaire qui aboutit à la transformation du fibrinogène en fibrine.

Ainsi, dans le cascade de formation d'une thrombose coronaire, 3 processus sont observables :1) une diminution ou une perturbation du flux sanguin : la sténose coronaire ; 2) une lésion de la paroi du vaisseau : la plaque instable ; 3) une perturbation de l'équilibre procoagulation-anticoagulation du sang : la thrombogénicité. Dans les « syndromes coronaires aigüs » (SCA), la rupture ou l'érosion de la plaque mettent en contact le sang circulant avec les éléments thrombogènes de la MEC, provoquant la génération de traces de thrombine, l'activation des plaquettes et la coagulation menant à la formation du thrombus.

Dans les artères malades ayant des plaques d'athérome, la formation de plaque se déroule *via* différentes étapes, telles que la modification de la perméabilité endothéliale ; la migration, la prolifération et l'apoptose des CML; la formation des cellules spumeuses ; l'activation de lymphocytes T ; la modification de l'adhésivité plaquettaire, l'adhésion et l'accumulation de lymphocytes. Lorsque la plaque d'athérome devient instable, elle peut se rompre et sa rupture va produire des emboles, la circulation sanguine va les transporter et aggraver l'effet de thrombose *in vivo* (Figure 14). En ce cas, on note souvent une augmentation de la tension artérielle induite par un changement de la circulation. Puis, les signaux mécaniques produits par le remodelage et la déformation artérielle seront transmis par les intégrines vers l'intérieur des cellules.

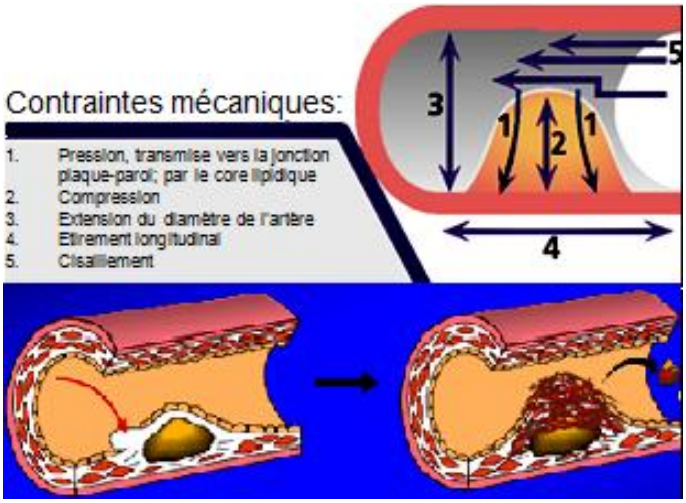


Figure 14 : Rupture de plaque et la formation des emboles.

Après un certain temps, l'athérosclérose entraîne un épaississement et un durcissement des parois artérielles, et l'artère se rétrécit jusqu'à ce que la circulation sanguine soit réduite. Ces artères deviennent donc vulnérables aux lésions. Si elles se déchirent, un caillot peut se former, obstruant ainsi complètement l'artère déjà rétrécie et interrompant l'oxygénation d'une partie du cœur ou du cerveau. De plus, l'augmentation de la tension artérielle à cause du remodelage vasculaire due à cette déformation du vaisseau provoquera des contraintes mécaniques complémentaires et anormales qui aggrave l'effet de thrombose et produire des embolies.

1.5.3. Thrombine influe sur le remodelage vasculaire

Dans le système hémostatique, la thrombine joue un rôle central. Elle est, non seulement un facteur de coagulation, mais aussi une protéase multifonctionnelle impliquée dans la régulation du tonus des vaisseaux, dans la prolifération, la différenciation et la migration des CML ; dans le developement vasculaire ; dans l'athérosclérose et dans l'angiogenèse (Figure 15) (Patterson et al. 2001). Vu *et al.* ont dévouvert le premier récepteur de la thrombine, maintenant dénommé PAR1 et ce recepteur est activé par le clivage protéolytique de son domaine extracellulaire (Vu et al. 1991).

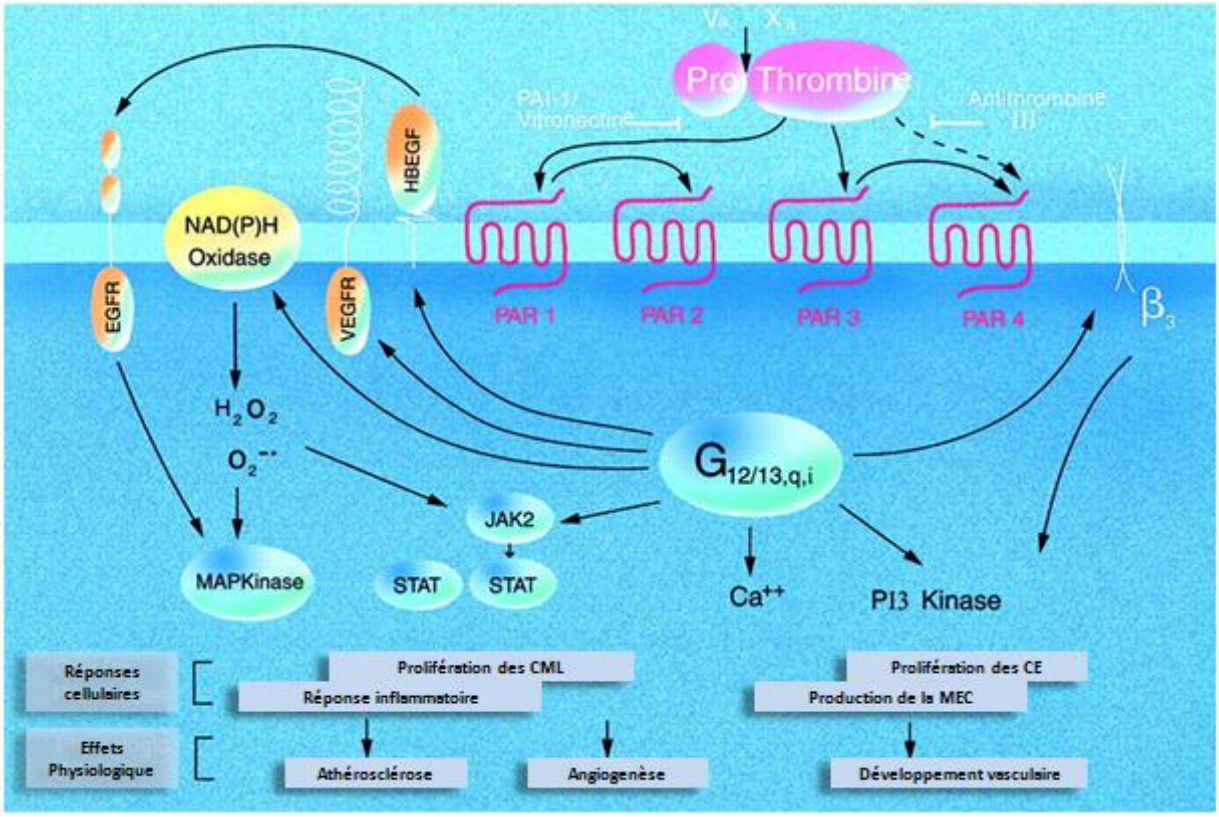


Figure 15 : Diversité de la signalisation de thrombine et ses effets physiologiques dans les cellules vasculaires.

L'interface entre la coagulation et la paroi vasculaire est complexe, et la frontière entre ces deux systèmes ne peut pas être définie simplement. Il n'est pas surprenant, alors, que la molécule centrale de la coagulation sangine, la thrombine, a aussi de profonds effets sur plusieurs aspects biologiques de la paroi vasculaire, comme la prolifération, la différenciation, la migration des CML ou des CE, la réponse inflammatoire, la production de la MEC, le développement vasculaire, l'athérogenèse et l'angiogenèse.

Adaptée d'après (Patterson et al. 2001)

Au niveau physiologique, l'interaction de la thrombine et son recepteur PAR1 dans les CML permet aux cellules de se relaxer et se contracter par la production des différentes molécules (Figure 16). Au niveau pathophysiologique, la thrombine peut agir comme un facteur de croissance participant à la régulation de la prolifération des CML dans le remodelage vasculaire. Ce remodelage intervient dans le processus de l'athérosclérose, de l'hypertension et de la resténose. Les récepteurs PAR1, 2 et 4 potentialisent les effets de la thrombine sur la migration (McNamara et al. 1993), la prolifération et l'hypertrophie des CML (Borissoff et al. 2009). En réponse aux contraintes mécaniques (20% de déformation), on note une augmentation de l'expression de PAR1 dans les CML, qui participe à la prolifération cellulaire induite par la thrombine (Nguyen et al. 2001). Il a été montré que les trois MAP

kinases : ERK , JNK et p38MAPK, peuvent être activées par la thrombine dans les CML (Rao et al. 1995; Rao et al. 1996; Kanda et al. 2001). En effet, la thrombine participe à la régulation de plusieurs réponses cellulaires comme la prolifération, la différenciation et l'apoptose par l'intermédiaire de ces voies de signalisation.

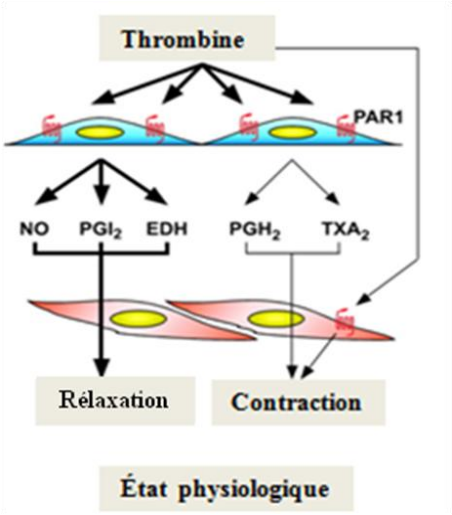


Figure 16 : Effets de la thrombine sur les CML par PAR1 en état physiologique.
monoxyde d'azote (NO) ; prostacycline (PGI2) ; hyperpolarisation dépendante de l'endothélium (EDH) ; prostaglandine H2 (PGH2) ; thromboxane A2 (TXA2)
Adaptée d'après (Hirano et al. 2003)

La thrombine est donc un agent mitogène pour les CML (McNamara et al. 1993) et elle joue un rôle critique dans les processus d'inflammation (Martin et al. 2009). La thrombine peut induire l'expression des facteurs inflammatoires tels que l'interleukine-6 (IL-6) dans les CML (Tokunou et al. 2001). La thrombine est également capable d'augmenter la sécrétion des MMP qui dégradent la MEC et donc accélèrent le remodelage vasculaire (Zucker et al. 1995; Galis et al. 1997).

2. Relation structure-fonction des intégrines

2.1. Famille des intégrines

Les intégrines sont des glycoprotéines membranaires et constituent la plus grande famille des récepteurs d'adhésion. Ce sont des récepteurs de surface cellulaire pour des constituants de la MEC. Les intégrines interviennent dans les réactions d'adhésion entre cellules, ou entre cellules et MEC. Elles sont à la fois des molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire *via* des constituants spécifiques de la MEC et des récepteurs capables de transduire un signal. Leur expression est très étendue puisqu'on les retrouve à la surface de toutes les cellules eucaryotes (Hynes 2002). Les intégrines sont composées de deux sous-unités

transmembranaires différentes : la chaîne α qui fixe des cations divalents et la chaîne β qui possède un domaine rich en cyctéine. On peut différencier 3 domaines : l'un extracellulaire (extrémité amino-terminale ou N-terminale), l'un transmembranaire et le dernier intracellulaire (en carboxy-terminale ou C-terminale). Chez les mammiferes, on a découvert actuellement 18 sous-unités α et 8 sous-unités β. A ce jour, on dénombre 24 couples (dimères) αβ fonctionnels. La spécificité de liaison dépend du domaine extracellulaire des sous-unités α. Les intégrines présentes *in vivo* dans les CML adultes sont $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$, et permettent des liaisons avec des séquences spécifiques. Elles sont donc classifiées comme des récepteurs du collagène, des récepteurs de RGD, des récepteurs de laminine et des récepteurs spécifiques des lymphocytes (Figure 17).

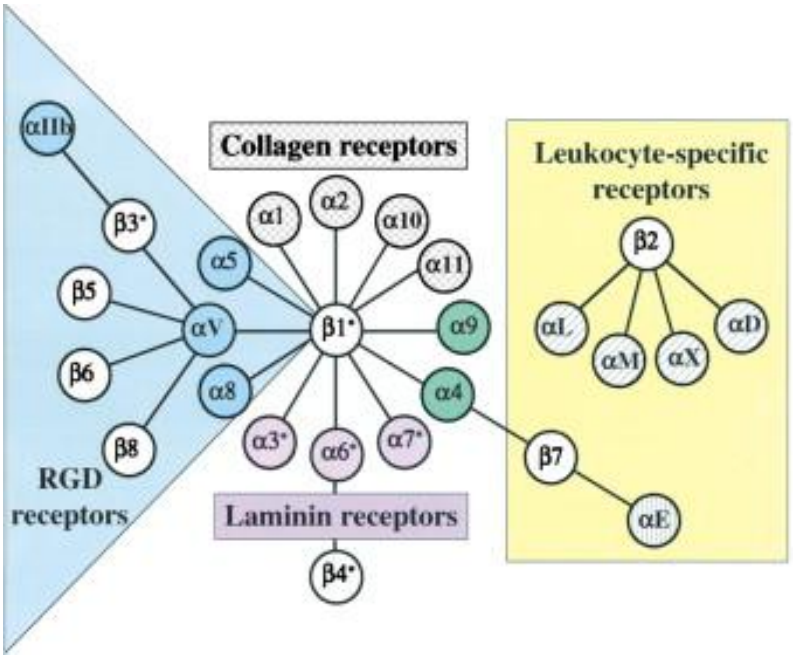


Figure 17 : Classification des intégrines.

Adaptée d'après (Hynes 2002)

2.2. Structure des intégrines

2.2.1. Structure des sous-unités α

Les sous-unités α des intégrines sont composées de 940 à 1140 acides aminés (masse moléculaire comprise entre 120 et 180 kDa). Elles comportent toutes une courte partie cytoplasmique C-terminale. En fonction de leur structure, les sous-unités α peuvent être réparties en deux groupes. Le premier groupe comprend les sous-unités α_3, α_4, α_5, α_6, α_7, α_8, α_9, α_{IIb} et α_v qui subissent un clivage post-transcriptionnel lors de leur maturation. Ce clivage génère une chaîne lourde (~125 kDa) entièrement extracellulaire et une chaîne légère (~25 kDa) qui contient le domaine transmembranaire et la partie cytoplasmique. Les deux chaînes

sont reliées par un pont disulfure unique. La sous-unité α_4 constitue une exception dans ce groupe car son clivage génère deux chaînes de 70 et 80 kDa (Takada et al. 1989). Le deuxième groupe comprend les sous-unités α_1, α_2, α_{10}, α_{11}, α_D, α_E, α_L, α_M et α_X. Ces sous-unités ne subissent pas de clivage post-traductionnel, mais comportent un domaine supplémentaire dans la partie extracellulaire, appelé domaine I (I pour insertion) (Liddington et al. 1998) ou encore domaine A [A pour son homologie avec le domaine A du von Willebrand (vWF)] (Colombatti et al. 1993). La sous-unité α_E, qui subit le clivage post-traductionnel du premier groupe mais qui comporte le domaine I du deuxième groupe des sous-unités α, constitue une exception et est classée dans le deuxième groupe à cause de sa chaîne extracellulaire très courte (158 résidus), qui ne ressemble guère aux sous-unités α du premier groupe (Shaw et al. 1994). L'hétérogénéité structurale et fonctionnelle des sous-unités α est renforcée par l'existence de différents ARNm provenants d'épissage alternatif aussi bien au niveau du domaine extracellulaire (α_6, α_7 et α_{IIb}) qu'au niveau des parties cytoplasmiques (α_3, α_6 et α_7) (de Melker et al. 1999).

2.2.2. Structure des sous-unités β

Les sous-unités β des intégrines sont composées de 730 à 800 acides aminés (masse moléculaire entre 90 et 110 kDa) sauf l'intégrine β_4 qui compte 1820 acides aminés. Les trois premières sous-unités découvertes, β_1, β_2 et β_3, ont donné lieu à trois sous-groupes d'intégrines :

- le sous-groupe « very late antigen » (VLA) (nommé d'après l'expression tardive à la surface de lymphocytes T après stimulation antigénique) composé par les intégrines β_1 (Hemler et al. 1987). Il regroupe les récepteurs pour les collagènes ($\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_9\beta_1$), les laminines de la membrane basale sous-épithéliale ($\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ et $\alpha_7\beta_1$) et la FN ($\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_8\beta_1$) (Plow et al. 2000).
- le sous-groupe des intégrines leucocytaires qui comporte les intégrines β_2 (Kishimoto et al. 1987). Il joue un rôle important dans le processus inflammatoire en assurant l'extravasation des leucocytes vers les sites infectieux (Carlos et al. 1994).
- le sous-groupe des cytoadhésines correspondant aux intégrines β_3 (Ginsberg et al. 1988). Il comporte uniquement deux intégrines: l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, récepteur du fibrinogène, et l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, récepteur de la vitronectine (VN). Alors que l'intégrine $a_{IIb}\beta_3$ est exprimée par les plaquettes et mégacaryocytes, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est retrouvée sur un grand nombre de cellules comme les CE, les CML, les macrophages, les lymphocytes B et les ostéoclastes (Kieffer et al. 1990; Felding-Habermann et al. 1993).

2.2.3. Structure de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

De nombreuses études structurales, essentiellement sur les parties extracellulaires de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et sur les parties cytoplasmiques de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, ont permis de mieux

comprendre le fonctionnement des intégrines et leur mécanisme d'activation. Un diagramme en rubans des deux conformations adoptées par la partie extracellulaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a été montré (Xiong et al. 2002) par des images prises en microscopie électronique après marquage négatif de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ recombinante en solution (Takagi et al. 2002). Voici un schéma des structures repliée (conformation inactive) et étendue (conformation active) (Figure 18).

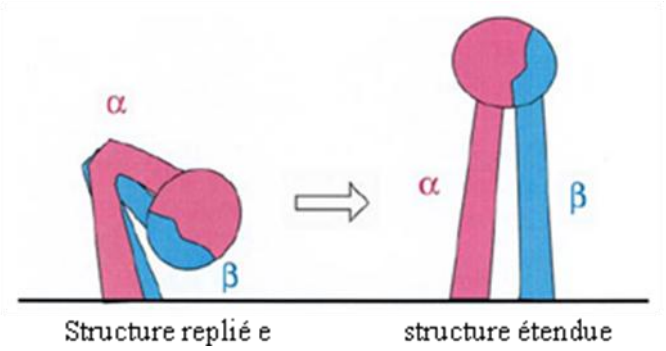


Figure 18 : Structures repliée et étendue de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

D'une structure repliée dans sa forme en repos l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ passe à une conformation étendue dans sa forme active.

Adaptée d'après (Takagi et al. 2002)

Les parties intracellulaires des intégrines possèdent des domaines de liaison pour des molécules du cytosquelette. Dans le cas de la taline, protéine du cytosquelette indirectement liée aux micro-filaments, sa liaison avec la partie cytoplasmique de la sous-unité β conduit à des réarrangements conformationnels des domaines extracellulaires de l'intégrine qui augmentent leur affinité. Ainsi, cette liaison est la dernière étape commune des cascades de signalisation cellulaire qui contrôlent l'activation d'intégrines (Tadokoro et al. 2003). En se liant à des molécules extracellulaires et aux micro-filaments intracellulaires, les intégrines traduisent les signaux de la MEC vers la cellule et régulent l'interaction entre le cytosquelette et la MEC.

2.3. Fonction des intégrines

Les deux principales fonctions des intégrines sont :

-l'attachement de la cellule à la MEC. Lors de cette interaction, les intégrines se regroupent en complexe, augmentant l'activité pour leurs ligands. Ce phénomène est connu sous le nom de « clustering ». La connexion de ces complexes au cytosquelette d'actine, *via* l'interaction avec

des protéines cytoplasmiques, résulte dans la formation de la plaque d'adhésion focale qui constitue les points d'ancrage de la cellule à la MEC.

-la transduction de signaux de la MEC vers la cellule. Cette fonction des intégrines est de transmettre des signaux à travers la membrane plasmique et cela de manière bidirectionnelle, en signalisation « inside-out » et en signalisation « outside-in ». Lors de la signalisation « inside-out », l'affinité des intégrines pour leur ligand extracellulaire est augmentée dans un délai inférieur à la seconde. Expérimentalement, l'activation des intégrines par la signalisation « inside-out » peut être mesurée par la liaison des anticorps spécifiques ou de leurs ligands. Une fois liées à leur ligand, elles activent des voies de transduction intracellulaire faisant intervenir des protéines kinases. En revanche, la signalisation « outside-in » commence par l'adhésion à leurs ligands pour induire le regroupement des intégrines. En général, la voie « outside-in » *via* les intégrines aboutit à renforcer l'adhérence cellulaire et la migration cellulaire.

2.4. Signalisation des intégrines

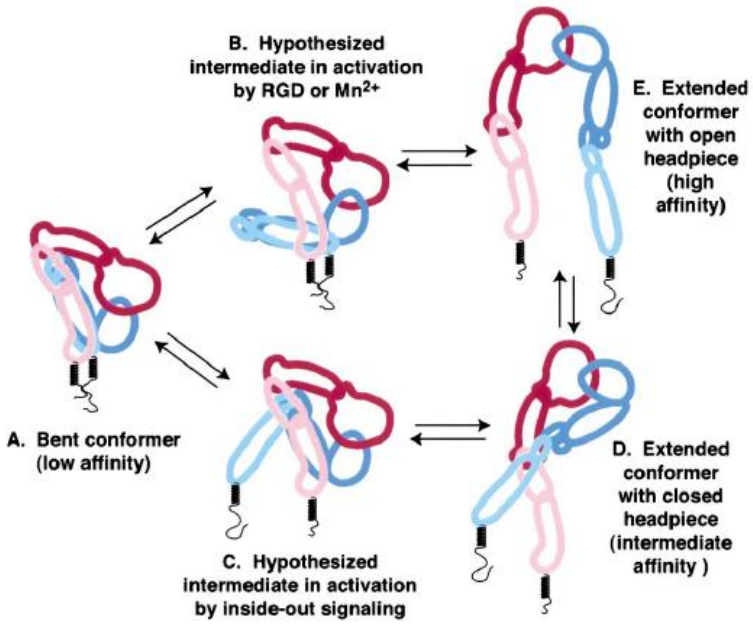


Figure 19 : Réarrangements structuraux dans l'activation des intégrines.

Adaptée d'après (Takagi et al. 2002)

Lorsque l'intégrine est dans sa conformation inactive, les domaines extracellulaires adoptent une structure en V (Figure 19 A), ramenant le site d'interaction pour un ligand potentiel proche de la membrane. Lors de l'activation de l'intégrine qu'elle soit le type, « outside-in » ou « inside-out », le détachement d'une protéine inhibitrice ou la fixation d'une protéine activatrice au niveau des domaines cytoplasmiques induisent leur séparation spatiale (Figure

19 C, D). Cette séparation induit à son tour un changement conformationnel qui se propage à travers la membrane redressant les domaines extracellulaires. Dans le processus « outside-in » (Figure 19 B, E), le site d'interaction avec un ligand potentiel, à l'interface des deux sous-unités, est ainsi éloigné de la membrane et adopte une conformation active (Figure 19 E). L'interaction d'un ligand extracellulaire peut alors induire un deuxième changement conformationnel de l'intégrine, se propageant à travers la membrane jusqu'aux parties cytoplasmiques et induisant des cascades de signalisation intracellulaire (Takagi et al. 2002).

2.4.1. Signalisation « outside-in »

Il est clairement établi aujourd'hui que les intégrines ne se limitent pas à lier des protéines adhérentes extracellulaires mais qu'elles agissent également en tant que véritables récepteurs transmettant une information de signalisation intracellulaire. La signalisation « outside-in » est un mécanisme commun des récepteurs membranaires et qui n'est donc pas propre aux intégrines. La plupart des ligands des intégrines sont multivalents, leur interaction avec la partie extracellulaire des intégrines induit le regroupement des intégrines au niveau de la membrane plasmique en complexes appelés «clusters». Ces complexes peuvent alors recruter des protéines de signalisation au niveau cytoplasmique et induire des cascades de signalisation intracellulaire. Il est généralement admis que c'est le regroupement des intégrines qui induit la transduction de signaux de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule (Giancotti et al. 1999; Abram et al. 2009).

Par exemple, lors de la fixation d'une molécule de fibrinogène aux CML, des signaux intracellulaires spécifiques sont émis grâce aux protéines effectrices recrutées très rapidement à proximité de la partie cytoplasmique de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et de façon indépendante à la polymérisation d'actine (Miranti et al. 1998). Cette phase initiale du mécanisme de signalisation « outside-in » va contribuer à activer l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Lors du regroupement des intégrines et de la formation d'un complexe constitué de protéines de signalisation et de protéines structurales du cytosquelette d'actine, une interaction forte entre $\alpha_{IIb}\beta_3$ et ce cytosquelette se constitue et conduit alors à la formation de plaques d'adhésion focale.

Toutefois, le regroupement en lui-même n'est pas suffisant pour induire une signalisation « outside-in » complète (Hato et al. 1998). La signalisation « outside-in » nécessite également des changements conformationnels au niveau des intégrines (Zhu et al. 2007).

Suite à la fixation du ligand à l'intégrine, la signalisation « outside-in » s'accompagne de changements structuraux au niveau des parties cytoplasmiques de l'intégrine et de l'activation des kinases de la famille Src. « Src familly kinases » (SFK) peut aussi activer la FAK en aboutissant au recrutement et à la phosphorylation de PI3K. La phosphorylation des

nombreuses molécules adaptatrices va alors conduire à des remaniements du cytosquelette d'actine.

2.4.2. Signalisation « inside-out »

L'activation de la signalisation « inside-out » résulte en une augmentation de l'affinité de l'intégrine pour son ligand extracellulaire (Takagi et al. 2002). Des études structurales, réalisées à l'aide d'anticorps, ont montré que l'activation des intégrines correspond à un changement conformationnel, initié au niveau des parties cytoplasmiques se propageant à travers les parties transmembranaires jusqu'aux domaines extracellulaires (Liddington et al. 2002; Takagi et al. 2002; Calderwood 2004).

Lorsque l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ a une conformation repliée, les chaînes α et β sont maintenues à proximité dans leur partie cytoplasmique par un pont ionique. L'activation des cellules permet le recrutement de la taline activée. Il a été montré que la taline est incorporée de manière séquentielle et régulée dans les régions d'adhésions focale. La maturation de ces stuctures se caractérise par l'évolution spatiotemporelle de leur composition protéique qui définit alors les voies de signalisation en aval des intégrines (Tranqui et al. 1995; Tadokoro et al. 2003; Ziegler et al. 2008). Nous allons discuter en détail de la taline dans la partie 2.4.4.1. La voie de phosphorylation FAK-AKT peut activer la calpaïne qui pourra alors cliver la taline (Yan et al. 2001). Ceci conduit à la séparation des parties cytoplasmiques de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ résultant en une forme activée de haute affinité pour ses ligands (Vinogradova et al. 2002; Abram et al. 2009).

Voici un tableau permettant de résumer les fonctions des différents intégrines (Tableau 1).

Tableau 1 : Classification et fonctions des intégrines.

Intégrine		Ligand*	Fonctions	Référence
β_1	$\alpha_{1\text{-}11}$, α_v	Collagène, Laminine et RGD	Développement embryonnaire Adhésion des plaquettes et agrégation dans l'hémostase et la thrombose (« Outside-in » intégrine impliquée dans la signalisation plaquettaire) Implication dans l'invasivité cellulaire	(Stephens et al. 1995) (Czuchra et al. 2006; Nieswandt et al. 2009) (Destaing et al.)
β_2[#]	α_L, α_M, α_x, α_D	Leucocyte spécifique	Phénomènes d'adhésion cellulaire impliqués dans de nombreuses réponses inflammatoires Implication dans : dermatite chroniques; défauts des cellules-T; augmentation du nombre des neutrophiles; leucocytose; augmentation de la susceptibilité aux infections bactériennes	(Wilson et al. 1993) (Scharffetter-Kochanek et al. 1998)
β_3	α_v, α_{IIb}	RGD (VN *etc.*)	Maintenance des fonctions plaquettaires (signalisation bidirectionnel des intégrines) Hémorragiques pathologiques (« Inside-out » : signalisation des intégrines *via* la liaison de taline)	(Hodivala-Dilke et al. 1999; Law et al. 1999) (Petrich et al. 2007)
β_4	α_6	Laminine	Développement tumoral	(Raymond et al. 2007)
β_5	α_v	RGD (VN *etc.*)	Activation de la résorption osseuse Développement tumoral	(Lane et al. 2005) (Bianchi et al.)
β_6	α_v	RGD (FN *etc.*) spécifique	Modulation de l'invasion, inhibition de l'apoptose, régulation de l'expression des MMPs et activation du TGF-beta1	(Bandyopadhyay et al. 2009)

		épithélial		
β_7[#]	α_4, α_E	Spécifique leucocyte	Agent inflammatoire	(Dubree et al. 2002)
β_8	α_v	RGD (VN *etc.*)	Régulateur négatif de la croissance cellulaire	(Cambier et al. 2000)

*L'aptitude qu'à une intégrine de reconnaître un ou plusieurs ligands dépend de l'entourage du site de liaison du ligand protéique et de l'état d'activation de l'intégrine. [#]Les intégrines ayant une sous-unité β_2 ou β_7 sont exclusivement exprimées à la surface des leucocytes.

2.4.3. Adhésion focale

2.4.3.1. Signaux des intégrines dans l'adhésion focale

Lors de l'adhérence d'une cellule à la MEC, les intégrines se regroupent à la surface membranaire en complexes et constituent alors les véritables points d'ancrage cellule-MEC. Ces complexes s'organisent d'abord à la périphérie de la cellule où ils sont appelés complexes focaux ou points focaux. Les complexes focaux peuvent croître lors de leur maturation pour former les plaques d'adhésion focale (Rottner et al. 1999; Ballestrem et al. 2001).

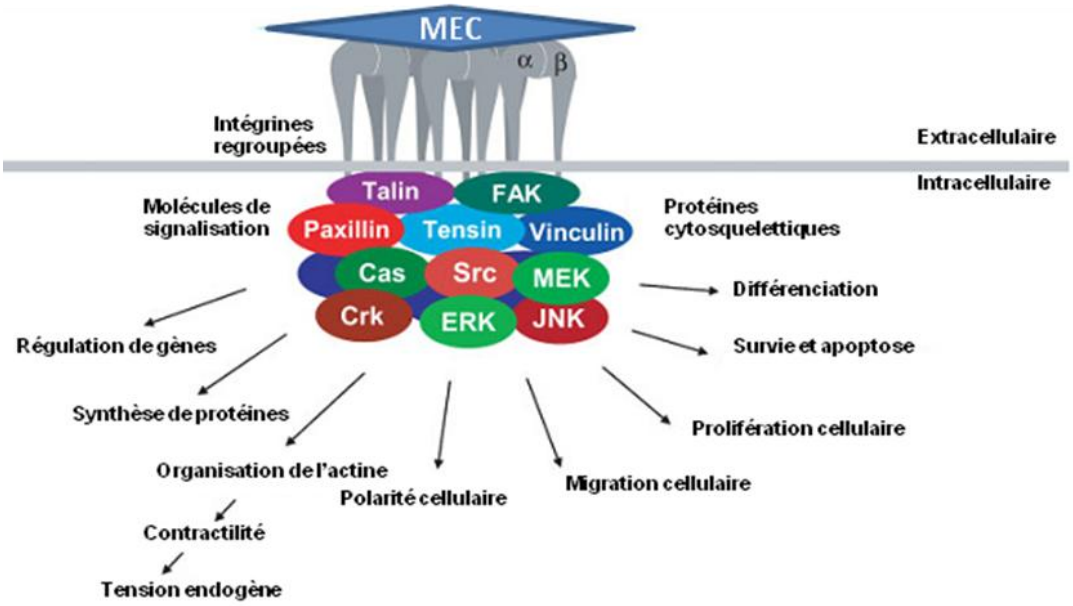


Figure 20 : Modèle général de l'adhésion cellule-MEC.

Un modèle général des adhérences cellules-matrice et de leur régulation en aval. L'adhérence cellule-MEC contenant des grappes d'intégrines recrute des protéines cytoplasmiques qui, en coopération avec d'autres récepteurs de surface cellulaire contrôlent divers processus cellulaires, les fonctions et les phénotypes.

Adaptée d'après (Berrier et al. 2007)

La formation des plaques d'adhésions focales, processus dynamique, passe par l'activation des intégrines et par des phénomènes de phosphorylation-déphosphorylation d'un grand nombre de protéines régulatrices intracellulaires conduisant alors à des réorganisations spatiales (Yamada et al. 1995). Ces plaques d'adhésions focales assurent également le lien mécanique entre la MEC et le cytosquelette. Elles sont constituées de nombreuses protéines cytoplasmiques structurales ou adaptatrices comme la vinculine, la paxilline, la taline, la tensine, la filaminine, l'α-actinine et l'actine (Figure 20) (Berrier et al. 2007). Ces structures jouent un rôle important dans la transmission des forces mécaniques au sein du tissu (Romer et al. 2006).

2.4.3.2. Liaison intégrine-actine dans les plaques d'adhésions focales

Au niveau moléculaire, il existe un feed-back entre le cytosquelette d'actine et l'adhésion cellulaire réalisée par les intégrines (Figure 21) (Geiger et al. 2009).

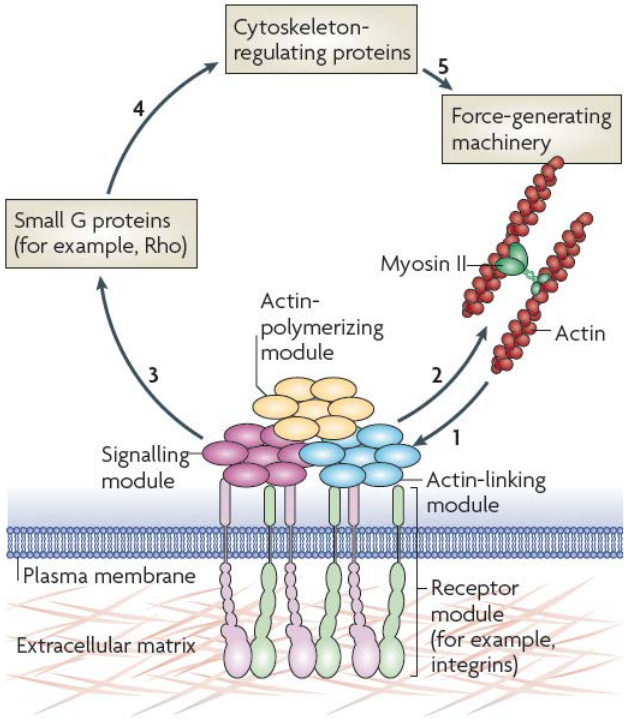


Figure 21 : Interaction du cytosquelette d'actine avec l'adhésion focale.

La myosine II est la protéine qui constitue l'appareil contractile des cellules musculaires.

Adaptée d'après (Geiger et al. 2009)

Dans la première étape de l'interaction du cytosquelette d'actine avec l'adhésion focale, les forces générées par la polymérisation d'actine et la contractilité myosine II-dépendante affectent :

- les protéines spécifiquement mécano-sensitives (la taline et la vinculine) dans le module de liaison d'actine;
- le module des récepteurs (les intégrines $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$) et leurs corécepteurs (la syndécane 4) (Morgan et al. 2007);
- le module associé à la polymérisation d'actine et le module de signalisation (FAK et p130 Cas). Ainsi ces modules en interaction, agissant de concert, forment un réseau mécano-sensible.

Dans la deuxième étape de l'interaction du cytosquelette d'actine avec l'adhésion focale, les effets sur le cytosquelette d'actine dépendent de la réponse intégrée de l'ensemble de ces modules (Figure 21). Cette réponse est un reflex du système entier à la force mécanique appliquée et des interactions entre la MEC et des cellules.

Dans la troisième étape de l'interaction du cytosquelette d'actine avec l'adhésion focale, la stimulation du module de la signalisation résulte de l'activation des « Guanine nucleotide exchange factors » (GEFs) et des « GTPase-Activating Proteins » (GAPs), conduisant à l'activation ou à l'inactivation de petites protéines G, telles que Rho et Rac.

Dans la quatrième étape de l'interaction du cytosquelette d'actine avec l'adhésion focale, ces protéines G affectent la polymérisation d'actine et la contractilité de l'actomyosine grâce aux protéines de régulation du cytosquelette.

Dans la dernière étape de l'interaction du cytosquelette d'actine avec l'adhésion focale, ces interactions permettent de moduler le complexe actine/myosine (Figure 21).

2.4.3.3. Mécano-sensitivité de l'adhésion focale

L'assemblage des plaques d'adhésions focales dépend du système d'actine, et peut être renforcé par l'application de contraintes mécaniques *via* ce système (Geiger et al. 2009). Les contraintes mécaniques sont impliquées dans des problèmes de déploiement de plusieurs protéines dans les cellules (Vogel 2006; Johnson et al. 2007). Ces modifications de conformation pourraient influencer l'exposition de sites de liasion, par conséquent, moduler le recrutement des composants additionnels aux lieux d'adhésion. Par exemple, la FN subit un dépliage en réponse aux contraintes mécaniques (Smith et al. 2007) (Figure 22).

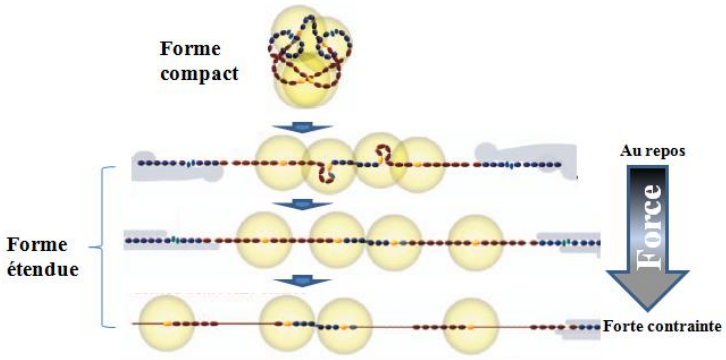


Figure 22 : Changement de conformation de la FN.

Adaptée d'après (Smith et al. 2007)

2.4.4. Protéines de signalisation associées aux intégrines

2.4.4.1. Taline

Dans le mécanisme d'adhérence cellulaire intégrine-dépendant, la taline est une protéine multifonctionnelle du cytosquelette qui joue un rôle central. L'origine du nom taline dérive du mot latin *talus*, la cheville : cela préfigure les propriétés de lien physique et d'articulation de cette molécule, mais aussi sa flexibilité. La taline existe sous deux formes, la taline 1 et 2, mais leur rôle respectif n'a pas encore été précisé. Cette protéine de 225~235 kDa est constituée d'une tête globulaire de 47 kDa au niveau de sa partie amino-terminale, qui peut

être clivée de la partie allongée de 190 kDa par la calpaïne (Franco et al. 2004) (Figure 23). Le clivage de la taline par la calpaïne augmente l'affinité du domaine globulaire pour les intégrines (Yan et al. 2001) et ce clivage a lieu au niveau des adhésions focales (Tranqui et al. 1995).

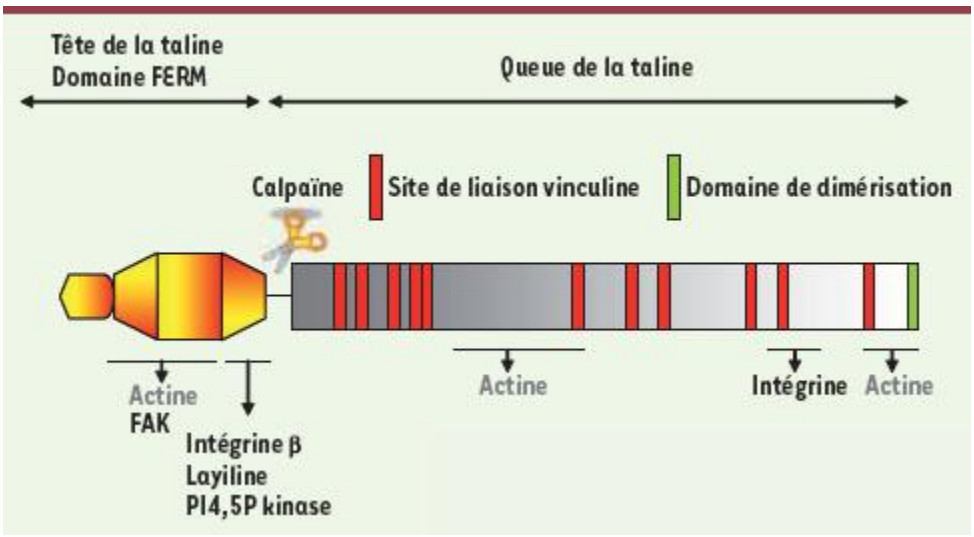


Figure 23 : Structure de la taline.

La taline peut être clivée par la calpaïne en un domaine globulaire (la tête) et un domaine allongé (la queue). Le domaine de dimérisation représente le site d'intéraction entre deux molécules talines au niveau du domaine allongé. De nombreux différents sites d'interaction entre la taline et une certaine molécule identifiés au niveau du domaine globulaire et allongé représentent les résidus de taline auxquels les différents sites ont été associés.

Adaptée d'après (Critchley et al. 2008)

La tête de la taline est responsable de la liasion de la taline avec le domaine cytoplasmique de l'intégrine. Les interactions de la tête de la taline avec des molécules de signalisation telles que la « phosphatidyl inositol diphosphate (4) *P* 5-kinase γ 90 » (PIPγ90), le « phosphatidyl inositol diphosphate (4,5) P_2 » (PIP_2), la FAK, assurent une régulation de la fonction de la taline et influencent l'activation de l'intégrine (Calderwood et al. 2003). La tige carboxy-terminale de la taline contient un site supplémentaire de liaison à l'intégrine, deux sites de liaison à l'actine et plusieurs sites de liaison à la vinculine. Elle serait aussi responsable de l'interaction entre deux monomères de taline conduisant à la formation d'un homodimère antiparallèle.

Ainsi la tige carboxy-terminale de la taline assure le lien avec le cytosquelette, le rôle fondamental de la tête semble être d'activer les intégrines entraînant leur changement conformationnel qui se manifeste par l'extension de leurs domaines extracellulaires (Calderwood et al. 2002; Tadokoro et al. 2003). La taline co-localise avec des intégrines au

niveau de sites d'adhérence cellule-MEC (Burridge et al. 1983; DePasquale et al. 1991) et sa présence est requise pour l'assemblage des plaques d'adhésions focales (Critchley et al. 2008).

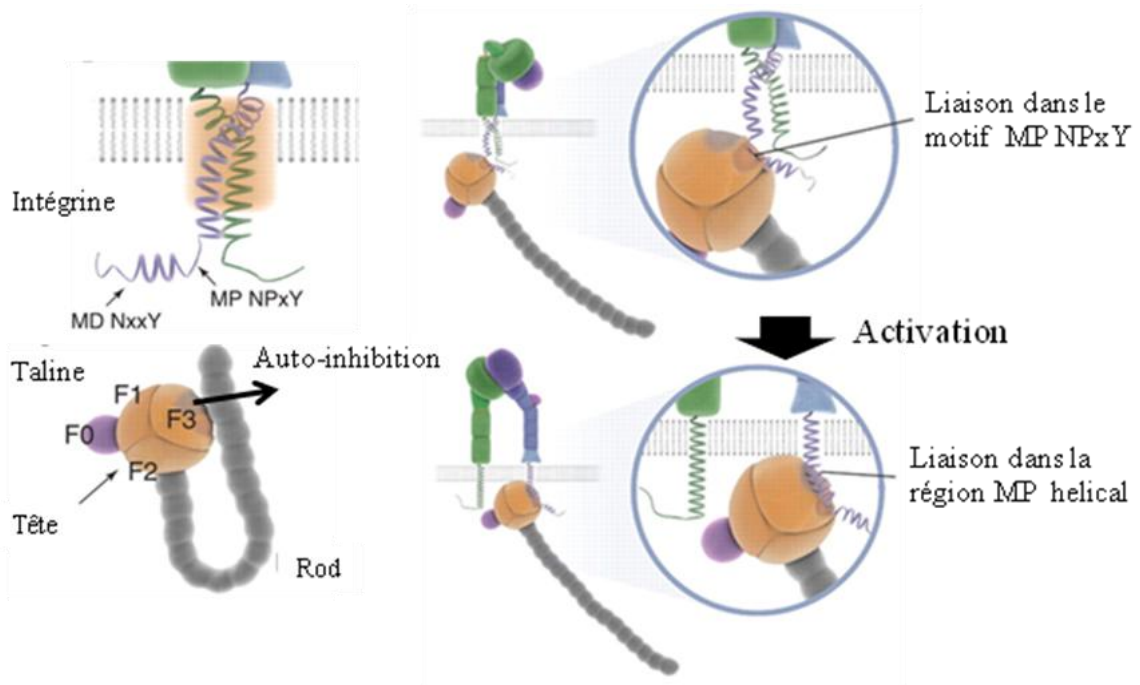


Figure 24 : Activation des intégrines par la taline.

La séparation des jambes de l'intégrine, son domaine transmembranaire, et ses domaines cytoplasmiques survient lors de l'activation de l'intégrine, entraînant sa reconformation dans sa forme étendue. La sous-unité α est représentée en vert et la sous-unité β en violet. Le site de l'interaction est indiqué en orange rectangle entre la membrane proximale (MP) et les domaines cytoplasmiques des sous-unités α et β. La membrane proximale (MP) et distale (MD) NPxY, le motif NxxY dans la queue de sous-unité β sont indiqués. Dans une première étape, le sous-domaine F3 de la taline engage le motif de la MP NPxY dans la queue de sous-unité β. Dans une seconde étape, une structure du sous-domaine F3 de la taline interagit avec la région MP hélical de la partie cytoplasmique de la queue de la sous-unité β perturbant ainsi le lien entre les queues des sous-unités α et β. Cette force de traction à la queue de la sous-unité α réoriente le domaine TM de la sous-unité β de l'intégrine, perturbant ainsi l'emballage du domaine TM entre les sous-unités α et β en orange rectangle.

Adaptée d'après (Moser et al. 2009)

L'activation des intégrines par la taline *via* un changement conformationnel est la conséquence de la coupure d'un pont salin entre les deux domaines cytoplasmiques α et β de l'intégrine entraînant la dissociation des segments transmembranaires (Figure 24). Il augmente l'affinité de l'intégrine pour son ligand matricel extracellulaire. La liaison de la taline avec le PIP2, son clivage par la calpaïne et des événements de phosphorylation permettent d'abroger son auto-inhibition. Le sous-domaine F3 de la taline se lie au motif

NPxY dans la queue des sous-unités β des intégrines. Puis, une structure en boucle spécifique de la taline au sein du sous-domaine F3 interagit avec l'hélice α membranaire proximale de la partie cytoplasmique des sous-unités β des intégrines, perturbant ainsi le lien entre la partie cytoplasmique et son ligand. Les forces de traction, probablement exercée sur la partie β, réorientent le domaine transmembranaire (TM) des sous-unités β des intégrines, perturbant ainsi le repliement du domaine α/β TM (Figure 24) (Moser et al. 2009).

Ce mécanisme d'activation de l'intégrine par la taline pourrait aussi être renforcé par un co-activateur de la taline, la kindline, qui interagit avec un site distinct de celui de la taline au niveau du domaine cytoplasmique de la chaîne β de l'intégrine (Ma et al. 2008) (Montanez et al. 2008).

2.4.4.2. Famille des kindlines

La famille des kindlines se compose de trois membres, structurellement conservée chez la souris et chez l'Homme (Jobard et al. 2003). Des orthologues de kindlines sont retrouvés chez les Caenorhabditis *Elegans* (UNC-112) et chez les Drosophiles (fermitine-1 et fermitine-2). La structure globale est caractérisée par un domaine « N-terminal four-point-one, ezrin, radixin, moesin » (FERM) (Zaidel-Bar et al. 2007) (Hamada et al. 2000) situé en carboxy-terminale de la structure, subdivisé en trois sous-domaines nommé F1, F2 et F3. L'une des caractéristiques des kindlines est l'interruption des sous-domaines F2 par un domaine « pleckstrin homology » (PH), c'est-à-dire qu'ils peuvent être recrutés par les membranes celllulaires en liant leurs phospho inositides (Ashton 2004) (Figure 25). Les kindlines interagissent avec les queues des sous-unités β1, β2 et β3 des intégrines. Les interactions kindlines-intégrines impliquent le motif NxxY situés dans la partie distale de la partie des sous-unités β des intégrines. En outre, il a été aussi montré que les kindline-1 et kindline-2 interagissent entres elles (Lai-Cheong et al. 2008).

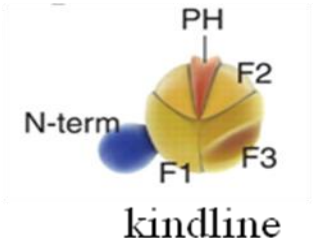


Figure 25 : Structure de la kindline.
Adaptée d'après (Moser et al. 2009)

En collaboration avec la taline, les kindlines jouent aussi un rôle important dans la régulation de la signalisation « inside-out » des intégrines. Il a été montré que les kindlines nécessitent leur domaine FERM et le domaine 'Tête' de la taline pour l'induction de l'activation d'αIIbβ3

dans les cellules CHO (Ma et al. 2008; Montanez et al. 2008; Ussar et al. 2008; Harburger et al. 2009).

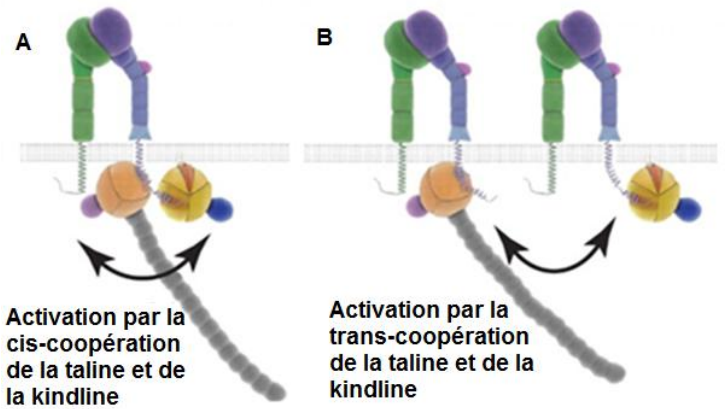


Figure 26 : Coopération entre la taline et la kindline lors de l'activation des intégrines.
Adaptée d'après (Moser et al. 2009)

Différents modèles ont été proposés quant à la coopération de la kindline avec la taline dans le cadre de l'activation des intégrines : i) la kindline lie le motif MD NxxY de la queue de la sous-unité β des intégrines qui facilite simultanément la liaison de la taline avec ce motif sur les sites distincts, entraînant ensuite le déplacement de la kindline et l'activation finale des intégrines : on parle alors de cis-coopération. (Figure 26 A) ; ii) chacun se lie à une partie différente de la queue de la sous-unité β des intégrines, il y aura donc un « cross-talk » entre les deux molécules : on parle alors de trans-coopération (Figure 26 B) (Shroff et al. 2007).

2.4.4.3. Vinculine

La vinculine est une protéine membranaire cytosquelettique présente au niveau des plaques d'adhésions focales. Au niveau structural, beaucoup de parallèles existent entre la vinculine et la taline. La vinculine est constituée d'un domaine globulaire au niveau de sa partie amino-terminale et d'un domaine allongé au niveau de sa partie carboxy-terminale. Comme la taline, elle permet la liaison entre les intégrines et le cytosquelette d'actine. Elle est donc impliquée dans l'adhésion et la migration cellulaire. L'interaction de la vinculine avec la taline ou avec le PIP2 expose les sites masqués pour l'α-actinine et l'actine (Ziegler et al. 2008) (Figure 27).

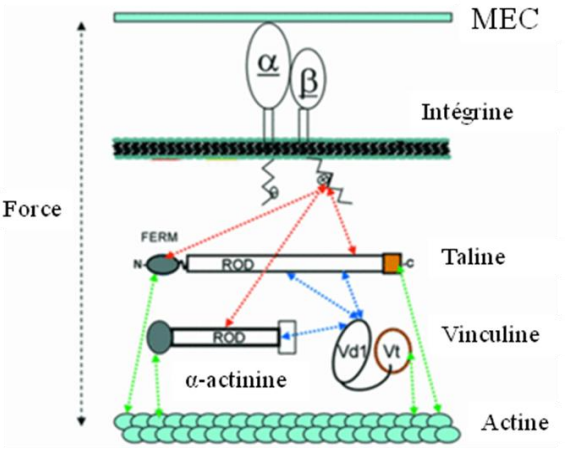


Figure 27 : Activation de la vinculine et des molécules d'adhésion focale.

L'adhésion de la MEC à la surface des cellules *via* les intégrines entraîne la signalisation des intégrines. La taline et l'α-actinine peuvent se lier grâce à la queue des intégrines β par les sites indiqués dans ce schéma. La vinculine est constituée d'un domaine globulaire au niveau de sa partie amino-terminale et d'un domaine allongé au niveau de sa partie carboxy-terminale qui le permettent de lier l'α-actinine, la taline et l'actine respectivement. Le complexe de signalisation se compose donc des intégrines, mais aussi des protéines situées dans le cytoplasme (la vinculine, l'α-actinine et la taline) qui lient le cytosquelette d'actine.

Adaptée d'après (Ziegler et al. 2008)

Outre son rôle structural, la vinculine peut indirectement induire la polymérisation de l'actine-G en actine F en recrutant le complexe de signalisation Arp2/3, qui possède la capacité d'initier la nucléation de filaments d'actine (DeMali et al. 2002). Le mécanisme d'activation de la vinculine par la taline implique l'exposition des sites cryptiques au niveau de la vinculine qui ne résulte pas d'une simple libération stérique mais d'un réarrangement conformationnel complet des hélices α constituant le domaine globulaire (Izard et al. 2004; Izard et al. 2004). Ainsi ces observations suggèrent une régulation complexe de l'interaction entre la taline et la vinculine.

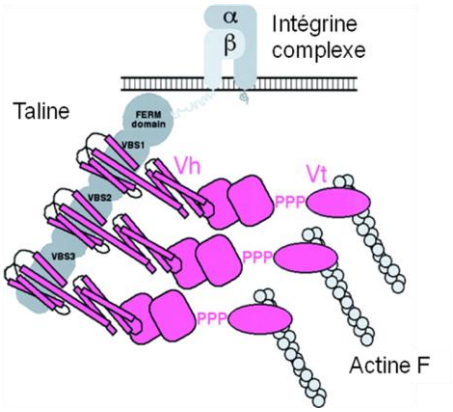


Figure 28 : Activation de la vinculine par la taline dans la signalisation « outside-in ».

Dans ce modèle, la taline est dans sa forme monomérique, elle fonctionne comme un rhéostat activant les vinculines multiples pour amplifier la signalisation des intégrines.

Adaptée d'après (Izard et al. 2004)

Précisément, losque la taline est dans sa forme monomérique, elle fonctionne comme un rhéostat activant les vinculines multiples pour amplifier la signalisation des intégrines (Figure 28). La taline interagit avec les récepteurs des sous-unités β des intégrines grâce à son domaine FERM et se lie à la vinculine par ses trois sites VBS1, VBS2, et VBS3. Ainsi, l'interaction d'une molécule de taline avec trois molécules de vinculine permettrait une amplification de signaux en provenance des intégrines, résultant en des changements rapides au niveau du cytosquelette d'actine (Figure 28) (Izard et al. 2004).

2.4.5. Signalisation des intégrines vers le cytosquelette d'actine

2.4.5.1. FAK (Focal Adhesion Kinase)

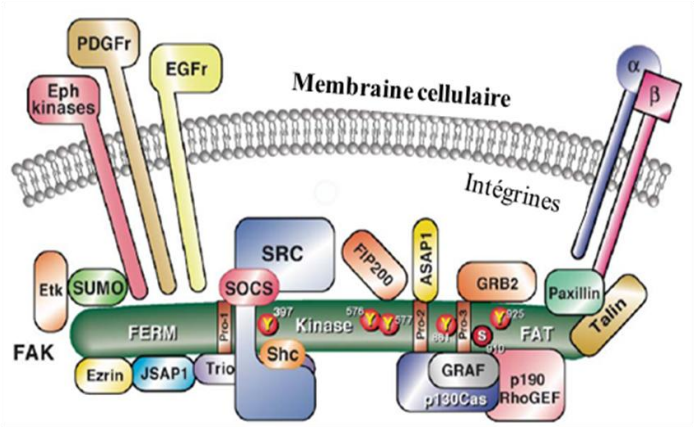


Figure 29 : FAK et ses protéines conjuguées.

Le domaine FERM de la FAK de la partie amino-terminale est important pour l'intégration du signal par les récepteurs du facteur de croissance de type PTK tels que l'Eph kinases, le PDGF et l'EDF. Ce domaine peut faciliter l'activation directe de l'Etk et ses récepteurs PTK. Le domaine FERM interagit également avec une protéine d'échafaudage appelé JSAP1 de la voie JNK et l'ezine. Le domaine FAT de la partie carboxy-terminale favorise la localisation de la FAK aux adhésions focales avec les intégrines *via* l'intermédiation des associations de la taline et la paxiline. Le domaine FAT est également responsable de l'activation de Rho GTPase *via* des interactions avec p190RhoGEF. La FAK peut être phosphorylée aux positions Y397, Y576, Y861 et Y925. L'auto-phosphorylation de FAK à Y397 permet le domaine SH2 en haute affinité pour la formation du complexe Src-FAK. La phosphorylation de FAK par Src aux résidus Y576 et Y577, ce qui accroît l'activité catalytique de FAK.

Adaptée d'après (Schlaepfer et al. 2004)

La FAK est une tyrosine kinase composée d'un domaine kinase central, hautement conservé, et de deux larges domaines de ses parties amino-terminale et carboxy-terminale (Figure 29). Le domaine de sa partie carboxy-terminale contient une séquence « focal adhesion targeting » (FAT) (Hildebrand et al. 1993), responsable de sa localisation au niveau des adhésions focales (Hanks et al. 2003) (Lipfert et al. 1992) ainsi que des sites d'interaction avec la paxilline et le domaine globulaire de la taline (Chen et al. 1995; Hildebrand et al. 1995).

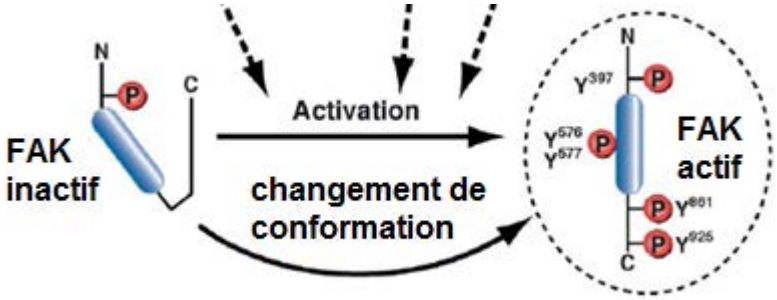


Figure 30 : Activation de FAK.
Adaptée d'après (Schlaepfer et al. 2004)

Le domaine de la partie amino-terminale de la FAK interagit avec des peptides mimétiques de la partie cytoplasmique de β1, suggérant une interaction directe avec les intégrines *in vitro* (Schaller et al. 1995). Dans les cellules au repos, la FAK est localisée aux contacts focaux riches en vinculines par l'association avec la paxilline et la taline. L'interaction des intégrines avec la MEC et le recrutement de FAK induisent son auto-transphosphorylation au niveau du résidu Y397, soit suite au regroupement des intégrines, soit suite à la phosphorylation par Src des résidus Y576 et Y577, ce qui accroît l'activité catalytique de FAK (Schaller 2001) (Figure 30).

La voie de signalisation en aval de FAK est modulée par son expression et sa localisation sous-membranaire, et est impliquée dans plusieurs processus cellulaires (Romer et al. 2006) :

- la survie ou la mort cellulaire programmée *via* « receptor-interacting protein » (RIP), p53 et les caspases 3 et 8;
- l'invasion tissulaire par l'endophinine A2 et « Membrane type 1 metalloprotease » (MT1-MMP);
- les extensions membranaires et la tension du cytosquelette *via* « GTPase activating protein for Rho associated with FAK » (GRAF), « p21-activated kinase-interacting exchange factor » (PIX) et la paxilline;
- la motilité cellulaire *via* la cavéoline, la calpaïne et les MAPK;
- l'assemblage de la matrice *via* la Src, le PI3K et la tensine.

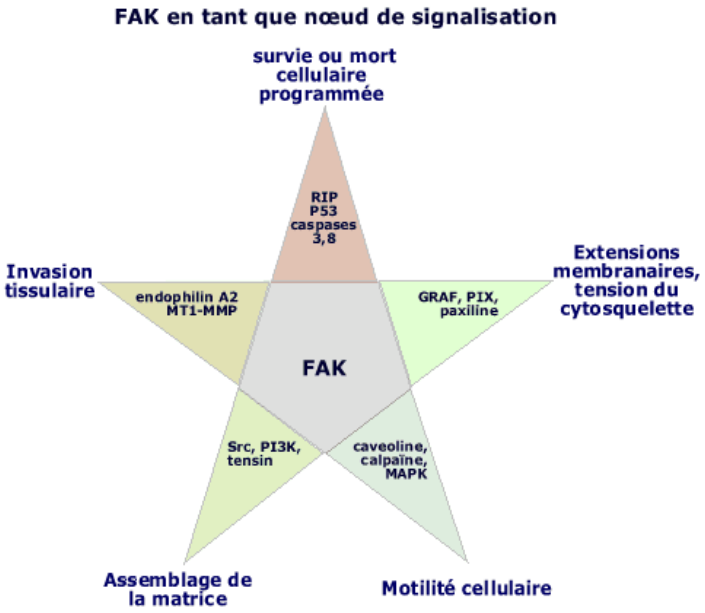


Figure 31 : Signalisation de FAK.

Molécules des partenaires de liason et en aval des effecteurs de la signalisation pour la FAK sont présentées dans le point correspondant du moulinet pour chaque processus cellulaires.

Adapté s'après (Romer et al. 2006)

Concernant le rôle de FAK dans la formation des plaques d'adhésions focales, il a été montré que sa forme activée peut phosphoryler un certain nombre de substrats et se lier à eux menant ainsi au recrutement d'autres protéines adaptatrices et de protéines de signalisation (Schaller 2001). Dans les fibroblastes $FAK^{-/-}$, un défaut de remodelage des adhérences focales apparaît associé à une perte de l'activation des MAPK (JNK et ERK) et à un défaut de migration cellulaire (Klingbeil et al. 2001). Si l'on transfecte ces cellules par v-Src, il y a restauration de la signalisation des MAPK, remodelage des plaques d'adhésions focales et expression des MMP. La voie activée de FAK-Src peut conférer aux cellules un phénotype invasif (Hauck et al. 2001).

2.4.5.2. Famille des Src

2.4.5.2.1. Structure de Src

Les Src sont des protéines tyrosines kinases qui existent sous deux isoformes : c-Src qui est le Src cellulaire et v-Src qui est le Src virien. La molécule se compose d'une séquence M, d'une région unique U, de domaines SH2, SH3 et kinase (Figure 32). La différence principale entre les deux isoformes est que le domaine R présente uniquement chez c-Src (Frame 2002).

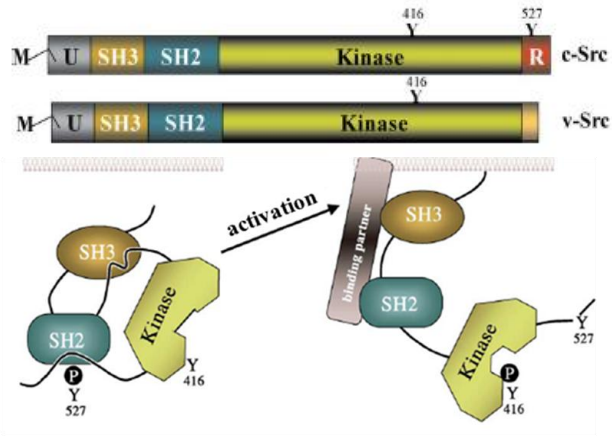


Figure 32 : Structure et régulation de Src.

« M » : une séquence d'amino-terminale myristylation ; « U » : une région unique ; « R » : une séquence de carboxy-terminale de réglementation chez c-Src.

Adaptée d'après (Frame 2002)

Le domaine kinase de Src comprend deux sites de phosphorylation cruciaux pour son activité. La tyrosine 416 de Src est un site d'auto-phosphorylation et son activité catalytique complète dépend de la phosphorylation de ce site (Johnson et al. 1996) (Patschinsky et al. 1982). La tyrosine 527 agit comme un régulateur négatif ; lorsque le site 527 est phosphorylé par Csk (C-src tyrosine kinase) (Okada et al. 1991), l'interaction intramoléculaire entre le domaine SH2 et la partie carboxy-terminale induit la forme inactive de Src ; cette conformation bloque la phosphorylation du site 416, inhibant ainsi l'activation de Src ; quand la tyrosine 527 est dé-phosphorylée, la tyrosine 418 peut être phosphorylée et Src redevient active (Okada et al. 1989) (Cooper et al. 1986) (Figure 32).

2.4.5.2.2. Interaction de Src avec FAK

L'auto-phosphorylation de FAK en Y397 crée un site de haute affinité pour le domaine SH2 de Src. La liaison de Src à FAK peut aboutir à une activation de la conformation de Src et à une formation de la signalisation FAK-Src dans les CE et dans les fibroblastes (Schlaepfer et al. 2004). Dans ce complexe, Src peut phosphoryler les sites Y576 et Y577 du domaine kinase et Y861 et Y925 du domaine carboxy-terminale. Il a été montré que le complexe FAK-Src contrôle la forme cellulaire et le renouvellement des contacts focaux pendant le processus de la motilité des fibroblastes (Schlaepfer et al. 2004; Mitra et al. 2005).

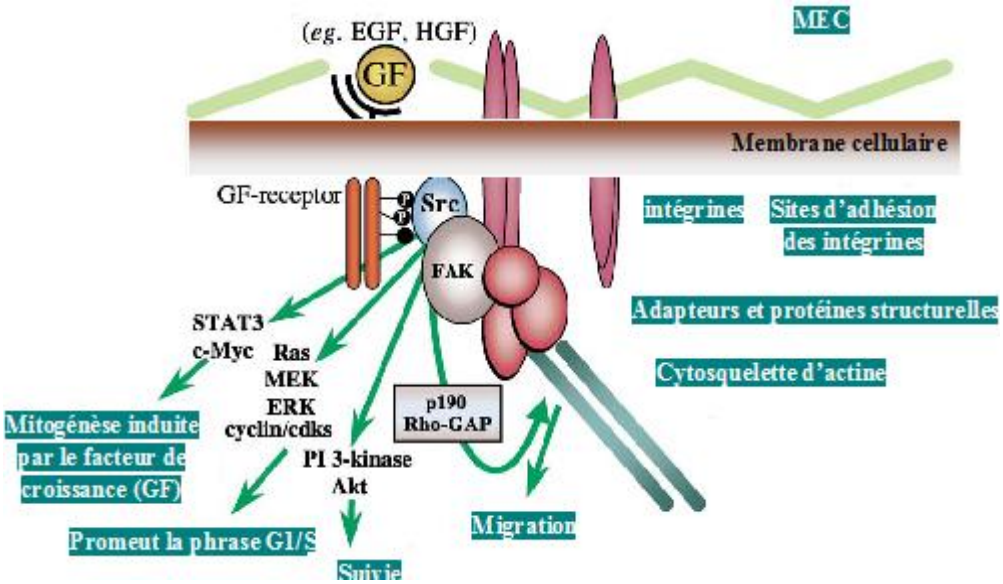


Figure 33 : Voie Src-FAK dans les fibroblastes.

La voie de Src-FAK dans les fibroblastes contrôle le comportement cellulaire. «Hepatocyte growth factor» (HGF); «epithelial growth factor » (EGF)

Adaptée d'après (Frame 2002)

Dans le contact focal, en présence de nombreux facteurs de croissance (EGF, HGF etc.) et de la MEC, les activations de récepteur de type GF et des intégrines vont entraîner la phosphorylation de Src et FAK. La signalisation induite par Src va contrôler le comportement cellulaire, telle que la prolifération, la survie et la migration (Frame 2002) (Figure 33).

2.4.5.2.3. Interaction de Src avec les sous-unités β des intégrines

La partie cytoplasmique de la sous-unité β_3 des intégrines peut se lier directement au domaine SH3 de Src, ce qui permet d'activer Src au niveau des regroupements d'intégrines (Arias-Salgado et al. 2003; Flevaris et al. 2007) (Figure 34).

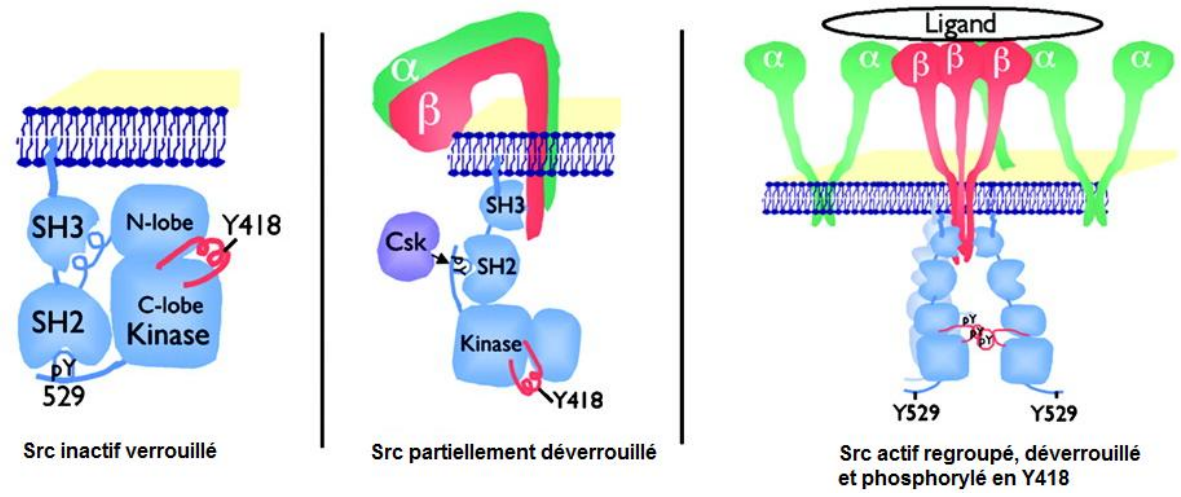


Figure 34 : Interaction de Src avec les sous-unités β des intégrines.

Dans les cellules quiescentes, le c-Src reste dans sa forme inactive verrouillée. Cependant, la liaison de c-Src à la queue de la sous-unité β des intégrines induit un changement de la conformation de c-Src vers une forme partiellement déverrouillée. La phosphorylation de c-Src à Y529 par la kinase Csk limite son activation. Le regroupement de la sous-unité β_3 induite par ses ligands d'activation « outside-in » conduit à une autophosphorylation de c-Src à Y418 et ensuite une déphophorylation de c-Src à Y529, ce qui contribue à la stabilisation de l'état activé totalement déverrouillé de c-Src.
Adaptée d'après (Arias-Salgado et al. 2003)

L'interaction entre le Src et la sous-unité β_3 des intégrines a été bien expliqué par l'application du peptide RGT (Xi et al. 2003) (Su et al. 2008). Contrairement aux peptides RGD qui entrent en compétition avec les molécules de la MEC, RGT interagit en compétition avec les molécules intracellulaires impliquées dans la signalisation des intégrines. En fait, le peptide RGT correspond à la séquence de la partie carboxy-terminale cytoplasmique de la sous-unité β_3 des intégrines et inhibe sélectivement la signalisation « outside-in » en piégeant l'interection de Src et l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Le peptide RGT peut ainsi, de façon dose-dépendante, inhibe l'adhésion plaquettaire stable; provoque la propagation plaquettaire sur le fibrinogène immobilisé; favorise la rétraction du caillot de la fibrine. Le peptide RGT peut être potentiellement developpé comme un agent antithrombotique.

2.4.5.3. MAP Kinases (mitogen-activated protein kinase)

2.4.5.3.1. Voie générale des MAP Kinases

La famille des MAP Kinases se compose de trois molécules : ERK, JNK et p38 MAP kinases (Figure 35) (Cowan et al. 2003): i) la voie de signalisation par l'ERK induite par des facteurs de croissance stimule la prolifération, le dévelopement, la différenciation et la survie cellulaire ; ii) la voie de signalisation par le JNK induite par les cytokines et par le stress stimule l'apoptose, l'imflammation et la tumorigenèse cellulaire ; iii) la voie de signalisation par le p38 induite aussi par les cytokines et par le stress stimule la motilité et l'apoptose cellulaire, le remodelage de la chromatine et l'osmorégulation.

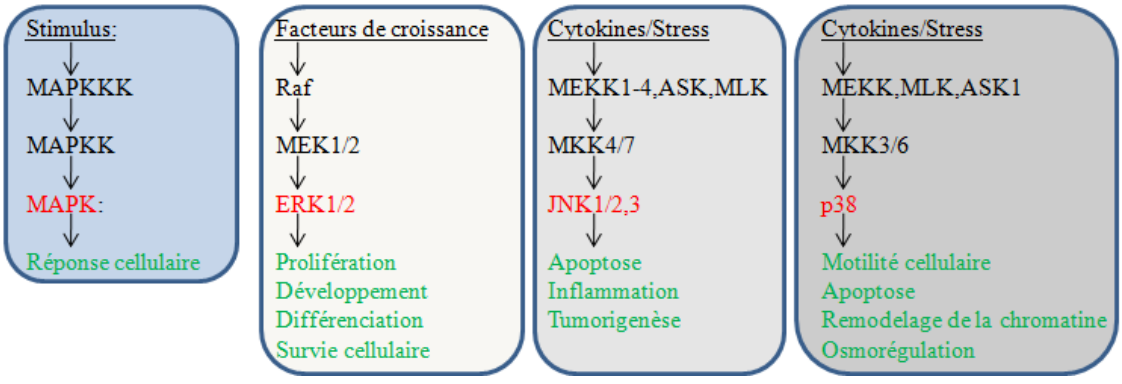


Figure 35 : Voie générale des MAPK et les réponses cellulaires.

« proto-oncogene serine/threonine-protein kinase» (Raf); «MAPK/ERK kinase» (MEK); «MAPK/ERK kinase kinase» (MEKK) ; «apoptosis signal-regulating kinase» (ASK) ; «mixed-lineage kinase MLK» (MKK) ;

La phosphorylation de MAPK est MEK-dépendante et résulte de sa translocation au noyau, ce qui lui permet de phosphoryler et d'activer de nombreux facteurs transcriptionnels associés aux gènes de réponses précoces (Hill et al. 1995). La voie MAPK peut être activée non seulement par des agents mitogènes solubles, mais aussi par des facteurs de croissance et des intégrines. Cette activation se fait par une voie commune menant à la régulation transcriptionnelle de gènes importants pour la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaire (Boudreau et al. 1999).

2.4.5.3.2. Implication des MAP Kinases dans la signalisation des intégrines

Les intégrines activent deux voies majeures tyrosine kinase-dépendantes, d'une part, la voie de FAK, et d'autre part, la voie de Shc. La plupart des intégrines active directement la FAK (Parsons et al. 1997; Schlaepfer et al. 1998). Les intégrines $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$, activent également la voie de Shc (Wary et al. 1996; Wary et al. 1998). Il a été aussi proposé que les intégrines activent l'ERK par la protéine adaptarice Shc indépendamment de FAK ou par l'interaction de FAK avec plusieurs effecteurs, y compris le Shc (Barberis et al. 2000).

Pour ces deux voies, il y a un élément central, c'est la SFK (Parsons et al. 1997). Des fibroblastes auxquels ils manquent les trois kinases de SFK (Src, Fyn et Yes) présentent un défaut profond et spécifique de signalisation des intégrines (Klinghoffer et al. 1999). Le recrutement de Shc par les intégrines nécessite une série d'interactions séquentielles. La protéine cavéoline-1 en forme d'oligomère fonctionne comme un adapteur membranaire, couplant la sous-unité α des intégrines à la Src kinase Fyn (Wary et al. 1998) qui, à son tour, subit un changement de conformation et une interaction avec Shc (Figure 36).

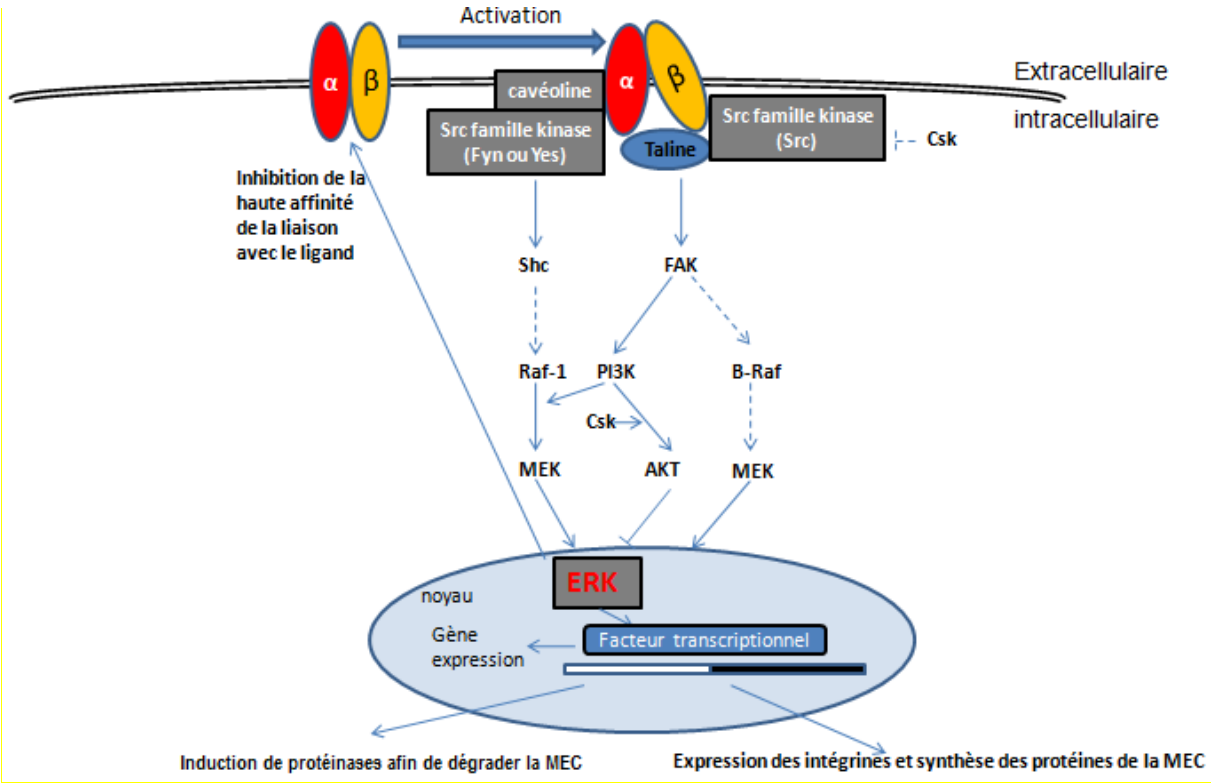


Figure 36 : Modèle hypothétique de régulation de la voie intégrine-ERK.

L'activation d'ERK dépend de la protéine adaptrice Shc et FAK via les intégrines. La signalisation « inside-out » par ERK est réalisée d'une part, par la production de protéases qui dégradent la MEC et d'autre part, par la néo-synthèse des intégrines et des protéines de la MEC (Boudreau et al. 1999). L'activation d'ERK empêche la liaison de l'intégrine avec son ligand en diminuant son affinité.

Dans les fibroblastes, il a été montré que l'activation d'ERK dépend de la protéine adaptrice Shc via les intégrines (Wary et al. 1996; Mainiero et al. 1997; Wary et al. 1998). D'un coté, la transfection des mutants de Shc invalide dans les cellules NIH3T3, induit une inhibition de l'activation de ERK de manière dose dépendante. D'autre coté, la délétion du domaine cytoplasmique de la sous-unité β_1 des intégrines empêche l'activation de FAK sans altérer la signalisation d'ERK. L'invalidation de FAK montre peu ou aucun effect sur la voie d'ERK (Lin et al. 1997; Wary et al. 1998). De plus, une chimère contenant le domaine transmembranaire de la sous-unité α_1 des intégrines peut s'associer à la cavéoline-1 et recruter Shc, ce qui mène à l'activation d'ERK sans induire l'activation de FAK (Wary et al. 1998).

Malgrès tout, la FAK est tout de même une molécule responsable de la signalisation des intégrines. L'interaction entre la FAK et le Src lui permet de jouer des rôles très importants dans l'adhésion focale et la migration cellulaire (Mitra et al. 2006). L'engagement des intégrines avec les protéines de la MEC a des effets importants sur la prolifération et la survie cellulaire en activant la cascade de Ras/MAPK et PI3K/AKT respectivement. La protéine Csk

peut phosphoryler Src et inhiber son activité, inhibant l'activation d'ERK en activant AKT (Gu et al. 2003) (Figure 36).

L'activation d'ERK va activer une série de facteurs transcriptionnels qui pourra induire l'expression de certains gènes. La signalisation « inside-out » par ERK est réalisée d'une part, par la production de protéases qui dégradent la MEC et d'autre part, par la néo-synthèse des intégrines et des protéines de la MEC (Boudreau et al. 1999). De plus, l'activation de l'ERK empêche la liaison de l'intégrine avec son ligand en diminuant son affinité (Figure 36). C'est probablement la raison pour laquelle, il y a un décalage dans l'activation de différentes molécules impliquées dans la signalisation au moment de la réponse des cellules aux contraintes mécaniques (Albinsson et al. 2007).

Dans les CML néonatales cultivées sur la pronectine, qui resemble structurellement à la fibronectine (FN), l'étirement cyclique a capable d'activer ERK et JNK. Par contre, si l'on remplace la pronectine par la laminine, dans ces cellules, l'étirement cyclique n'a plus effet sur la voie ERK (Reusch et al. 1997). Ainsi, l'activation de la voie MAPK induite par les contraintes mécaniques cycliques dépend également de la composition de la MEC.

2.4.5.4. AKT ou PKB (protein kinase B)

AKT est une famille de protéases multifonctionnelles capable de réguler plusieurs processus cellulaires dans les CE et CML, tels que la survie cellulaire, le cycle cellulaire, le métabolisme, la synthèse protéique et la régulation transcriptionnelle (Shiojima et al. 2002; Somanath et al. 2006). AKT participe aussi à l'activation des intégrines (Byzova et al. 2000): elle peut phosphoryler le résidu thréonine 753 de la partie de la sous-unité β_3 des intégrines (Lerea et al. 1999; Kirk et al. 2000) et certaines protéines du cytosquelette, comme la girdine ou APE (Akt-phosphorylation enhancer), une protéine liant l'actine (Enomoto et al. 2005). AKT est donc impliquée dans l'adhésion et la migration des CE et CML, et dans l'assemblage de la MEC (Shiojima et al. 2002; Somanath et al. 2007).

La signalisation de l'AKT est compliquée en raison de l'existence de différents isoformes. Chez l'Homme, il existe 3 gènes de la famille AKT : AKT1, AKT2 et AKT3. La majorité de l'activité d'AKT est due à AKT1: environ 70% dans les CE (Chen et al. 2005). Pour cette raison, sauf précision particulière, AKT1 est nommée AKT. AKT2 est un facteur impliqué dans la signalisation cellulaire de l'insuline. Elle est nécessaire au transport du glucose (Garofalo et al. 2003). Le rôle d'AKT3 est moins clair, cette protéine semble sourtout exprimée dans le cerveau. Il a été montré que les souris invalidées pour AKT3 ont des cerveaux de plus petite taille (Yang et al. 2004). La v-AKT est un oncogène codé par le virus murin « AKT8 ». Tous ces gènes partagent une structure conservée de trois domaines

fonctionnels, incluant un domaine « pleckstrin homology » (PH), un domaine kinase et un domaine « hydrophobic motif » (HM) (Hanada et al. 2004) (Figure 37).

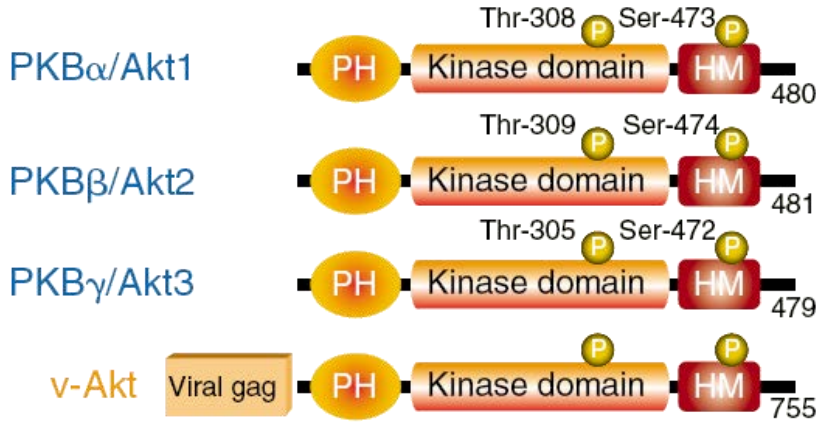


Figure 37 : Structure de la famille AKT/PKB.

Adaptée d'après (Hanada et al. 2004)

Dans les cellules au repos, AKT est présente dans le cytoplasme. En réponse aux « growth factors » (GF), son domaine PH se lie aux lipides messagers secondaires de PI3K, ce qui permet alors de recruter AKT à la membrane plasmique. La régulation de l'activité d'AKT est réalisée principalement par deux molécules, PDK1 et PDK2 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase) (Hemmings 1997; Downward 1998) (Figure 38). Il a été montré que plusieurs molécules ont une activité potentielle AKT S473 kinase, comme l'ILK (integrin-linked kinase), MK2 (MAP kinase-activated protein kinase 2), PDK2 et AKT eux-mêmes (autophosphorylation) (Delcommenne et al. 1998; Balendran et al. 1999; Toker et al. 2000; Rane et al. 2001). Après phosphorylation, AKT activée peut phosphoryler ses substrats et également modifier sa localisation sous-cellulaire (Camper-Kirby et al. 2001). La déphosphorylation d'AKT est réalisée par la protéinase PP2A (Figure 38) (Andjelkovic et al. 1996).

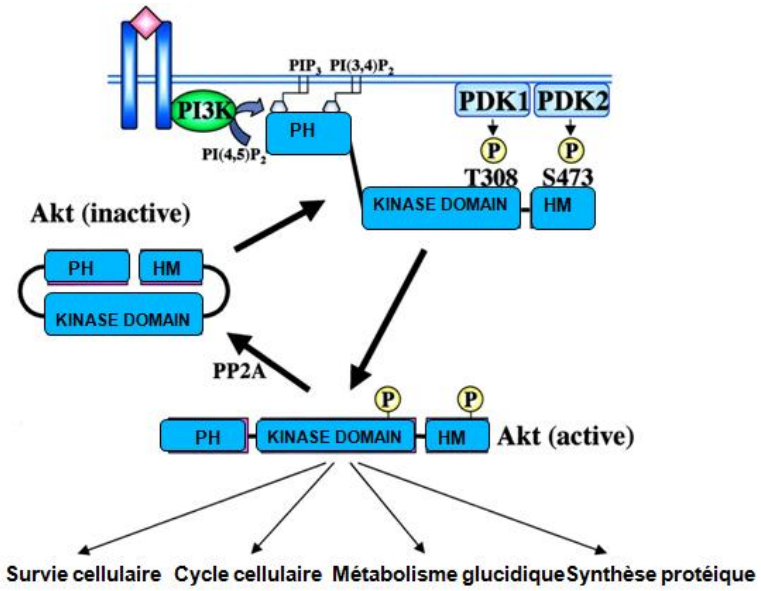


Figure 38 : Mécanisme d'activation d'AKT.

L'activation d'AKT par une phosphorylation via PDK1 et PDK2 à Y308 et S473. Le PP2A déphosphorylation d'AKT conduit à un état inactif.

Adaptée d'après (Shiojima et al. 2002)

Dans les CE, AKT joue un rôle très important dans l'homéostasie et l'angiogènèse par la voie des GF et par la voie de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Figure 39). Ainsi le dialogue médié par AKT entre ces deux voies permet de contrôler la survie des CE (Shiojima et al. 2002) (Figure 39).



Figure 39 : Signalisation d'AKT dans les CE.

Adaptée d'après (Shiojima et al. 2002)

L'activation d'AKT dans les CE est liée à la génération de la substance vasodilatatrice, le NO, et à la prolifération des CML (Chen et al. 2001; Go et al. 2001; Adam et al. 2003). La signalisation de PI3K/AKT participe aussi à la modulation de la différenciation des CML (Hayashi et al. 1999; Brown et al. 2005; Lien et al. 2006). L'activation d'AKT induite par

IGF-1 peut stimuler l'exportation nucléaire de FOXO4 (Forkhead box O 4), libérant ainsi la myocardine de son état inhibitif (Liu et al. 2005).

Il a été montré qu'AKT peut aussi jouer un rôle important dans la formation de la MEC dans plusieurs contextes. Par exemple, dans les fibroblastes de phénotype $AKT^{-/-}$, les cellules ont perdu leur capacité de réguler l'assemblage de la FN, mais la réexpression d'AKT corrige ce défaut *via* l'activation de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ (Somanath et al. 2007). Il a été montré que la voie PI3K/AKT est impliquée dans l'augmentation de collagène de type I-A1 et I-A2 induite par le TGF-β sur les fibroblastes du poumon et sur les cellules mésangiales (Ricupero et al. 2001; Runyan et al. 2004).

En réponse à la contrainte mécanique, la signalisation de PI3K/AKT participe à la production de collagène de type I par les cellules mésangiales (Krepinsky et al. 2005) ; AKT peut aussi être activé dans les CML par la même stimulation. L'interaction de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ avec c-Src résulte d'une activation d'AKT de façon GF-indépendant en réponse aux contraintes mécaniques (Sedding et al. 2005). Dans la méchanotransduction, l'inhibition de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ empêche l'activation d'AKT, car la PI3K est colocalisée avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans l'adhésion focale, l'activité de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ conditionne alors l'activation de PI3K et AKT, la plus importante cible en aval de la voie de signalisation de PI3K.

L'activation d'AKT est aussi impliquée dans la signalisation de la thrombine (Resendiz et al. 2007). Dans les plaquettes, la stimulation venant du PAR entraîne rapidement la phosphorylation d'AKT en aval de la voie de PLC (Phospholipase C), alors qu'avec une stimulation continue, ADP et PI3K sont nécessaires pour maintenir la phosphorylation d'AKT. AKT activée participe à réguler les fonctions plaquettaires en modulant la sécrétion et l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Resendiz et al. 2007).

2.4.5.5. ILK (Integrin-linked kinase)

ILK est une protéine adaptatrice, liant la partie cytoplasmique des sous-unités β des intégrines. Elle joue un rôle important dans la transduction du signal (Hannigan et al. 1996) et participe alors à l'activation des intégrines (Bottcher et al. 2009). Elle est impliquée dans la migration, la prolifération et l'adhésion cellulaire. ILK est présente dans les différents compartiments intracellulaires, y compris dans le noyau (Hynes 2002). Lorsque les intégrines sont en conformation active, les interactions cellule-cellule sont établies : un lien est créé entre les intégrines, les voies de signalisation du cytosquelette et les GF *via* ILK et la kindline (Figure 40-3). Plus précisément, ILK et la kindline orchestrent ces processus en interagissant les unes avec les autres et en recrutant d'autres protéines des plaques d'adhésions focales (Lim et al. 2008). ILK se lie à PINCH et aux protéines des plaques d'adhésions focales associant l'actine F (la parvine et la paxilline). En plus de son interaction avec ILK, la kindline recrute la

migfiline, une autre protéine adaptatrice, aux points d'adhésions focaux qui, à son tour, se fixe à la filaminine (Figure 40). Ainsi, par la liaison aux intégrines et avec l'aide de la kindline, ILK joue son role de médiateur de signalisation *via* les intégrines, qui permet de relier l'adhésion cellulaire et les réponses de la cellule en terme de prolifération ou d'adaptation du cytosquelette et en particulier l'actine-F.

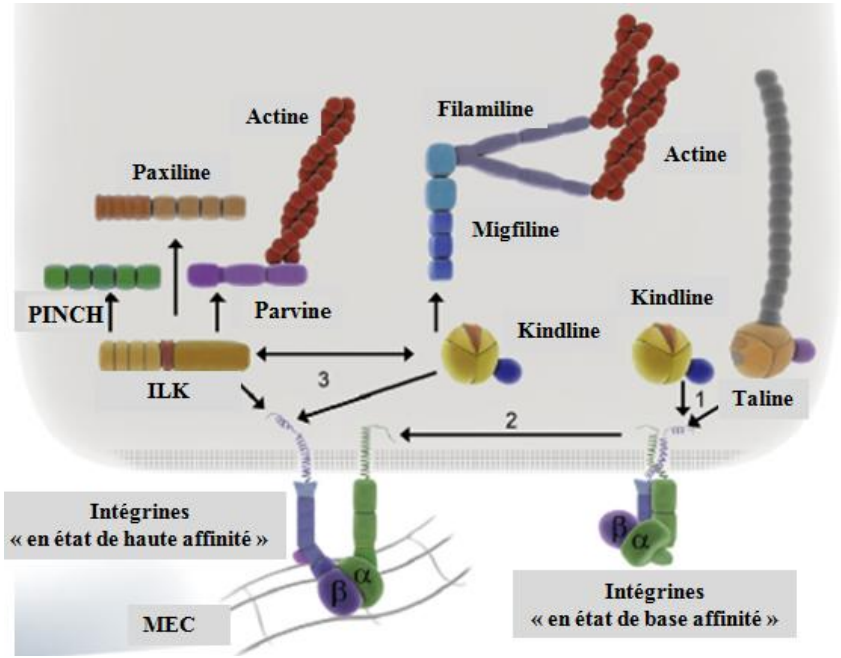


Figure 40 : Implication d'ILK dans l'activation des intégrines.

La liaison entre « la taline », la « kindline » et la queue de la sous-unité β des intégrines conduit à un changement d'état de basse affinité vers une conformation de haute affinité des intégrines pour ses ligands. Dans leur comformation active, d'autres interactions protéine-protéine sont établies. L'ILK et la « kindline » organisent ensemble ces processus en interagissant les uns avec les autres afin de recruter des protéines de l'adhésion focale. A la fin, les cellules s'adaptent *via* la signalisation des intégrines et la réorganisation du cytosquelette.

Adaptée d'après (Bottcher et al. 2009)

Friedrich *et al.* ont montré que les CE de phénotype $ILK^{-/-}$ présentent une diminution du nombre des intégrines de la famille β1 actives à leur surface (Friedrich et al. 2004). Quand les plaquettes présentent un défaut ILK, il y a une liaison diminuée entre le fibrinogène et l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, ainsi qu'une agrégation réduite et une diminution de la sécrétion des granules α (Tucker et al. 2008). ILK est localisée sur les complexes d'adhérence focale et interagit avec les voies de signalisation dépendantes des phosphoinisitides : la PI3K et AKT. La surexpression d'ILK dans les cellules épithéliales induit la phosphorylation de l'AKT et de la GSK3β (glycogen synthase kinase-3) (Delcommenne et al. 1998). L'identification d'AKT

comme cible d'ILK pourrait expliquer le mécanisme de prolifération et de survie cellulaire dépendant de l'adhérence cellulaire (Legate et al. 2006).

Voici des tableaux permettant de résumer les principales molécules de la signalisation des intégrines

Tableau 2 : Protéines impliquées dans la dynamique du cytosquelette d'actine

Molécule signal	Fonction	Référence
Taline	Activation des intégrines *via* la liaison à la partie carboxy-terminale de leurs sous-unités β Activation des vinculines en exposant les sites pour l'α-actinine et l'α-actine	(Tadokoro et al. 2003) (Ziegler et al. 2008)
Famille de kindlines	Activation des intégrines de façon « Inside out » en coopération avec la taline Implication dans la signalisation bidirectionnelle des intégrines (kindline-2)	(Moser et al. 2009) (Montanez et al. 2008)
Vinculine	Induction de la polymérisation de l'actine G en actine F et impliquée dans l'adhésion et la migration cellulaire	(DeMali et al. 2002; Carisey et al.)
α-actinine	Association avec le filament d'actine-F et impliquée dans la régulation de l'organisation du cytosquelette et de la contraction musculaire	(Sjoblom et al. 2008)
Filaminine	Authorisation de former des réseaux de filaments d'actine	(Popowicz et al. 2006)

Tableau 3 : Protéines de la signalisation vers le cytosquelette d'actine

Molécule signal	Fonction	Référence
FAK	Implication dans le nœud de signalisation des intégrines (survie ou mort cellulaire ; invasion tissulaire ; assemblage de la matrice ; motilité cellulaire ; extensions membranaires et tension du cytosquelette)	(Schaller 2001; Hanks et al. 2003; Schlaepfer et al. 2004)
Src	Participation à l'activation de FAK Interaction avec des sous-unités β des intégrines Implication dans l'adhésion plaquettaire	(Mitra et al. 2005) (Arias-Salgado et al. 2003) (Su et al. 2008)
AKT	Activation par ILK Implication dans l'activation des intégrines, la signalisation bidirectionnelle des intégrines et la signalisation des facteurs de croissance (survie cellulaire, cycle cellulaire, métabolisme glucidique et synthèse protéique)	(Byzova et al. 2000) (Qian et al. 2005) (Hemmings 1997) (Krepinsky et al. 2005) (Sedding et al. 2005) (Shiojima et al. 2002) (Yang et al. 2004)
ILK	Liaison à la partie carboxy-terminale des sous-unités β pour participer à l'activation des intégrines et à leur signalisation (migration cellulaire, prolifération cellulaire, adhésion cellulaire etc.) Renforcement de la liaison des MEC avec les intégrines sur les plaquettes Activation d'AKT	(Hannigan et al. 1996; Hynes 2002; Hervy et al. 2006; Bottcher et al. 2009) (Tucker et al. 2008) (Qian et al. 2005)

Tableau 4 : Association des intégrines à des molécules non matricielles

Molécule signal	Fonction	Référence
Famille de MAPK		
ERK	Implication dans la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire Participation à l'augmentation de l'expression de protéases qui dégradent la MEC	(Hill et al. 1995; Boudreau et al. 1999; Albinsson et al. 2007)
JNK	Implication dans l'apoptose, la différenciation, la prolifération cellulaire, la neurodégénérescence et les conditions inflammatoires etc.	(Vlahopoulos et al. 2004)
P38	Implication dans l'apoptose cellulaire	(Cornelissen et al. 2004)

3. Intégrine $\alpha_v\beta_3$

3.1. Etude physiopathologique de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans les CML

L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est exprimée sur presque toutes les cellules provenant du mésenchyme, les CML, les CE, les fibroblastes, les macrophages et aussi sur une très petite partie des plaquettes (Kokubo et al. 2007). Elle est une des plus multifonctionnelles des intégrines car elle sert de récepteur à plusieurs protéines extracellulaires contenant une séquence RGD (Heerkens et al. 2007). Ceci inclut la FN, la VN, la laminine, la prothrombine, le facteur von Willebrand, le fibrinogène et le collagène. C'est un facteur nécessaire pour le remodelage artériel hypertensif (Heerkens et al. 2006). La migration des CML de la média à l'intima dépend de l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Kanda et al. 2000). Ainsi, elle fait le lien avec de nombreux événements biologiques, tels que l'adhésion, la migration, la prolifération et l'apoptose des CML vasculaires (Clyman et al. 1992; Slepian et al. 1998; Sajid et al. 2002; Heerkens et al. 2006), l'adhésion des ostéoclastes à la matrice osseuse (Chen et al. 2009) et à l'angiogenèse (Eliceiri et al. 2000).

En réponse aux contraintes mécaniques, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ participe à la prolifération des CML (Wilson et al. 1995). Il a été montré que, le complexe de la plaque d'adhésion focale contient l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, la cavéoline-1, le complexe PI3K/AKT et c-Src (Sedding et al. 2005). Dans la condition mécanique (125% longeur de repos, 0.5Hz), le blocage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ empêche l'activation d'AKT, et l'activation de PI3K/AKT facilite la réponse de la prolifération des CML (Sedding et al. 2003; Sedding et al. 2005). Cheng *et al.* ont montré qu'il y a une augmentation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ en réponse aux contraintes mécaniques, et qu'elle inhibe l'apoptose induite par les Ox-LDL *via* le maintien de l'expression de PINCH-1(Cheng et al. 2007). L'augmentation de l'expresison de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ contribue, alors à un déséquilibre entre la suivie et l'apoptose des CML conduisant à l'accumulation des CML dans le processus de remodelage vasculaire lors de la formation des lésions d'athérosclérose.

Son homologue, l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, exclusivement exprimée sur les plaquettes, est largement responsable de la phase finale de cohésion de l'activation plaquettaire *in vivo*. Dans le processus d'agrégation plaquettaire, elle participe à la fixation des protéines adhésives (Topol et al. 1999). Ainsi, l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est un point de régulation important dans le processus de la thrombose (Stouffer et al. 2003). Il a été montré que cette intégrine reconnaît le même motif de RGD que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et se lie aux mêmes protéines de la matrice extracellulaire (Pytela et al. 1986). Il a été montré que les plaquettes sont capables d'adhérer à la prothrombine (Byzova et al. 1997) et au fibronogène (Savage et al. 1995), et que cette

laison ne dépend pas de l'activité de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Par contre, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ reconnaît la prothrombine seulement sous sa forme active (Byzova et al. 1998).

3.2. Rôle de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ dans les plaquettes

L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est présente à la surface des plaquettes circulantes sous forme inactive. En effet, au repos, les plaquettes circulantes dans le flux sanguin, sont non thrombogènes et incapables d'interagir avec l'endothélium vasculaire ou avec le fibrinogène plasmatique. En cas d'exposition du sous-endothélium vasculaire, suite à un traumatisme ou en cas d'une génération locale d'agonistes solubles comme la thrombine ou le thromboxane A2 (agonistes forts), l'ADP, l'adrénaline ou la sérotonine (agonistes faibles), les plaquettes sont activées, et peuvent alors adhérer à ce sous-endothélium et s'agrégent pour former un thrombus. Dans ce cas, l'adhérence initiale des plaquettes est assurée par différents récepteurs, comme le récepteur glycoprotéine (GP) Ib-IX-V (Berndt et al.), qui interagit avec le facteur von Willebrand dans des conditions de flux élevé, ou comme l'intégrine $\alpha_2\beta_1$, qui interagit avec le collagène dans des conditions de faible flux. La signalisation intracellulaire de ces récepteurs peut alors activer l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, augmentant ainsi son affinité pour le fibrinogène soluble, principal ligand d'$\alpha_{IIb}\beta_3$. Comme le fibrinogène est une molécule dimérique, possédant plusieurs sites d'interaction avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, il interagit avec plusieurs plaquettes voisines et entraîne ainsi l'agrégation plaquettaire. Ceci va conduire à la formation d'un thrombus et il résultera une obstruction de la brèche vasculaire (Blockmans et al. 1995; Fullard 2004).

3.3. Ligands de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

3.3.1. Vitronectine (VN)

La vitronectine est une glycoprotéine que l'on retrouve sous deux formes: non clivée (75kDa) ou clivée (65kDa). Elle est le premier ligand endogène de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Horton 1997) et est synthétisée par les hépatocytes, les macrophages, les mégacaryocytes et les CML. Elle est présente dans le plasma sanguin et est associée à la MEC de nombreuses cellules des tissus conjonctifs, de la paroi vasculaire et des plaquettes. Elle possède des sites de fixation pour de nombreuses espèces protéiques: constituants de la matrice (collagènes, glycoaminoglycanes), protéines de la fibrinolyse (plasminogène…), complément. Elle a donc de multiples propriétés et est impliquée dans l'adhésion cellulaire (interaction VN-intégrine $\alpha_v\beta_3$), la différenciation et la migration cellulaire et intervient dans la régulation des cascades d'enzymes protéotiques de la coagulation sanguine, de la fibrinolyse et du système du complément (Felding-Habermann

et al. 1993). Elle est capable aussi de collaborer avec la FN pour l'adhésion cellulaire (Boettiger et al. 2001).

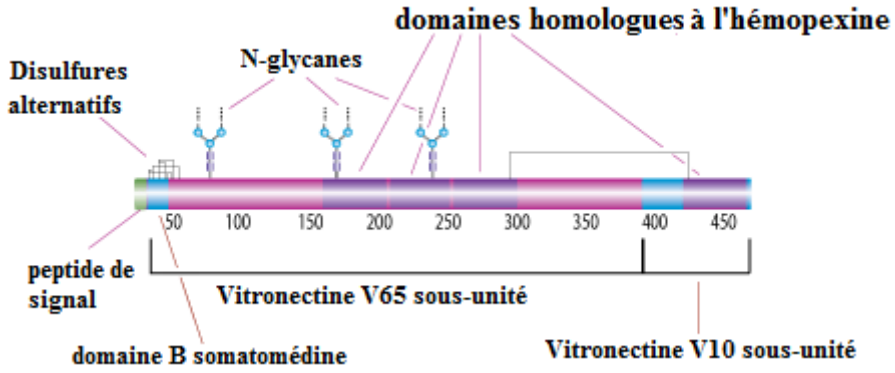


Figure 41 : Structure de la VN.

Adaptée d'après

http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/structural-proteins/vitronectin.html

La VN se présente comme une protéine multi-domaine (Figure 41). Elle possède un domaine B somatomédine en position amino-terminale, un domaine central et des domaines carboxy-terminale homologues à l'hémopexine. Le domaine B contient une séquence RGD (45-47) qui est un site de fixation de la VN aux intégrines. Les récepteurs de la VN servent donc à ancrer les cellules dans la MEC. Le domaine B interagit aussi avec le récepteur de l'urokinase et cette interaction est impliquée dans la migration cellulaire et la transduction du signal (Degryse et al. 2001). La VN sert également à activer la protéolyse initiée par l'activation du plasminogène (Takahashi et al. 2005; Kamikubo et al. 2009).

La VN se lie aux cellules par l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ *via* le motif RGD. La liasion demande un changement de comformation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Boettiger et al. 2001). La liaison de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ avec la VN peut induire un réarrangement du cytosquelette qui active la signalisation intracellulaire et renforce l'assemblage du complexe intégrine $\alpha_v\beta_3$-cytosquelette (Garcia et al. 1998). La VN favorise la voie de signalisation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$-FAK-MAPK, ce qui conduit, à la migration des CE (Naik et al. 2006). Dans les cellules cancéreuses ovariennes, l'interaction de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et la VN induit une augmentation d'expression de PAI-1 et une inhibition d'expression de « urokinase » (uPA) et « urokinase receptor » (uPAR) ce qui aboutit à un phénotype invasif (Hapke et al. 2001). Dans les CML de rat, la VN et la « pro-urokinase » (pro-uPA) induitent la migration de manière dose-dépendante, et les changements de la morphologie cellulaire par une réorganisation complète des filaments d'actine et du microtubule (Degryse et al. 2001). La VN peut également renforcer la

colocalisation de l'uPA et l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans les plaques d'adhésions focales dans les cellules de fibrosarcome humain (Ciambrone et al. 1992).

3.3.2. Fibronectine (FN)

La FN est connue comme le ligand de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ (Garcia et al. 1998; Garcia et al. 1999), mais aussi de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Butler et al. 2003) et l'interaction de la FN et les intégrines, contribuent à la fois à organiser la matrice, à favoriser l'adhérence des cellules à la MEC et la migration cellulaire (Yamada 1991) (Simon et al. 1997).

Elle est constituée de deux sous-unités α et β (masses moléculaires d'environ 230 kD) réunies par une paire de ponts disulfure. Grâce à l'épissage alternatif, le même gène est à l'origine de plusieurs sous-unités protéiques. La FN est essentiellement une association de trois types de domaines (I, II, III) qui se répètent plusieurs fois. Les différents domaines s'aménagent en sites d'interactions spécifiques avec d'une part les constituants moléculaires de la MEC (formation d'une trame) et de l'autre les cellules (par l'intermédiaire des intégrines). Un site important pour la fixation des intégrines est une séquence de RGD qui se situe dans le domaine FIII (Figure 42).

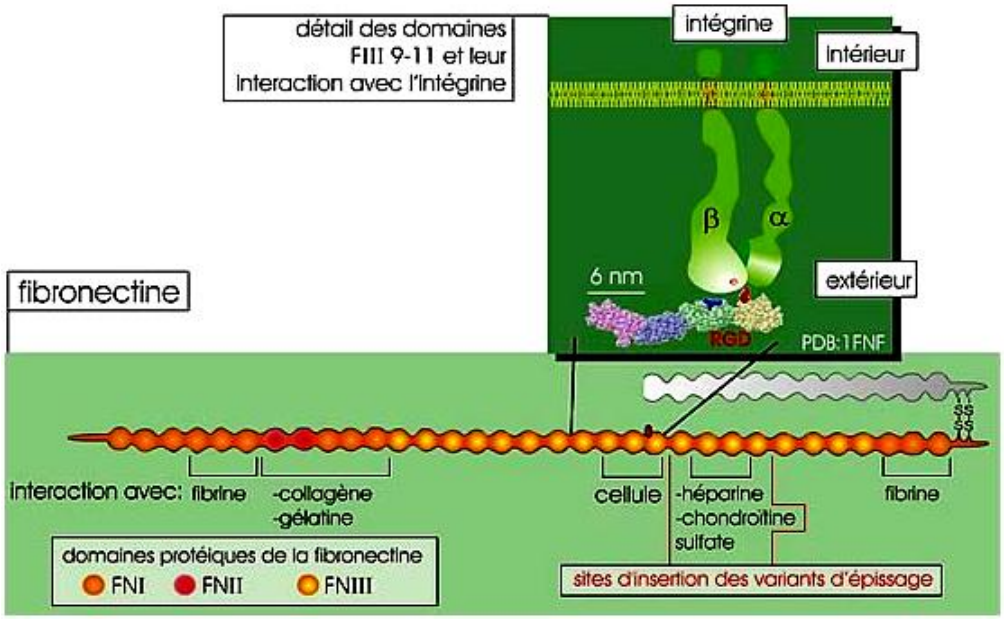


Figure 42 : Fibronectine et son interaction avec les intégrines.

Adaptée d'après

http://www.ulysse.u-bordeaux.fr/atelier/ikramer/biocell_diffusion/gbb.cel.fa.103.b3/content/access.htm

La FN est libérée dans le milieu extracellulaire sous forme globulaire soluble. Le contact avec les intégrines linéarise la molécule, qui peut ainsi s'associer avec ses homologues et d'autres composants de la MEC. La FN joue un rôle important dans le guidage des cellules lors des

migrations embryonnaires chez les vertébrés (gastrulation et migration des cellules de la crête neurale). L'importance de la FN a été démontrée lors de la transgénèse expérimentale chez la souris: des embryons dépourvus du gène de la FN ne dépassent pas le neuvième jour embryonnaire à cause d'un déficit dans le développement du mésoderme, du tube neural et des vaisseaux sanguins (Adams et al. 1989). Chez l'adulte, la FN joue également un rôle central dans les processus de cicatrisation (Lebedev 1992).

La liasion entre la FN et l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ peut seulement produire un lien initial fort mais elle ne peut pas répondre au signal intracellulaire pour changer la liaison pré-existante entre l'intégrine et le cytosquelette (Boettiger et al. 2001).

3.3.3. Prothrombine (FII)

La prothrombine (FII, facteur II) est une glycoprotéine monocaténaire de 579 acides aminés dont la concentration plasmatique est d'environ 1.5µM. Elle peut donner naissance à la thrombine (FIIa, facteur IIa), une protéine bi-caténaire composée de A (TA) et B (TB) et à différents fragments sous l'action de l'activateur physiologique (FXa) : fragment 1 (F1), fragment 2 (F2), un petit peptide de 13 acides aminés (F3). Le FII est composé de plusieurs domaines fonctionnels : un domaine GIa, deux domaines Kringle 1 ou 2 et un domaine sérine protéase, codés respectivement par les exons 2, 5-6, 7 et 9-14.

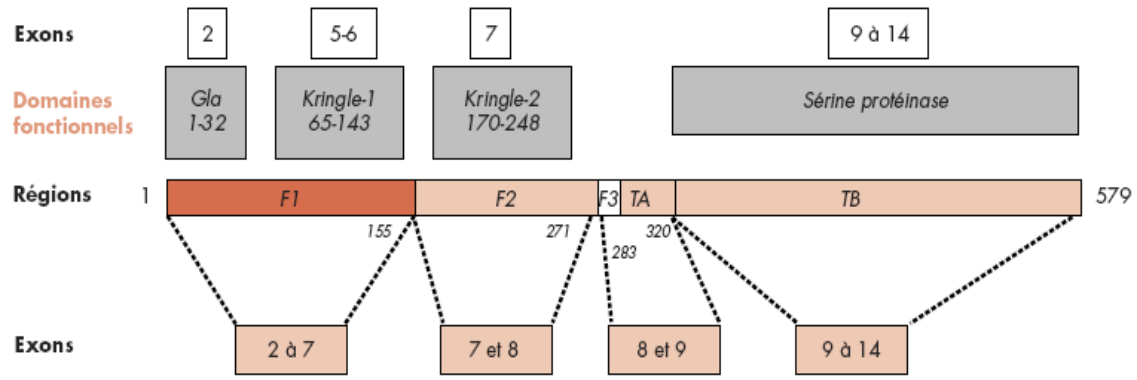


Figure 43 : Structure de la prothrombine (FII).

Adaptée d'après

http://www.jle.com/fr/revues/medecine/bdc/e-docs/00/04/15/F9/article.md?fichier=images.htm

La prothrombine est synthétisée àdans le foie et conditionnement par les CML. L'activateur physiologique de la prothrombine est le complexe prothrombinase, formé d'une enzyme, FXa (facteur Xa), d'un cofacteur protéique FVa (facteur Va), du calcium et de phospholipides anioniques (Figure 44). La réaction catalysée par le FXa, très lente lorsqu'il est seul à agir, est considérablement accélérée (200,000 fois) en présence de phospholipides anioniques et de

FVa qui augmentent l'affinité du FXa pour la prothrombine et la vitesse maximale de la réaction.

La régulation de l'homéostasie vasculaire dépend de la collaboration entre les cellules de la paroi vasculaire et le système de la coagulation sanguine. La prothrombine est un ligand de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ aux CML et aux CE, et aussi un ligand de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ dans les plaquettes (Byzova et al. 1997; Byzova et al. 1998). La prothrombine reconnaît l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_{IIb}\beta_3$ via la séquence RGD, ainsi, la famille β_3 des intégrines est donc impliquée dans l'adhésion de la prothrombine aux surfaces cellulaires et dans la formation du thrombus (Byzova et al. 1997; Lele et al. 2001) (Figure 44). La liaison de la prothrombine aux plaquettes *via* l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ accélère l'activation de la prothrombine et la formation de thrombine, quelque soit la forme activée ou inactivée de la prothrombine ; en revanche, la prothrombine se fixe seulement aux CE ou CML lorsque l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est sous la forme activée (Byzova et al. 1997; Byzova et al. 1998).

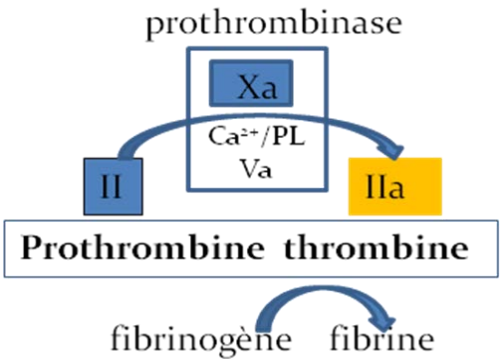


Figure 44 : Schéma de la génération de thrombine.

Pour résumer cette partie, nous avons fait un tableau pour montrer tous les ligands de la sous-unité β3 des intégrines impliqués dans l'hémostase et la pathologie vasculaire (Tableau 5)

Tableau 5 : Ligands pour la sous-unité β_3 des intégrines impliquées dans l'hémostase et la pathologie vasculaire.

Ligand	Description	Liaison $\alpha_{IIb}\beta_3$	Liaison $\alpha_v\beta_3$	Source	Activités
Vitronectine	Glycoprotéine MM≅65–75 kD	Oui	Oui	Protéine soluble plasmatique	Favorise l'adhérence, la migration cellulaire et la cicatrisation.
Fibronectine	Glycoprotéine MM≅235–270 kD	Oui	Oui	Plasma et MEC	Favorise l'adhérence et la migration cellulaire ; est impliquée dans l'agrégation plaquettaire.
Prothrombine	Glycoprotéine; MM ≅72 kD	Oui	Oui	Plasmatique et aux sites de lésions vasculaires	Favorise l'adhérence des cellules vasculaires; est précurseur de la thrombine
Fibrinogène	Composé de 3 paires de chaînes non identiques; MM≅340 kD	Oui	Oui	Protéine soluble plasmatique	Est converti en fibrine lors de la formation de caillots; est impliqué dans l'agrégation plaquettaire.
Thrombospondine	Famille de 5 protéines; TSP1est un trimère de sous-unités identiques; MM de TSP1≅450 kD	Oui	Oui	Granules des plaquettes et la MEC; concentrées sur les sites de lésions vasculaires	Module la migration et la prolifération des cellules vasculaires; Est impliquée dans l'activation du TGF-β latent

Von Willebrand	Glycoprotéine multimérique; MM≅275 kD	Oui	Oui	Protéine plasmatique synthétisée par les CE et les mégacaryocytes	Permet l'adhésion plaquettaire aux sites de lésions; Transporte le Facteur VIII dans le sang
Ostéopontine	Glycoprotéine; MM ≅44 kD	Non	Oui	Sites de lésions vasculaires	Favorise la migration et la survie des cellules vasculaires

MM: masse moléculaire. Adapté d'après (Stouffer et al. 2003)

3.4. Génération de thrombine et activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

3.4.1. Fonction de la thrombine

La thrombine appartient à la famille des sérine-protéases, dont les chefs de file sont la trypsine et la chymotrypsine. Elle présente d'ailleurs une forte homologie de structure avec ces enzymes. De fait, la numérotation des acides aminés de la thrombine la plus usitée dérive de celle du chymotrypsinogène. Dans les conditions physiologiques, la thrombine joue un rôle central dans le système hémostatique (Mann et al. 2003). La coagulation, dont l'étape clé est la génération de thrombine, fait intervenir des protéines plasmatiques appelées facteurs de coagulation (Figure 45) mais nécessite également une surface phospholipidique ainsi que du calcium (Butenas et al. 2002). Mais l'action excessive et même aberrante de la thrombine entraîne la formation de fibrine polymérique qui se dépose dans la lumière des vaisseaux, aboutissant à la formation de thrombus (Borissoff et al. 2009).

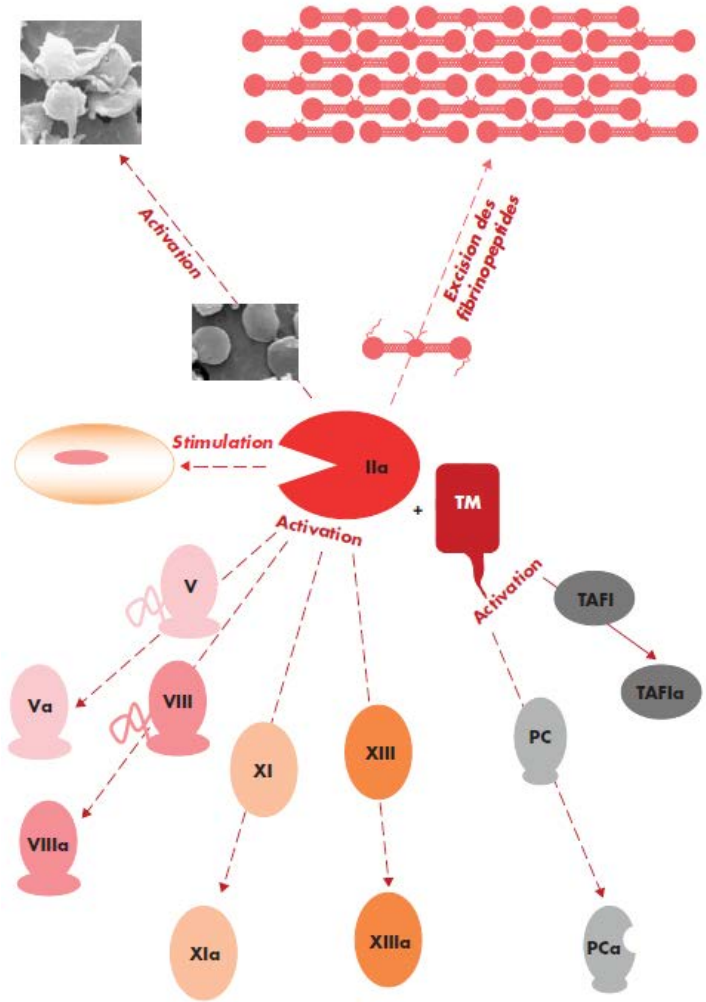


Figure 45 : Implication de la thrombine dans la cascade de coagulation.

La thrombine a des fonctions cellulaires : activation des plaquettes et des facteurs de croissance cellulaire. Elle active les deux cofacteurs protéiques – facteur V et facteur VIII – et aussi le facteur XI

qui est un élément du système d'amplification de la génération de facteur IXa. Elle est responsable de la fibrinoformation et de la stabilisation du réseau de fibrine par l'activation du facteur XIII. Liée à la thrombomoduline (TM), elle inhibe la coagulation en activant la protéine C (PC) et la fibrinolyse en activant le « thrombin activatable fibrinolysis inhibitor » (TAFI).

Adaptée d'après

http://www.jle.com/en/revues/bio_rech/vir/e-docs/00/04/18/BF/texte_alt_jlehma00132_gr1.jpg

La thrombine est capable d'exercer de nombreuses fonctions. La génération de la thrombine est un ensemble d'activations enzymatiques en cascade ayant lieu aux surfaces cellulaires avec des molécules de transit d'une surface à une autre (modèle spatio-temporel). Ce système est finement régulé : dans un premier temps, la thrombine amplifie sa formation, elle active les deux cofacteurs protéiques-facteur V et facteur VII- et aussi le facteur VI qui est un élément du système d'amplification de la génération de facteur IXa, elle est responsable de la fibrinoformation et de la stabilisation du réseau de fibrine par l'activation du facteur XIII; dans un deuxième temps, elle déclenche son système inhibiteur dynamique, liée à la thrombomoduline (TM), elle inhibe la coagulation en activant la protéine C (PC) et la fibrinolyse en activant le TAFI (thrombin activatable fibrinolysis inhibitor). Enfin, d'autres molécules de thrombine sont piégées dans le caillot et adsorbées au réseau de fibrine.

Il a été suggéré que la thrombine exerce au moins 13 actions différentes (Borissoff et al. 2009). Ces actions diverses consolident son caractère multiforme en physiologie et établissent un lien fort entre coagulation et inflammation par sa capacité à activer d'autres cellules que les plaquettes, principalement les leucocytes et les cellules vasculaires qui contribuent aux mécanismes de réactions inflammatoires, de remodelage du vaisseau ainsi qu'à la cicatrisation (Figure 46).

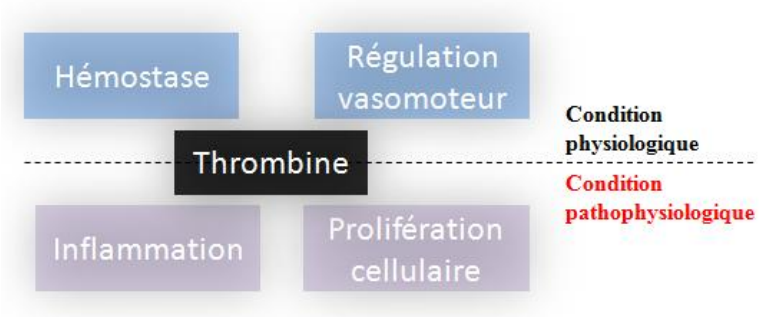


Figure 46 : Multifonctions de la thrombine.

3.4.2. Génération de la thrombine au niveau des CML

La régulation de l'homéostasie vasculaire dépend de la collaboration entre des cellules de la paroi et le système de coagulation. La formation du thrombus artériel peut aboutir à

différentes manifestations cliniques, telles que l'infarctus du myocarde ou l'accident vasculaire cérébral (AVC). La formation du thrombus implique la génération de thrombine, qui active les plaquettes et catalyse la formation de la fibrine. L'activation protéolytique de la prothrombine a lieu en présence de phospholipides (PL) membranaires adaptés. Ces PL servent de plateforme nécessaire à l'action de la prothrombinase. Le modèle le plus courant pour étudier la génération de thrombine utilise les plaquettes comme composante cellulaire. Cependant, la génération de thrombine a été également observée dans des systèmes utilisant les CML, les CE et les macrophages (Pathak et al. 2006).

Les conditions nécessaires pour la génération de thrombine par les CML sont :

-l'assemblage de la prothrombinase complexe sur une surface du phospholipide anionique (PL) (Mann et al. 2003) (Pathak et al. 2006), y compris le FXa, le FVa, le calcium et le PL, généralement fourni par les plaquettes activées et également par les CML quelque soit le phénotype, apoptotique (Flynn et al. 1997) ou non apoptotique (Pathak et al. 2006).

-la présence de son ligand, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, sous sa forme activée. L'activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est nécessaire pour l'adhésion de la prothrombine aux surfaces des CML (récepteur-dépendant) (Byzova et al. 1998; Dardik et al. 2002).

Ainsi, cette liaison permet de générer la thrombine au niveau des CML. Il a été montré que la thrombine pourrait aussi se lier à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans les CE *via* le motif RGD (Bar-Shavit et al. 1991; Byzova et al. 1997; Maragoudakis et al. 2000). Bien qu'il n'y ait pas de témoin qui montre la liaison directe entre la thrombine et l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans les CML, les antagolistes de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ inhibent la prolifération et la formation de l'adhésion focale induites par la prothrombine dans les CML (Sajid et al. 2003).

3.4.3. Effets de la thrombine sur l'activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

Les effets de la thrombine sur l'activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ sont moins connus que ceux sur $\alpha_{IIb}\beta_3$. La thrombine, ainsi que d'autres facteurs plaquettaires, renforcent l'adhésion des plaquettes médiées par l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. La thrombine peut stimuler la migration, la prolifération et la production des GF des CML (Patterson et al. 2001). Le mécanisme passe probablement par l'activation de son récepteur PAR-1 (Stouffer et al. 2003) ou par l'activation de JNK (Stouffer et al. 2003).

Il y a une augmentation de l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans les CML en stimulant par la thrombine (Brown et al. 1994). Le traitement des CML par la thrombine aboutit à une formation rapide des fibres de stress, à une réorganisation du cytosquelette d'actine et à l'assemblage des plaques d'adhésions focales (Ishida et al. 1999). La formation des plaques d'adhésions focales en réponse à la thrombine peut être inhibée dans les CML issues de souris intégrine β_3 KO (Sajid et al. 2003).

IV. Objectifs de la thèse

L'objectif principal de cette thèse a été d'identifier les mécanismes contribuant à la génération de la thrombine induite par les contraintes mécaniques cycliques dans les CML.

Nous souhaitons d'abord déterminer si les contraintes mécaniques sont capables d'induire la génération de thrombine dans les CML, puis, montrer que les récepteurs membranaires et leurs signalisations sont impliqués dans cette fonction cellulaire enfin de mettre en évidence une éventuelle interaction entre la fonction et la signalisation.

Pour notre étude, nous utilisons un modèle mécanique nommé « Flexcell© », qui nous permet d'appliquer des contraintes mécaniques cycliques sur les CML. Par ce moyen, nous avons travaillé sur l'implication de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans la génération de thrombine par les CML en réponse aux contraintes mécaniques cycliques.

Contraintes mécaniques et production de thrombine par les CML.

Dans cette étude, nous souhaitons savoir, *in vitro*, si les contraintes mécaniques cycliques peuvent induire une génération de thrombine au niveau des CML. Cette étude s'intéresse à deux étapes de l'activation des CML. L'une des étapes implique le récepteur de la prothrombine. En effet, une fois que ce récepteur est activé, un plus grand nombre de molécules de prothrombine se fixe sur les récepteurs actifs. L'autre étape implique la disponibilité des surfaces phospholipidiques anioniques nécessaires aux réactions de coagulation sur les CML. La génération de thrombine requiert l'adhésion de la prothrombine aux surfaces des CML ainsi que l'activité procoagulante des phospholipides. La plupart des études ont utilisé les plaquettes comme composante cellulaire pour étudier la génération de thrombine, mais la contribution des CML dans la génération de thrombine et les mécanismes dépendants des contraintes mécaniques ne sont pas connus.

Contraintes mécaniques et activation du récepteur membranaire $\alpha_v\beta_3$ dans les CML. Nous avons étudiés :

L'effet de l'étirement cyclique (10%, 1Hz) sur l'expression des intégrines dans les CML de rat. Nous avons dans un premier temps étudié l'effet des contraintes mécaniques sur l'expression des intégrines dans des temps longs (1-5 jours) et courts (5-360 min).

L'effet de l'étirement cyclique (10%, 1Hz) sur le phénotype de CML de rat.

Nous avons étudié l'organisation du cytosquelette, la différenciation et l'apoptose des CML.

L'effet de l'étirement cyclique (10%, 1Hz) sur la génération de thrombine par les CML de rat.

Nous avons déterminé les effets de l'étirement cyclique sur l'adhésion des CML de rat à la prothrombine, l'activité procoagulante des phospholipides et la génération de la thrombine par les CML.

L'implication de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans la génération de thrombine par les CML de rat.

Nous avons étudié le rôle de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans l'adhésion des CML à la prothrombine, l'activité procoagulante des phospholipides et la génération de thrombine par les CML en présence des peptides antagonistes de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et du siARN αv. Nous avons étudié la phosphorylation des molécules de la signalisation (Src, FAK, AKT et ILK) de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et en particulier le clivage de la taline pour étudier l'activation des intégrines. Pour identifier les molécules spécifiquement impliquées dans la voie de signalisation *via* l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ activées par l'étirement cyclique, nous avons comparé l'effet de différents siARNs inhibant l'expression d'α_v, d'α_5, d'ILK et de taline sur la signalisation.

V. Matériels et méthodes

1. Culture cellulaire

1.1. Isolement et culture des CML

Les CML sont isolées à partir de l'aorte thoracique de rats Wistar mâles, âgés de 6 semaines. L'aorte thoracique est placée dans un milieu sans sérum. L'adventice est retiré, puis l'aorte est ouverte et la couche de CE enlevée en grattant l'intérieur avec le dos d'une pince. La média est découpée en petits fragments, placés dans 1ml de PBS contenant 1mg de collagénase de type II et 0.5mg d'élastase puis mis à agiter durant 1 à 2h à 37°C. La digestion est arrêtée avec un milieu DMEM-F12 contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF). Puis les cellules sont cultivées dans le milieu DMEM-F12 supplémenté avec 10% de SVF et 3mg/ml pénicilline-streptomycine. Le milieu de culture est changé tous les deux jours jusqu'à la confluence des CML.

Lorsque les cellules sont confluentes, elles sont trypsinées et réensemencées. Les cellules sont lavées avec du tampon PBS afin d'éliminer tout le sérum. 5ml de trypsine-EDTA sont ensuite ajoutés dans chaque boîte et les cellules sont incubées pendant 5-8 minutes à 37°C afin de favoriser l'action de l'enzyme et décoller les cellules. La réaction est arrêtée en ajoutant 5ml de DMEM-F12 contenant 10% de SVF, et les cellules sont centrifugées à 1000rpm pendant 10 minutes. Les passages suivants sont réalisés selon le même protocole. Les cellules sont utilisées entre 4 et 8 passages.

1.2. Stimulation mécanique (modèle du flexcell)

1.2.1. Appareil de l'étirement des CML

L'étirement dynamique est réalisé à l'aide d'un système FX-4000T (Flexcell International, USA). C'est un système d'aspiration qui permet d'appliquer des déformations cycliques sur des préparations de cellules cultivées sur une membrane de silicone. Une tension équibiaxiale est générée par l'application d'un vide obtenu grâce à une pompe. Ceci permet la déformation de la membrane de silicone sur laquelle sont cultivées les CML (Figure 47). Les membranes de silicone que nous avons utilisées sont « coatées » au collagène de type I afin de favoriser l'adhésion des CML. Les paramètres modulables sont le pourcentage de déformation de la membrane et la fréquence de déformation pilotés par le logiciel FX-4000.

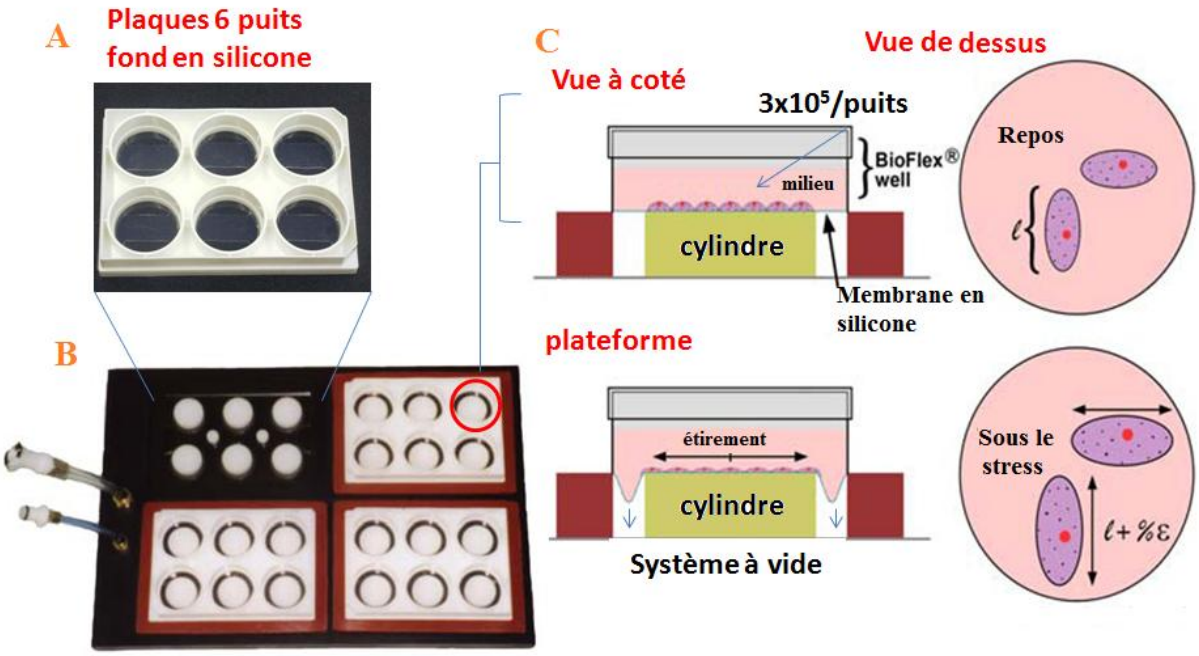


Figure 47 : Modèle du Flexcell.

A) plaque 6 puits à fond de silicone ; B) plateforme pour charger des plaques ; C) principe de fonctionnement du Flexcell.

1.2.2. Conditions de culture pendant la stimulation mécanique

Les cellules sont ensemencées à la concentration de $3x10^5$ cellules par puits dans des plaques six puits à fond de silicone dans du milieu DMEM-F12 contenant 10% de SVF. Après confluence, elles sont synchronisées par privation de sérum pendant 2 jours. Les cellules sont alors soumises à un étirement de déformation de 10% à une fréquence de 1Hz.

Après l'étirement, les cellules sont soit trypsinées et utilisées pour des expériences d'adhésion, de génération de thrombine et de cytométrie en flux, soit fixées pour des marquages immunologiques, soit lysées afin de récupérer les ARN et les protéines.

1.3. Utilisation de peptides inhibiteurs

Les cellules sont cultivées comme décrit précédemment. Les peptides utilisés sont les peptides RGD (Bachem, France) et RGT (GL Biochem, Shanghai, Chine). Soit le peptide RGD linéaire, (-Arg-Gly-Asp-D-) ; soit le peptide RGD cyclique, Cyclo (-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val) ; soit le peptide control RAD, Cyclo (-Arg-Ala-Asp-D-Phe-Val) ; soit le peptide RGT myristolé (-myr-Arg-Gly-Thr), soit le peptide GRT myristolé (-myr-Gly-Arg-Thr). Ces peptides sont mis en suspension dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) ; un volume équivalent de DMSO est rajouté dans les puits contrôles. Les peptides RGD et leur contrôle sont ajoutés

dans les cellules 30 min avant l'étirement cyclique et laissés en contact avec les cellules à la concentration 0.5mM sauf précisé. Les peptides RGT et leur contrôle sont ajoutés dans les cellules 30 min après l'étirement cyclique à la concentration 1mM. La concentration finale des peptides varie entre 0.005mM et 2mM. Les peptides sont ajoutés à la même manière dans les cellules sans étirement.

1.4. Utilisation des siARNs

L'ARN interférence (ARNi) est un mécanisme naturel. C'est un processus de régulation où les ARN messagers, dès qu'ils sont liés à des ARN interférents (siARN) par homologie de séquence, vont être dégradés. Ceci va ainsi permettre d'inhiber l'expression de gènes cibles. Ce mécanisme est devenu une excellente plate-forme technologique pour les études d'expression et de fonctions des gènes. Les siARN permettent d'inhiber complètement ou partiellement l'expression d'un gène spécifique et d'aboutir aux effets de « knock-out » et « knock-down » des gènes cibles.

Nous avons utilisé le système Matra-si (PromoKine). Ce réactif est constitué d'une suspension contenant des nanoparticules avec un revêtement magnétique (MagTag ™) qui peuvent être chargés avec l'acide nucléique d'intérêt (par exemple, l'ADN plasmidique, siRNA ou oligonucléotides). En utilisant une plaque aimantée qui est placée sous les cellules à transfecter, le complexe composé de nanoparticules magnétiques et des acides nucléiques liés est rapidement attiré vers les cellules où il est déposé à une concentration élevée directement sur le membrane cellulaire externe résultant en une transfection très rapide et efficace des cellules. L'absorption de ce complexe par la cellule hôte est réalisée via l'endocytose normale. Dans nos études, les cellules sont ensemencées à la concentration de $8x10^5$ cellules par puit dans un milieu à 10% de SVF. Après 16h d'incubation, le milieu est changé. 1µg de siARNs (α_v, α_5, taline 1, ILK ou control) est mis dans 200µl de milieu DMEM/F12 qui est ensuite mélangé avec 3 µl de MATra-si dans un autre tube. Le mélange est agité doucement au vortex et incubé pendant 15 à 20 min à température ambiante. Le mélange siARN –MATra-si est distribué sur les cellules et agité par des allers-retours. La plaque est mise sur un support « MAgnet plate » et incubée 15 min à 37°C. 24h après la transfection, les cellules sont mises dans du milieu à 0.5% de SVF.

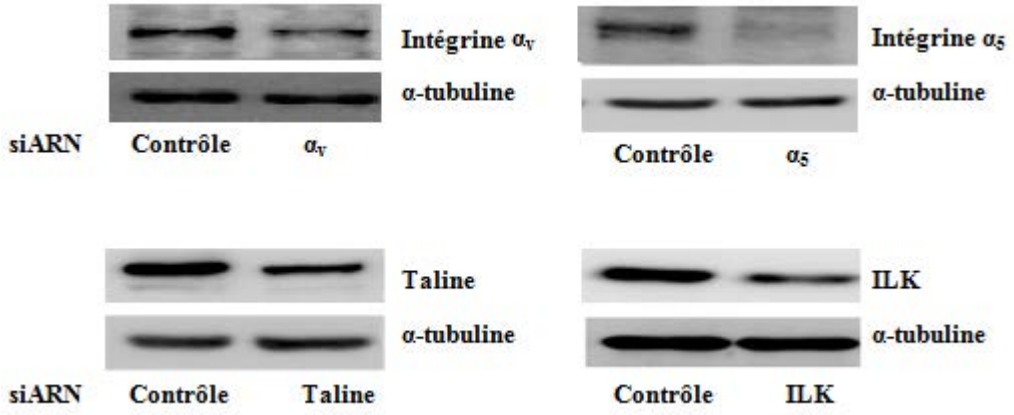


Figure 48 : Efficacité d'inhibition des siRNA utilisé

L'éfficacité des siRNA a été vérifiée en ARN et en protéines. La Figure 48 montre les blots d'expression d'α_v, α_5, de la taline et d'ILK dans les CML de rats 48h après la transfection par les siRNA. Les efficacités en ARN et protéines sont résumées dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Pourcentage d'inhibition en ARN et protéine des siRNA

	α_v	α_5	Taline	ILK
ARN	89	82	63	65
Protéines	41	44	40	48

2. Mesure de la génération de thrombine (thrombinographie)

2.1. Définition générale de la technique

La thrombinographie est une mesure de l'activité thrombinique en fonction du temps grâce à l'enregistrement contenu de la fluorescence libérée lors du clivage d'un substrat fluorogène et spécifique de la thrombine.

2.2. Conditions de réalisation du test

Les mesures thrombinographiques sont réalisées dans le fluorimètre Fluoroskan Ascent (ThermoLabsystems, Helinski, Finland). Un substrat fluorogène de la thrombine (Z-Gly-Gly-Arg-AMC, Bachem), ayant des caractéristiques favorables en termes de Km et de k_{cat}, est utilisé. La fluorescence est enregistrée avec une longueur d'onde d'excitation à 390 nm, une longueur d'onde d'émission à 460 nm et un intervalle de mesure de 15 s. La conversion de la fluorescence en concentration molaire de thrombine est effectuée par le logiciel

Thrombinoscope® BV (Synapse, Maastricht, Pays-Bas). Il a été adapaté pour mesurer la génération de thrombine à la surface des CML de rat.

Un calibrant (mélange d'un complexe α_2-macroglobuline/thrombine humaine) est ajouté sur la plaque. Il sert à corriger les effets de consommation du substrat et de filtre interne ainsi que l'influence de facteurs optiques intrinsèques au plasma, de l'appareillage et des consommables. Il permet également le calcul de la quantité de thrombine générée par conversion des unités de fluorescence obtenues en molarité de thrombine active par le logiciel Thrombinoscope®. Un puits contenant 20 µL de calibrant (Synapse B.V., Maastricht, Pays-Bas) et 80 µL de spécimen plasmatique est inclus dans la plaque pour chaque échantillon étudié. La plaque est placée dans le fluorimètre 5 min avant l'addition par cet appareil de 20 µL d'un mélange de substrat fluorogène et de $CaCl_2$ (100 mM).

Le plasma pauvre en plaquettes (PPP) a été préparé par des centrifugations séquentielles : 190g pour 10min, 1750g pour 10min et 13000g pour 30min. Une fois le PPP prêt à utiliser, on prépare des aliquots et on les congele à -80°C. Les mesures sont réalisées en triplicate dans des microplaques 96 puits en polypropylène, fond rond (Greiner). La génération de thrombine a été enrengistré par le PPP et les CML en suspension (après les avoirs trypsinées) à la concentration de 3×10^6 par mL. La coagulation a été déclenchée par re-calcification en présence de 0.25pM de facteur tissulaire recombinant humain (h-rTF, Dade Behring, Marbourg, Allemagne) (Figure 49). La quantité totale de travail thrombinique est quantifiée par l'aire sous la courbe et est appelée potentiel thrombinique ou « endogenous thrombine» : ETP (Hemker et al. 1993).

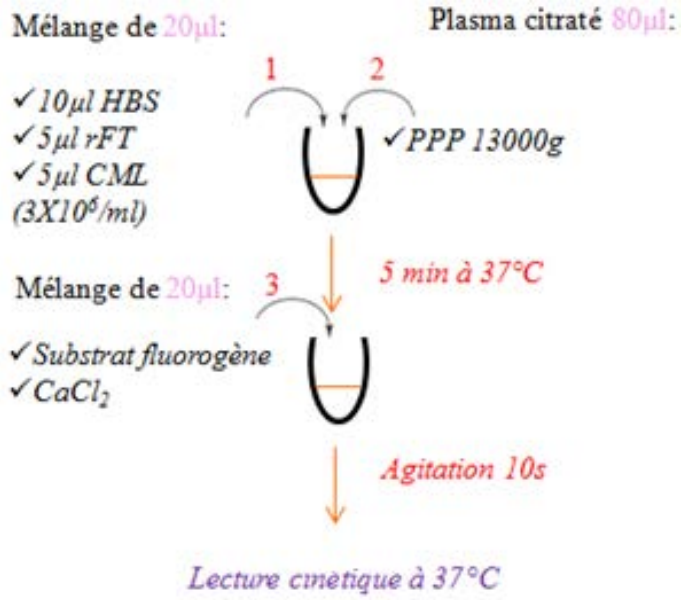


Figure 49 : Protocole pour une étude en thrombinographie pour les CML du rat en suspension.

2.3. Paramètres thrombinographiques

La cinétique de génération de thrombine enregistrée est appelée thrombinogramme et se découpe schématiquement en trois phases : initiation, propagation et terminaison. Le thrombinogramme permet de mettre en évidence plusieurs paramètres (Figure 50) :

Le temps de latence de génération de thrombine ; il correspond à la durée de la phase d'initiation (min).

Le pic qui exprime la quantité maximale de thrombine formée (nM).

Le temps pour atteindre le pic qui donne le temps écoulé au moment du pic de génération de thrombine (min).

La pente maximale de génération de thrombine (nM/min)

Le potentiel thrombinique (ETP pour endogenous thrombin potential). Il est calculé comme l'aire sous la courbe de la concentration de thrombine en fonction du temps par le logiciel Thrombinoscope. L'ETP est le paramètre principal en thrombinographie, il représente la quantité totale de travail enzymatique que la thrombine est capable d'accomplir. Il est

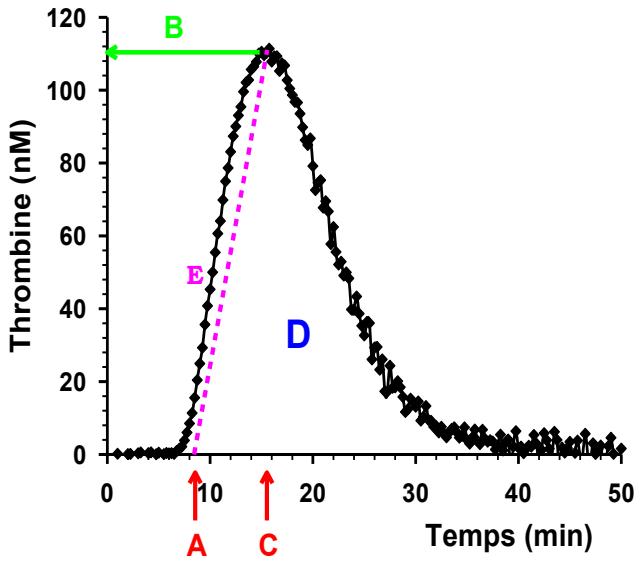


Figure 50 : Paramètres du thrombinogramme

(A) Phase d'initiation (min), (B) Concentration maximale en thrombine (nM), (C) Temps pour atteindre la concentration en thrombine maximale (min) (D) Potentiel endogène de thrombine (ETP) (nM.min), (E) Pente maximale de génération de thrombine (nM/min).

2.4. Mise au point des conditions avec des CML de rat et du PPP humain

Avant tout, nous avons réalisé une série d'expériences visant à déterminer si la génération de thrombine par les CML de rat pouvait être étudiée avec le PPP (plasma pauvre en plaquette) humain.

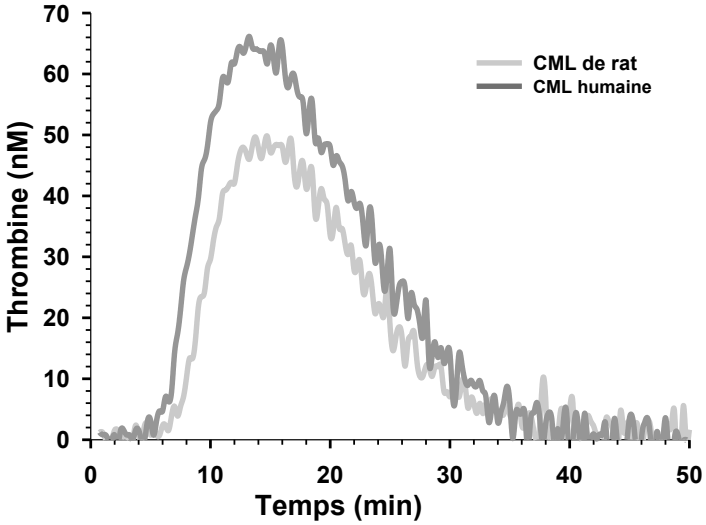


Figure 51 : Génération de thrombine par les CML de rat et humaine.

Thrombinogrammes obtenus à partir de CML de rat et le PPP humain (gris clair) (615±31 nM.min) et de CML humaines et le PPP humain (gris foncé) (972±41 nM.min). Les valeurs représent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes.

En raison de la différence entre les deux espèces, l'ETP des CML de rat est inférieur à celui des CML humaines (Figure 51). La génération de thrombine (ETP) par les deux types cellulaire a le même profil. Ainsi dans cette thèse, nous avons utilisé le PPP humain pour toutes les expériences suivantes sur les CML de rat (Figure 51).

3. Mesure de l'activité procoagulante des phospholipides (PPA)

L'activité procoagulante de phospholipides (PPA) aux surfaces des CML a été mesurée. Cette mesure repose sur la nécessité de surfaces phospholipidiques anioniques pour les réactions de la cascade de la coagulation. Elle est réalisée en système purifié avec apport dans le milieu réactionnel des éléments du complexe prothrombinase qui permet la conversion de prothrombine en thrombine, et de calcium.

La concentration en phospholipides procoagulants dans les CML a été estimée à partir du taux initial de formation de thrombine par référence à la gamme étalon d'un mélange de vésicules (PhtdChol/PhtdSer/PhdtEth 60/20/20 mole%). Les résultats sont exprimés en nanomolaires équivalents de PhtdSer.

Dans ces conditions, l'activité de la prothrombinase est linéaire et dépendante de la quantité de phosphatydylsérine (PhtdSer) dans la gamme. Les CML ont été préparées à la

concentration de 3×10^6 cellules par ml en suspension dans du tampon TBS (50 mM Tris, 175 mM NaCl, 0.02% NaN3, pH 7.9 contenant de 2mg/ml de l'albumine bovine sérique, BSA). Ensuite, 50µL des CML sont ajoutés dans 50 µL d'un mélange de FXa (1.2 nM), FVa (2.4 nM), CaCl2 (15 mM) et 50 µL de prothrombine purifiée bovine (6 µM). Après y avoir ajouté un substrat chromogénique specifique de la thrombine, S2238, à la concentration 0.6mM, on incube ce mélange pendant 5 min dans l'obscurité et à température ambiante. L'absorbance est lue à 405 nm (lecture cinétique pendant 10 min avec un intervalle de mesure de 30 s) (Figure 52).

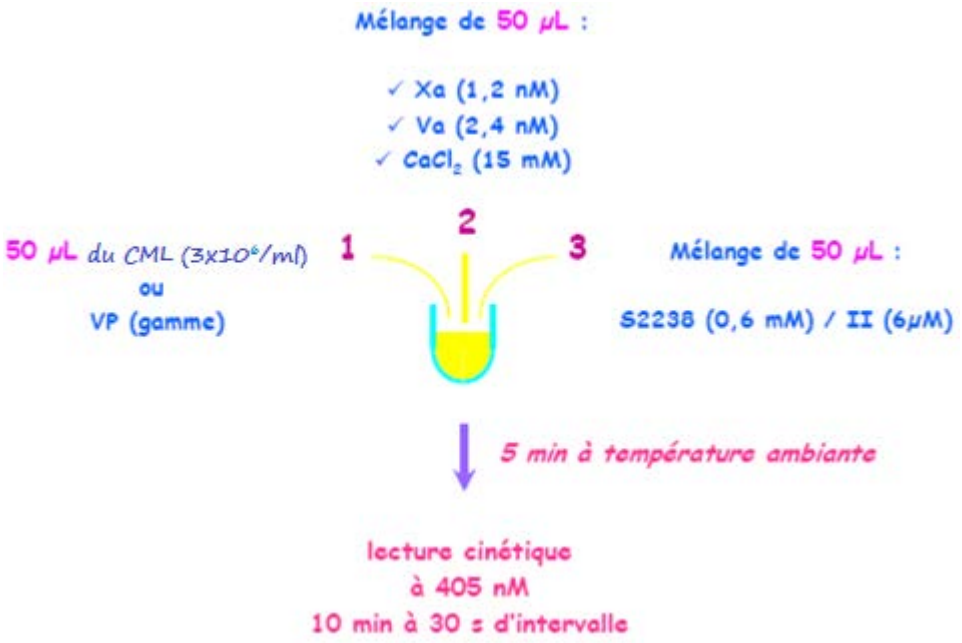


Figure 52 : Protocole de mesure de l'activité procoagulante des phospholipides.

4. Mesure de l'adhésion des CML à la prothrombine immobilisée

4.1. Adhésion

Les plaques de 96 puits sont « coatées » par de la prothrombine bovine (4µg/puits) dans du tampon (50mM de NaHCO3 ; 150mM de NaCl, pH 8) pendant 1h à 37°C. Ensuite les plaques sont saturées avec 3% de BSA (Albumine Bovine) dans le même tampon pendant 1h à 37°C. Les cellules sont reprises dans le milieu sans sérum et ajoutées dans les plaques ($4x10^5$/ml, 200µl/puits) pendant 30min à 37°C.

4.2. Marquage et quantification

Le surnageant est jeté et les cellules adhérentes sont fixées et perméabilisées avec du méthanol froid pendant 5 min puis lavées 2 fois avec du TBS (10mM de Tris-base ; 15mM de NaCl). Les cellules sont marquées avec du Syto-green (50µl/puits) pendant 20 min à

température ambiante. Après 2 rinçages, 200µl de TBS sont ajoutés par puits et la lecture de fluorescence est faite à la longueur d'onde d'excitation 497nm et à la longueur d'onde d'émission 525 nm (Vaioskan Flash Multimode Reader, Thermo Scientific).

5. Immunomarquage et analyse en microscopie confocale

Les cellules sont rinçées avec du TBS puis fixées avec de la paraformaldehyde 4% (w/v dans du TBS) pendant 10min et ensuite rinçées trois fois avec du TBS. Les cellules sont permeabilisées dans du tampon Triton X-100 0.5% (v/v dans du TBS) pendant 15min. L'anticorps primaire anti-αSMA (1A4-Sigma), préparé dans du TBS contenant du Tween 20 0.5% et de la BSA à 1%, est incubé avec les échantillons à température ambiante pendant 1h sous agitation douce. Après trois lavages dans du TBS-T, les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire (couplé au Alexa-Fluor488) pendant 1h à température ambiante. A la fin des marquages, les cellules sont lavées trois fois avant d'être observées en utilisant la ligne d'excitation 488 nm en utilisant la microscopie confocale à balayage laser (Plateforme Imagerie cellulaire et tissulaire PTIBC-IBISA Nancy de l'UMR CNRS 7561 et FR3209; LEICA DMIRE2 HC Fluo TCS 1-B, Allemand).

6. Etude de l'expression des protéines par Western blot

Les cellules sont rinçées avec du PBS. Après lavage au PBS, les étapes suivantes sont réalisées à 4°C. 100µl de tampon de lyse pour protéines sont ajoutés, les cellules sont grattées et transférées dans des microtubes puis incubées 10 à 15 min. Pendant la lyse, les tubes sont vortexés au moins 3 fois. Les lysats cellulaires sont centrifugés 30 min à +4°C à 13000g. Le surnageant est récupéré et conservé à -80°C. Au moins 10µl de surnageant est gardé pour le dosage qui est réalisé avec le kit Biorad (réf, BioRad, 500-0113/4/5).

20µg d'échantillons sont chauffés à 100°C pendant 5 minutes dans du tampon de charge Laemmli, puis refroidis rapidement dans la glace. La migration dans le gel (Annexe Tableau3) de concentration s'effectue à 80V pendant environ 30 minutes. Ensuite, la migration dans le gel de séparation est effectuée à 100V pendant environ 1h et 30min.

Pour le transfert, la membrane de nitrocellulose est placée contre le gel. Les protéines chargées migrent depuis le gel vers la membrane en conservant l'organisation relative qu'elles avaient dans le gel. La fixation des protéines à la membrane se fait grâce à des interactions hydrophobes et ioniques entre la membrane et les protéines (Figure 53).

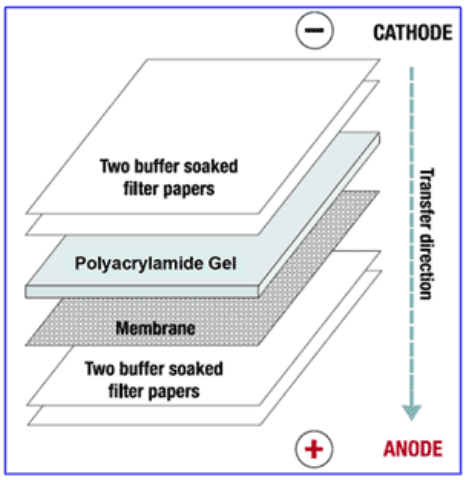


Figure 53 : Schéma de montage du transfert des protéines du gel sur la membrane.

Des membranes et des buvards sont découpés selon la taille du gel puis placées dans le tampon de transfert. Un sandwich du gel et de la membrane est placé entre deux papiers filtres, eux-mêmes placés entre deux mousses (Figure 53). Le tout est mis à l'intérieur d'une cassette soigneusement fermée et plongée dans le tampon de transfert. Il est important dans cette étape de s'assurer qu'il n'y ait pas de formation de bulles qui empêcheraient le transfert. Le transfert est réalisé à 100 mA pendant 3h à 4°C. Après transfert, la membrane est colorée dans la solution de rouge Ponceau S (0.1% Ponceau S (w/v),5% acide acétique(v/v)) pendant environ 30 secondes, ceci permet de mettre en évidence les protéines et de confirmer le transfert. La membrane est ensuite rinçée dans du tampon TBST afin d'éliminer les traces de rouge Ponceau.

Le blocage des sites d'interactions non spécifiques entre la membrane et les anticorps est réalisé dans du TBS-Tween20- lait (5% lait écrémé dans le TBST) pendant une heure à température ambiante. Après le blocage, les anticorps primaires sont dilués à différentes concentrations selon leur spécificité (Annexe Tableau1) et incubés soit à température ambiante pendant 1h, soit à 4°C pendant toute la nuit sous agitation douce. Puis la membrane est lavée quatre fois toutes les 10 minutes dans le TBST sous agitation forte. Ensuite la membrane est incubée avec un anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire. Les anticorps secondaires utilisés dans cette étude sont des anticorps couplés à l'enzyme HRP (horse radish peroxydase). Les anticorps sont dilués dans du TBS-T-lait selon la concentration optimale (Annexe Tableau 4). La membrane est incubée pendant 1 heure sous agitation. Ensuite, la membrane est lavée quatre fois 10 minutes dans du TBST sous agitation forte.

Les membranes sont incubées pendant 5 minutes à l'abri de la lumière avec un mélange des deux réactifs du kit, Immuno-StarTM Western CTM kit (BioRad). Après élimination de l'excès de solution, les membranes sont enveloppées dans un film plastique transparent, puis

placées dans l'enceinte de l'appareil Fuji LAS4000. Plusieurs essais de temps sont réalisés pour déterminer le temps optimal de révélation. Enfin, la mesure de la densité optique des spots obtenus est réalisée avec le logiciel « Multi Gauge ».

7. Etude de l'expression des gènes par PCR en temps réel (PCRq)

7.1. Extraction des ARN

Les cellules sont rinçées avec du tampon PBS, puis l'extraction d'ARN s'effectue selon les recommandations du kit d'extraction des ARN (RNeasy mini kit de chez Qiagen). Pour éviter la contamination avec de l'ADN génomique, une digestion à la DNase est effectuée pendant 15 min à température ambiante. Les ARN sont élués dans de l'eau, chauffés pendant 10min à 65°C puis dosés. Le dosage des ARN est réalisé par spectrophotométrie (Thermo Scientifique nano drop 1000, USA) par lecture des densités optiques (DO) aux longueurs d'onde 260nm et 280nm.

7.2. Transcription inverse (RT)

L'ADNc est obtenu à partir d' 1µg d'ARN par transcription inverse en utilisant des amorces de polydT se fixant sur la séquence poly-adénylée des ARNm. Les ARN sont chauffés pendant 10min à 60°C puis placés aussitôt dans la glace. La RT est réalisée dans un mélange comprenant 1µg d'ARN, 10µM d'oligo (dT) 15 mer, 25mM de dNTP, des inhibiteurs de RNAses, 200U de M-MuLV Reverse Transcriptase et le tampon de réaction 5X à 42°C pendant 90 minutes. La réaction est arrêtée en mettant les tubes à 72°C pendant 10 minutes. Les ADNc sont ensuite conservés à -20°C puis dilués pour être utilisés pour la réaction de PCR.

7.3. Réaction de PCR quantitative en temps réel (PCRq)

La phase d'amplification est réalisée avec un système de SYBR green I (Bio-rad). Après une étape de dénaturation réalisée à 95ºC pendant 3 minutes, l'amplification jusqu'à saturation de l'ADNc se fait selon 50 cycles dans « l'Icycler MyiQ single color Realtime PCR detection system » de BioRad. Le schéma d'un cycle est le suivant : 10 secondes de dénaturation à 95ºC ; 45 secondes d'hybridation des amorces à 62°C (dépend du couple d'oligonucléotides) ; 60 secondes d'élongation à 72°C. Les résultats sont analysés par le logiciel MyiQ (Bio-rad).

8. Double marquage d'Annexin V-PI mésuré par Cytométrie en flux (FACS)

La mesure a été faite à l'aide du kit « AnnexinV-FITC apoptose detection kit » (Sigma, réf 019k4002) selon le protocole du fabricant. Les CML sont trypsinées et lavées par le tampon

PBS, ensuite elles sont comptées et ajustées à $1x10^6$ cellules par ml, dans 500ul du tampon d'Annexin V (1x). Le double marquage a été réalisé à l'abri de la lumière avec 5µl d'AnnexinV-FITC et 10µl d'iodure de propidium (PI) pendant 10min. A la fin de l'incubation, la mesure est réalisée en cytométrie de flux.

Les échantillons sont passés dans un cytomètre de flux Gallios (Beckman Coulter). Un minimum de 10,000 évènements a été collecté lors de chaque analyse. La population cellulaire est repérée en fonction de la taille et de la granulosité de cellules. Une fenêtre prenant en compte uniquement cette population est dessinée.

Les cellules négatives seront considérées comme viables (E3) ; les cellules marquées à l'annexine V sont en apoptose, la zone E4 correspond à l'apoptose précoce, la zone E2 correspond à l'apoptose tardive; les cellules marquées seulement à PI (E1) sont en nécrose (Figure 54).

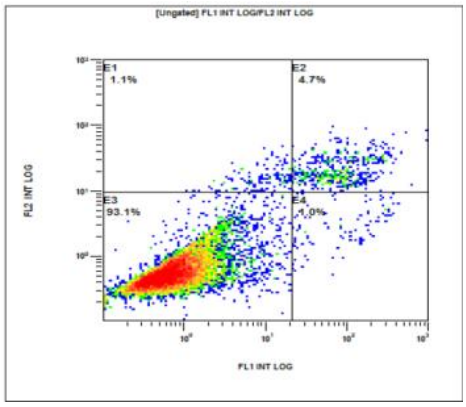


Figure 54 : Exemple de la mesure de double marquage Annexin V-PI en cytométrie de flux.

9. Analyses statistiques

Les résultats sont exprémés en moyenne ± erreur standard à la moyenne (SEM) pour chaque étude. Chaque expérience a été réalisée au moins trois fois en triplicate ($n \geq 3$). Une analyse de variance a été faite avec comparaison des échantillons témoins par un test-*t* non appareillé ou un test-trend ANOVA. Toutes les valeurs de probabilités (p) inférieures à 0,05% ont été considérées comme significatives.

VI. Résultats

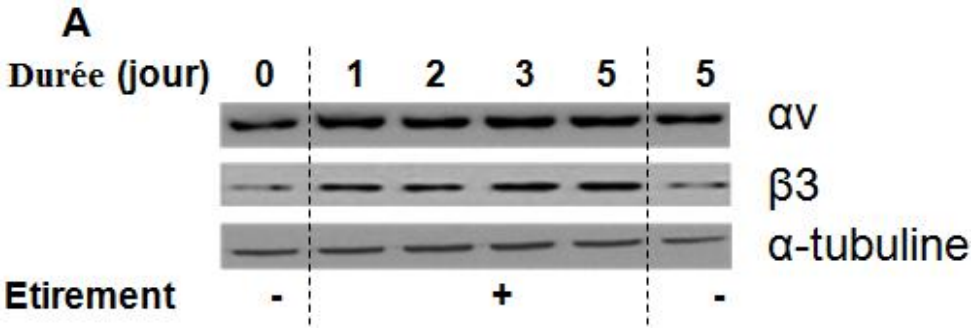
1. Expression des intégrines dans les CML de rat en réponse aux contraintes mécaniques cycliques

Nous avons étudié l'expression des sous-unités α_1, α_5, α_v, β_1 et β_3 des intégrines an niveau transcriptionel et au niveau protéique en réponse à l'étirement cyclique de 5 min à 5 jours.

1.1. Effet de l'étirement cyclique de longue durée

1.1.1. Expression des sous-unités α_v-β_3

Nous avons étudié par western blot l'expression des sous-unités α_v et β_3 des intégrines induite par l'étirement cyclique de 1 jour à 5 jours.



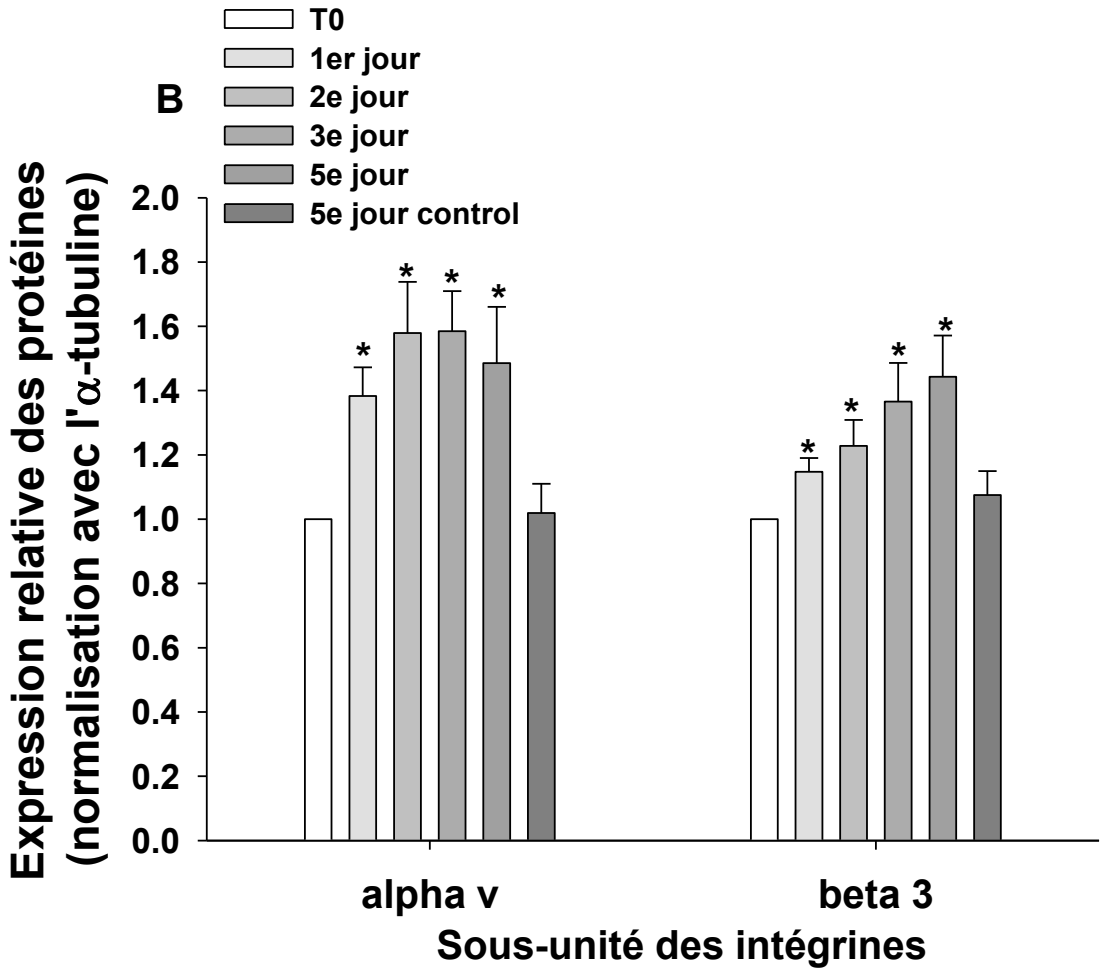


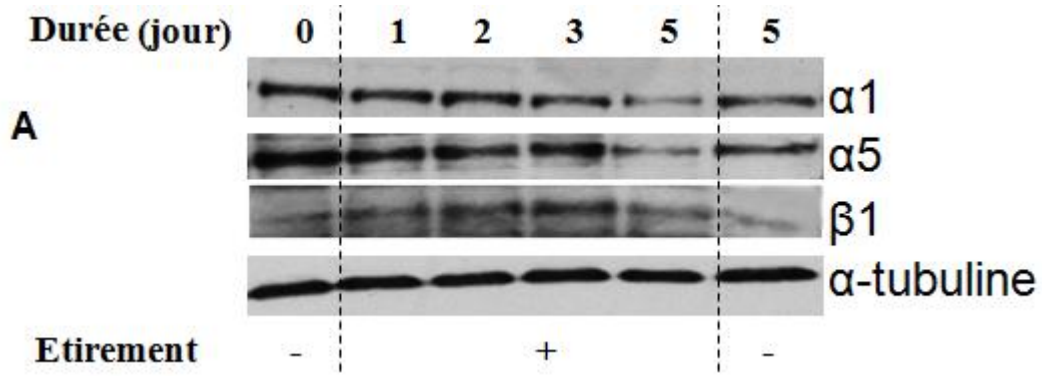
Figure 55 : Effet de l'étirement cyclique sur l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

L'expression des sous-unités α_v et β_3 des intégrines est mesurée par WB. Les cellules sont soumises à un étirement (10%, 1Hz) de 1 jour à 5 jours. L'expression relative des intégrines est calculée par rapport à l'expression de l'α-tubuline. A) Résultat de blot ; B) Quantification.

Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *p≤0.05 *vs* contrôles sans l'étirement.

Les résultats de la Figure 55 montrent i) une augmentation significative de l'expression de la sous-unité α_v induite par l'étirement cyclique dès le premier jour (38%), avec un effet maximum à 2ème jours (58%) qui se maintient jusqu'au 5ème jour (49%) (Figure 55) ; ii) une augmentation significative de l'expression de la sous-unité β_3 induite par l'étirement cyclique dès le premier jour (15%) qui augmente jusqu'au 5ème jour (44%). En absence de contrainte mécanique l'expression des unités α_v et β_3 ne varie pas après 5 jours de culture (Figure 55).

1.1.2. Expression des sous-unités α_1-α_5-β_1



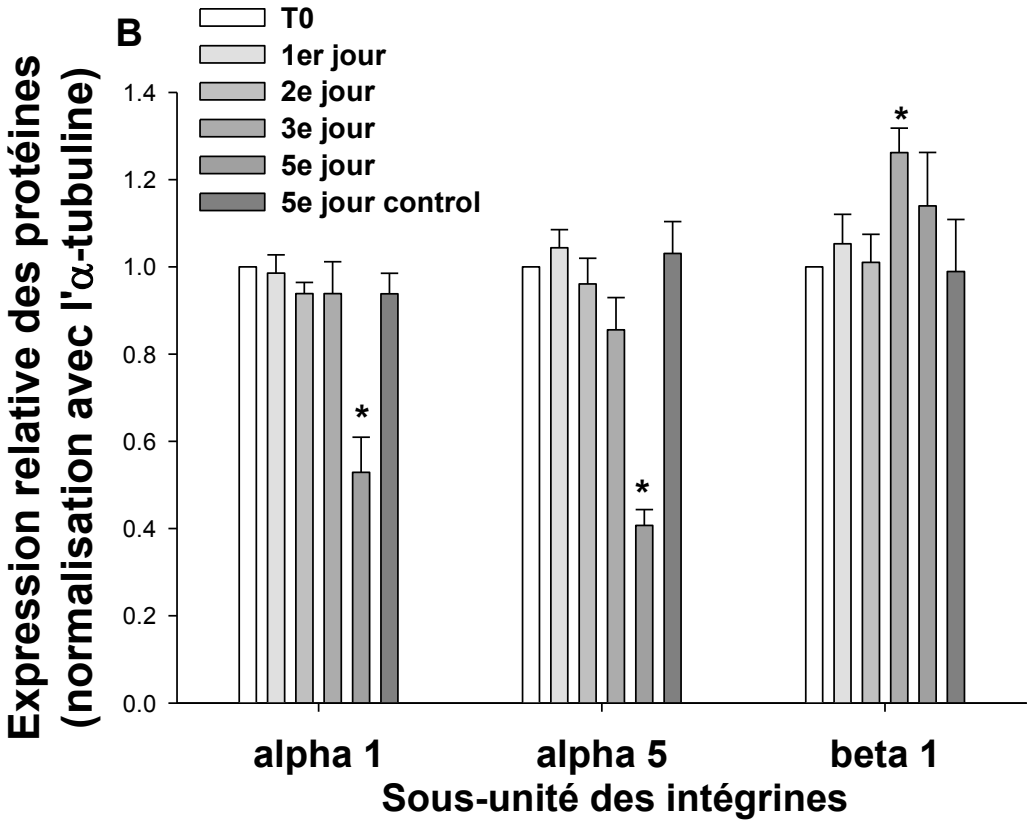


Figure 56 : Effet de l'étirement cyclique sur l'expression des sous unités α_1, α_5 et β_1 des intégrines.

L'expression des sous-unités α_1, α_5 et β_1 des intégrines est mesurée par WB. Les cellules sont soumises à un étirement (10%, 1Hz) de 1er jour à 5ème jours. L'expression relative des intégrines est calculée par rapport à l'expression de l'α-tubuline. A) Résultat de blot ; B) Quantification.

Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *p≤0.05 vs contrôles sans l'étirement.

L'expression d'α_1 et α_5 est constante jusqu'au 3^{ième} jour d'étirement puis diminue significativement à 5 jours (47-59% respectivement). L'expression de β1 augmente significativement après 3 jours d'étirement cyclique (26%). En absence de contrainte mécanique l'expression des unités α_1, α_5 et β_1 ne varie pas après 5 jours de culture (Figure 56).

1.2. Effet de l'étirement cyclique de courte durée

1.2.1. Expression des sous-unités α_v-β_3

Nous avons étudié l'expression des sous-unités α_v et β_3 des intégrines en réponse à un étirement cyclique de 5 min à 360 min par le western blot et PCRq.

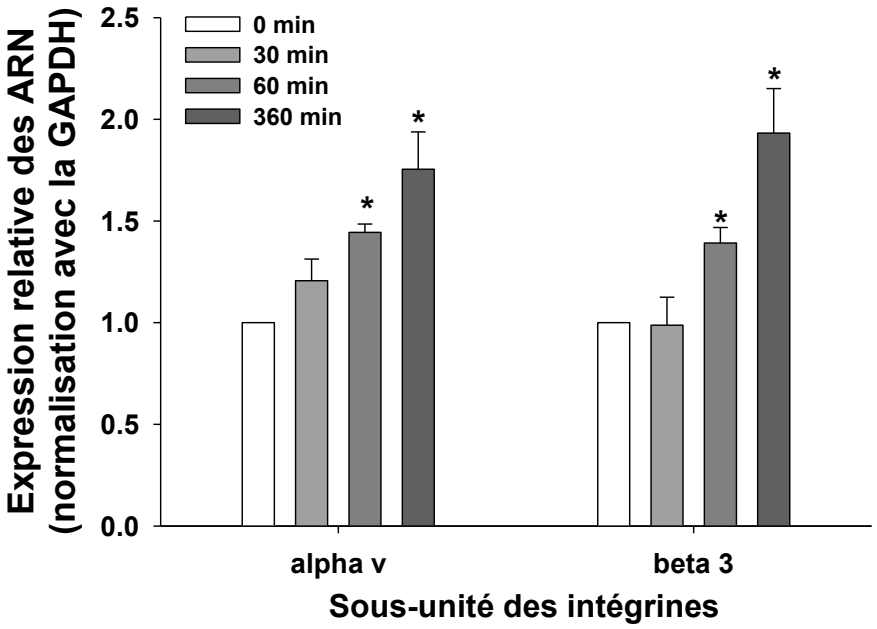
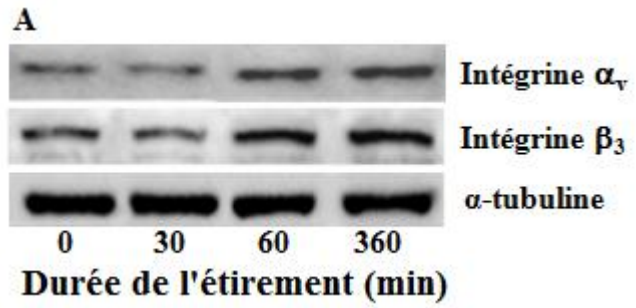


Figure 57 : Effet de l'étirement cyclique sur l'expression des ARNs des sous-unités α_v et β_3 des intégrines par le qPCR.

Les cellules sont soumises à un étirement (10%, 1Hz) de 30 min à 360 min. L'expression relative des intégrines est calculée par rapport à l'expression de la GAPDH. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *$p \leq 0.05$ vs contrôles sans l'étirement

Au niveau transcriptionnel (Figure 57), les résultats montrent, une augmentation significative des sous-unités α_v et β_3 à partir de 60 min (44 et 39% respectivement).



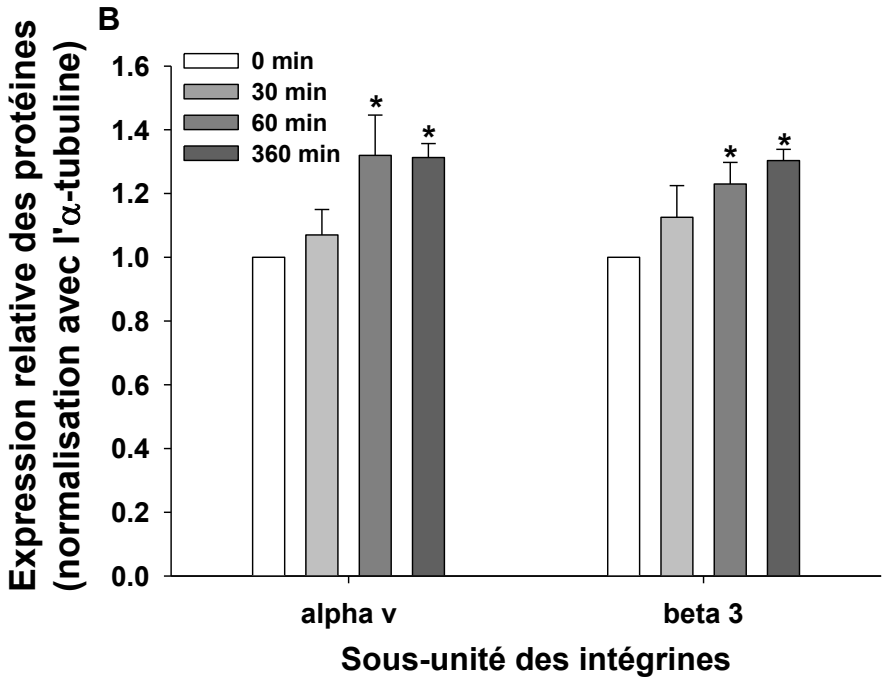


Figure 58 : Effet de l'étirement cyclique sur l'expression protéique des sous-unités α_v et β_3 des intégrines.

L'expression des sous-unités α_v et β_3 des intégrines est mesurée par WB. Les cellules sont soumises à un étirement (10%, 1Hz) de 30 à 360 min. L'expression relative des intégrines est calculée par rapport à l'expression de l'α-tubuline. A) Résultat de blot ; B) Quantification.

Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *$p \leq 0.05$ *vs* contrôles sans l'étirement.

Au niveau protéique (Figure 58), les résultats montrent, en réponse à l'étirement cyclique, i) une augmentation significative de l'expression d'α_v de 31% à partir de 60 min qui est maintenue à 360 min ; ii) une augmentation significative de l'expression de la sous-unité β_3 à 60min (23%) maintenue à 360 min.

1.2.2. Expression des sous-unités α_1-α_5-β_1

Nous avons également étudié l'expression des sous-unités α_1, α_5 et β_1 des intégrines induite par l'étirement cyclique de 5 min à 360 min par le western blot et PCRq.

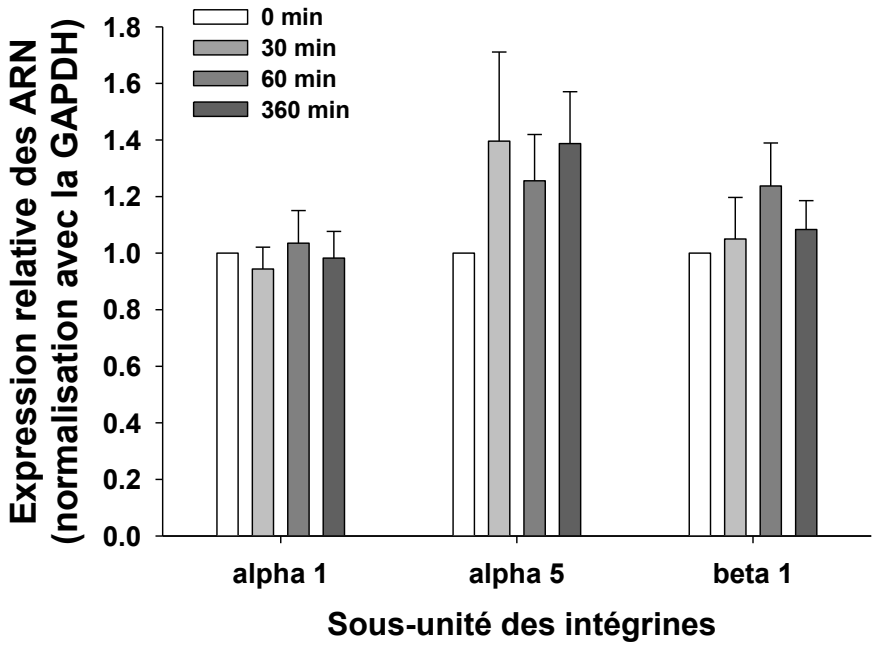


Figure 59 : Effet de l'étirement cyclique sur l'expression des ARN.

L'expression des sous-unités α_1, α_5 et β_1 des intégrines est mesurée par le PCRq. Les cellules sont soumises à un étirement (10%, 1Hz) de 30 min à 360 min. L'expression relative des intégrines est calculée par rapport à l'expression de la GAPDH. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *$p \leq 0.05$ vs contrôles sans l'étirement

Au niveau transcriptinel, les résultats ne montrent aucun changement significatif de l'expression des sous-unités α_1, α_5 et β_1 en réponse à l'étirement cyclique pendant la période de 30 à 360 min (Figure 59).

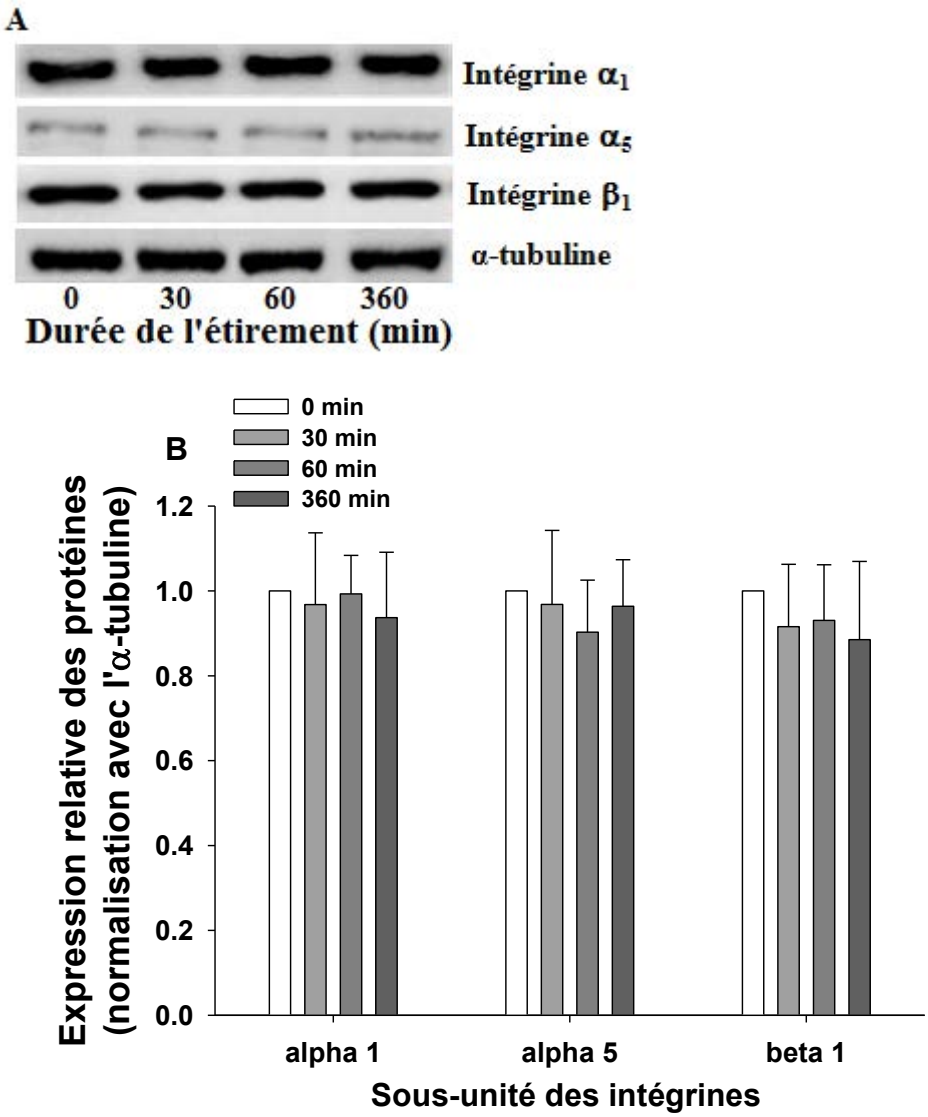


Figure 60 : Effet de l'étirement cyclique sur l'expression protéique.

L'expression des sous-unités α_1, α_5 et β_1 des intégrines est mesurée par WB. Les cellules sont soumises à un étirement (10%, 1Hz) de 30 à 360 min. L'expression relative des intégrines est calculée par rapport à l'expression de l'α-tubuline. A) Résultat de blot ; B) Quantification.

Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *$p \leq 0.05$ *vs* contrôles sans l'étirement.

Au niveau protéique, les résultats ne montrent aucun changement significatif de l'expression des sous-unités α_1, α_5 et β_1 en réponse à l'étirement cyclique pendant la période de 30 à 360 min (Figure 60).

En résumé, nous avons mis en évidence : i) une augmentation des sous-unités α_v et β_3 dès 60 min en réponse aux contraintes mécaniques ; ii) une augmentation transitoire de la sous-unité β_1 au niveau protéique après 3 jours de d'étirement ; iii) et pas de changement d'expression des sous-unités α_1 et α_5.

2. Effet des contraintes mécaniques cycliques sur le phénotype des CML de rat

Afin de déterminer le phénotype des CML en réponses aux contraints mécaniques cycliques, nous avons déterminé :

i) la répartition des filaments d'actine en microscopie confocale

ii) l'expression en ARN et protéines des marqueurs du cytosquellette (α-SMA, SM-MHC, smootheline)

iii) l'état apoptotique des cellules par quantification en cytométrie de flux des cellules marquées AnnexinV/PI et par western blot des protéines MAP kinases, Bax-Bcl2 et caspase 3.

2.1. Différenciation des CML de rat

2.1.1. Structure du cytosquelette d'actine

Nous avons étudié l'effet des contraintes mécaniques cycliques à 60 et 360 min sur la structure du cytosquelette de l'α-SMA dans les CML de rat.

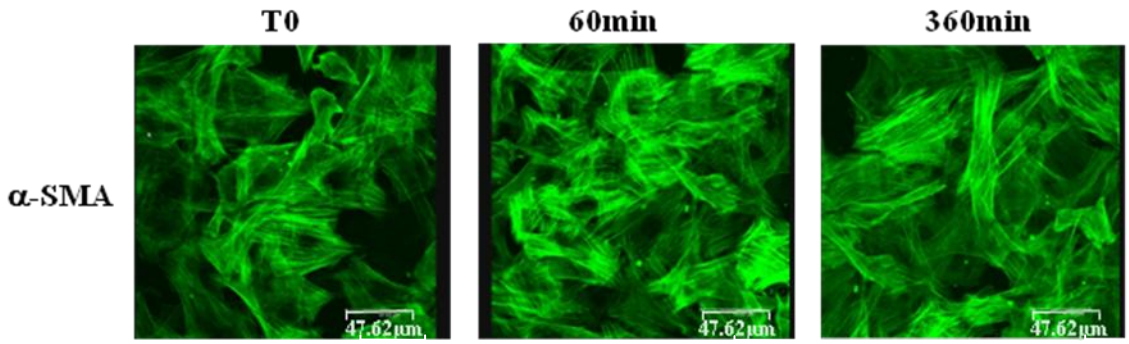


Figure 61 : Expression de l'α-SMA (en vert) dans les CML de rat.

Les CML de rat sont soumises à un étirement (10%, 1Hz) de 60 et 360 min respectivement par rapport à leur témoin sans l'étirement (T0) (Microscope confocal Leica).

En réponse aux contraintes mécaniques cycliques, nous n'avons pas trouvé de changements morphologiques significatifs ou de distribution clairement différente de l'α-SMA dans les CML de rat comparées aux CML contrôles. Ainsi, l'étirement cyclique n'entraîne pas de désorganisation du cytosquelette d'a-SMA dans les CML de rat (Figure 61).

2.1.2. Marqueurs de différenciation des CML

Nous avons ensuite déterminé l'état de la différenciation des CML par l'analyse de trois marqueurs : l' α-SMA, la SM-MHC et la smootheline par le PCRq et Western blot.

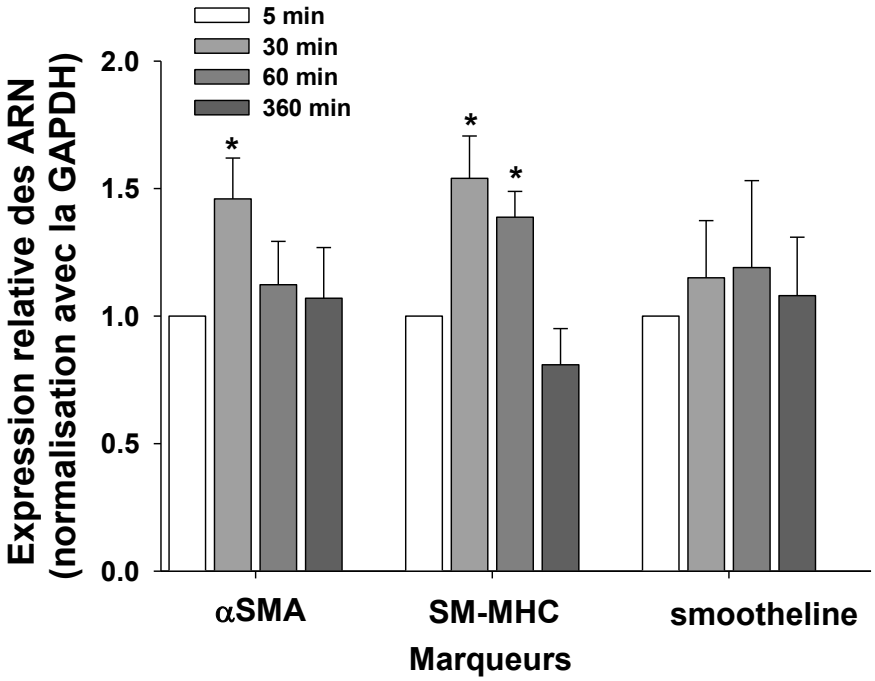
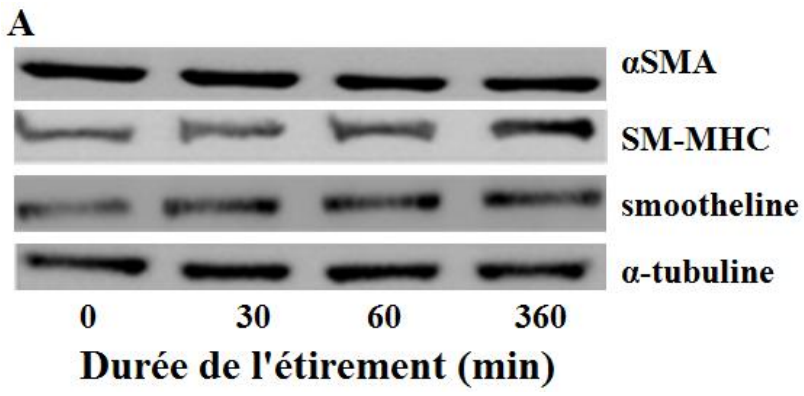


Figure 62 : Analyse par PCRq de l'expression des marqueurs de différenciation.

L'expression des marqueurs (α-actine, SM-MHC et smootheline) est mesurée par le PCRq. Les cellules sont soumises à un étirement (10%, 1Hz) de 30 min à 360 min. L'expression relative des intégrines est calculée par rapport à l'expression de la GAPDH. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *p≤0.05 vs contrôles sans l'étirement.

Au niveau transcriptionnel (Figure 62), le résultat de PCRq montre, en réponse aux contraintes mécaniques cycliques, i) une augmentation significative et transitoire de l'α-SMA de 46% à 30 min ; ii) une augmentation significative et transitoire de la SM-MHC à 30 min et 60 min (39 à 54%); iii) mais pas de différence de la smootheline.



c

Figure 63 : Analyse de l'expression par Western blot.

L'expression des marqueurs (α-actine, SM-MHC et smootheline) est mesurée par WB. Les cellules sont soumises à un étirement (10%, 1Hz) de 30 à 360 min. L'expression relative des intégrines est calculée par rapport à l'expression de l'α-tubuline. A) blot ; B) Quantification.

Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *p≤0.05 *vs* contrôles sans l'étirement.

Au niveau protéique (Figure 63), les résultats de Western blot montre, en réponse aux contraintes mécaniques cycliques, i) une augmentation significative de l'expression de la SM-MHC de 42% à 60 min; ii) pas de différence pour l'α-SMA et la smootheline.

2.2. Marqueurs d'apoptose des CML

2.2.1. Annexin V/PI

Pour étudier l'apoptose des CML en réponse à l'étirement, nous avons fait un double marquage à l'annexine V et à l'iodure de propidium (PI) mesuré en cytométrie de flux. Les cellules négatives seront considérées comme viables (E3), les cellules marquées à l'annexine V sont en apoptose (E2+E4), et les cellules marquées seulement à PI (E1) sont en nécrose (Figure 64).

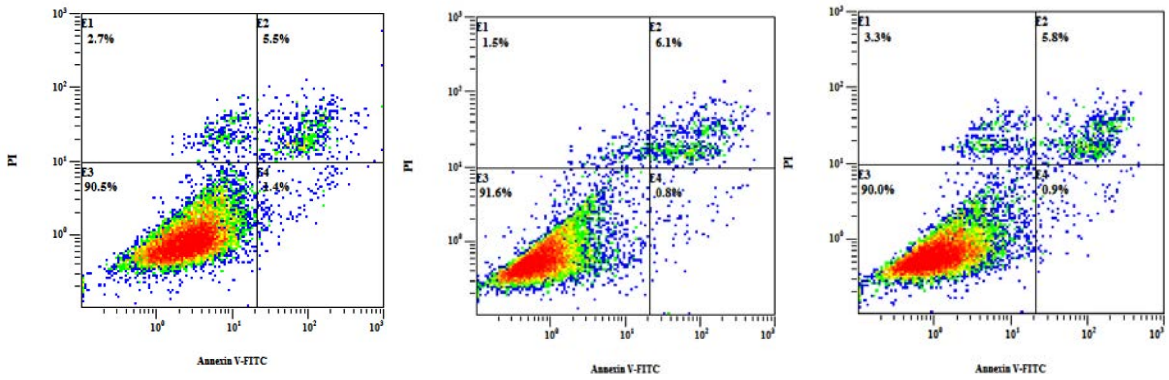


Figure 64 : Mesure de l'apoptose des CML.

Les CML de rat sont soumises à un étirement (10%, 1Hz) de 60 (milieu) et 360 min (droit) respectivement par rapport à leur témoin T0 sans l'étirement (gauche) via le double marquage de l'annexinV-IP par la cytométrie en flux.

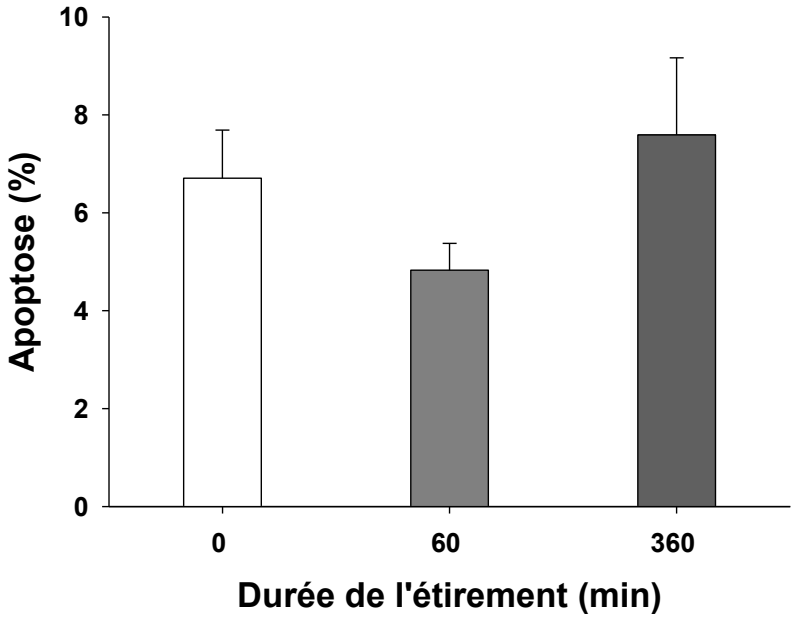


Figure 65 : Effet de l'étirement sur l'apoptose des CML.

Les cellules sont soumises à un étirement (10%, 1Hz) de 60 et 360 min respectivement. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits de trois expériences indépendantes. *$p \leq 0.05$ par rapport à T0.

Au niveau de base, 6,7% des CML sont apoptotiques, du à la privation du sérum pendant 48 h. Les contraintes mécaniques n'induisent pas d'augmentation de l'apoptose (Figure 65).

2.2.2. Clivage de Caspase 3

Pour compléter le résultat de Annexin V-PI sur l'apoptose des CML, nous avons également mesuré le clivage de la caspase 3 par la méthode de Western blot.

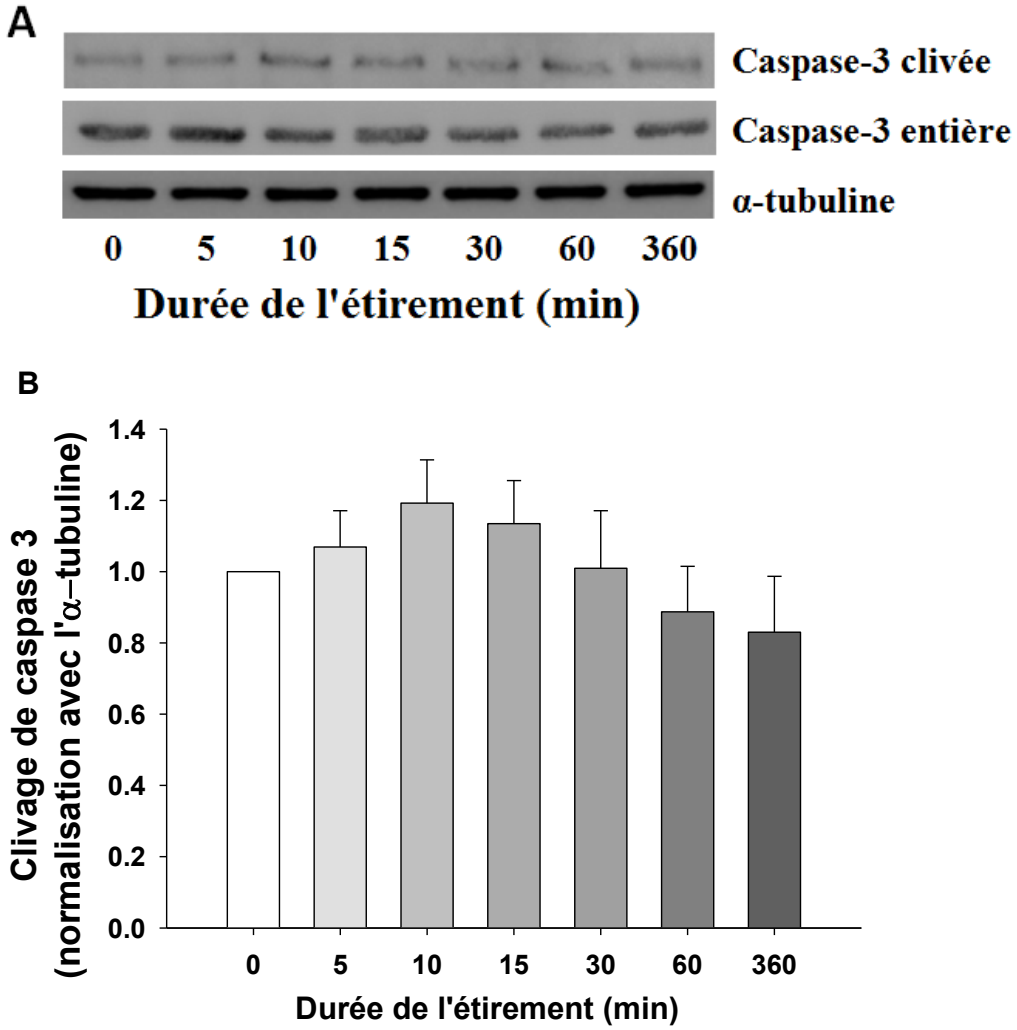


Figure 66 : Clivage de la caspase-3 en réponse à l'étirement.

Les cellules sont soumises à un étirement (10%, 1Hz) à partir de 5 min jusqu'à 360 min Le clivage de la caspase 3 est calculé comme caspase 3 clivée/caspase 3 totale également divisé par l'expression de l'α-tubuline. A) Résultat de blot ; B) Quantification. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *p≤0.05 par rapport à T0.

Les résultats montrent qu'il n'y a pas d'augmentation significative du clivage de la caspase 3 induite par l'étirement cyclique. (Figure 66).

2.2.3. Ratio de Bax/Bcl2

Nous avons ensuite étudié l'expression de Bax et Bcl2. Un ratio de Bax/Bcl2 plus élevé signifie une apoptose cellulaire plus importante.

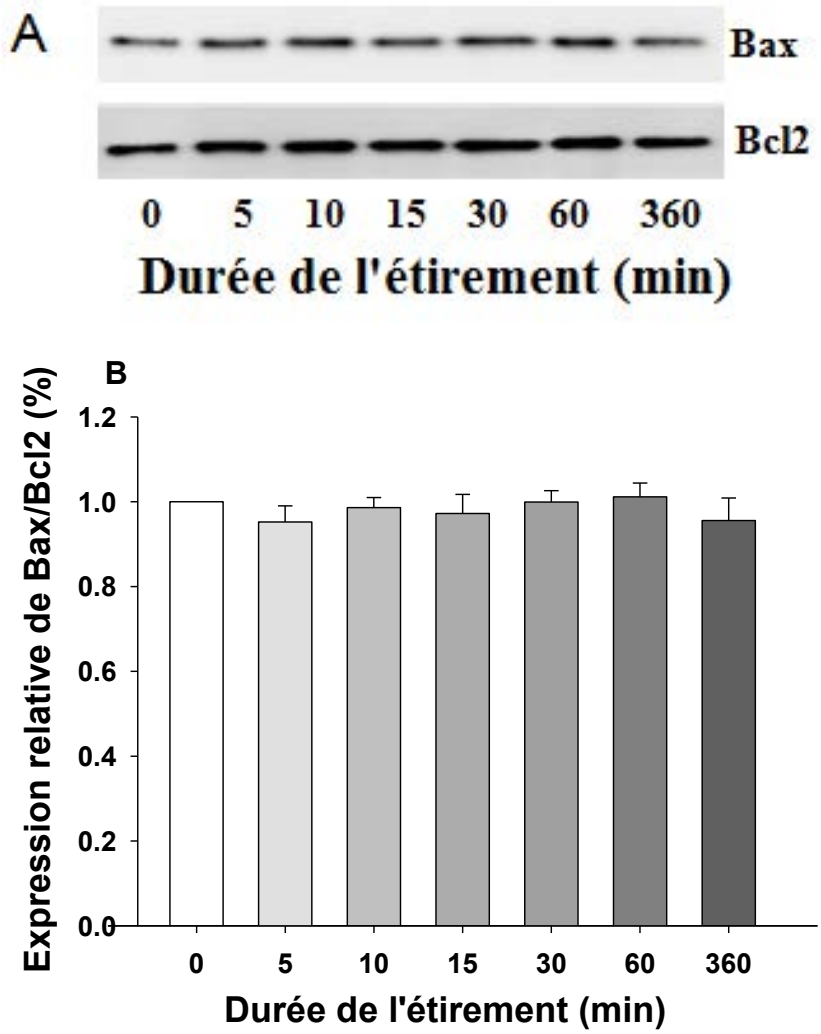


Figure 67 : Expression relative de Bax/ Bcl2 en réponse à l'étirement.

Les cellules sont soumises à un étirement (10%, 1Hz) à partir de 5 min jusqu'à 360 min. Le ratio est calculé comme Bax/Bcl2. A) Résultat de blot ; B) Quantification. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *p≤0.05 par rapport à T0.

Dans ce modèle, les résultats montrent que les contraintes mécaniques n'ont aucun effet significatif sur le ratio de Bax /Bcl2 (Figure 67).

2.2.4. Phosphorylation de p44/42 et p38 MAPK

Nous avons aussi étudié les phosphorylations de p44/42 et p38 MAPK. La phosphorylation de p44/42 MAPK plus élevé correspond à un phénotype prolifératif, en revanche, la phosphorylation de p38 MAPK plus élevé correspond à l'apoptose et/ou l'inflammation cellulaire.

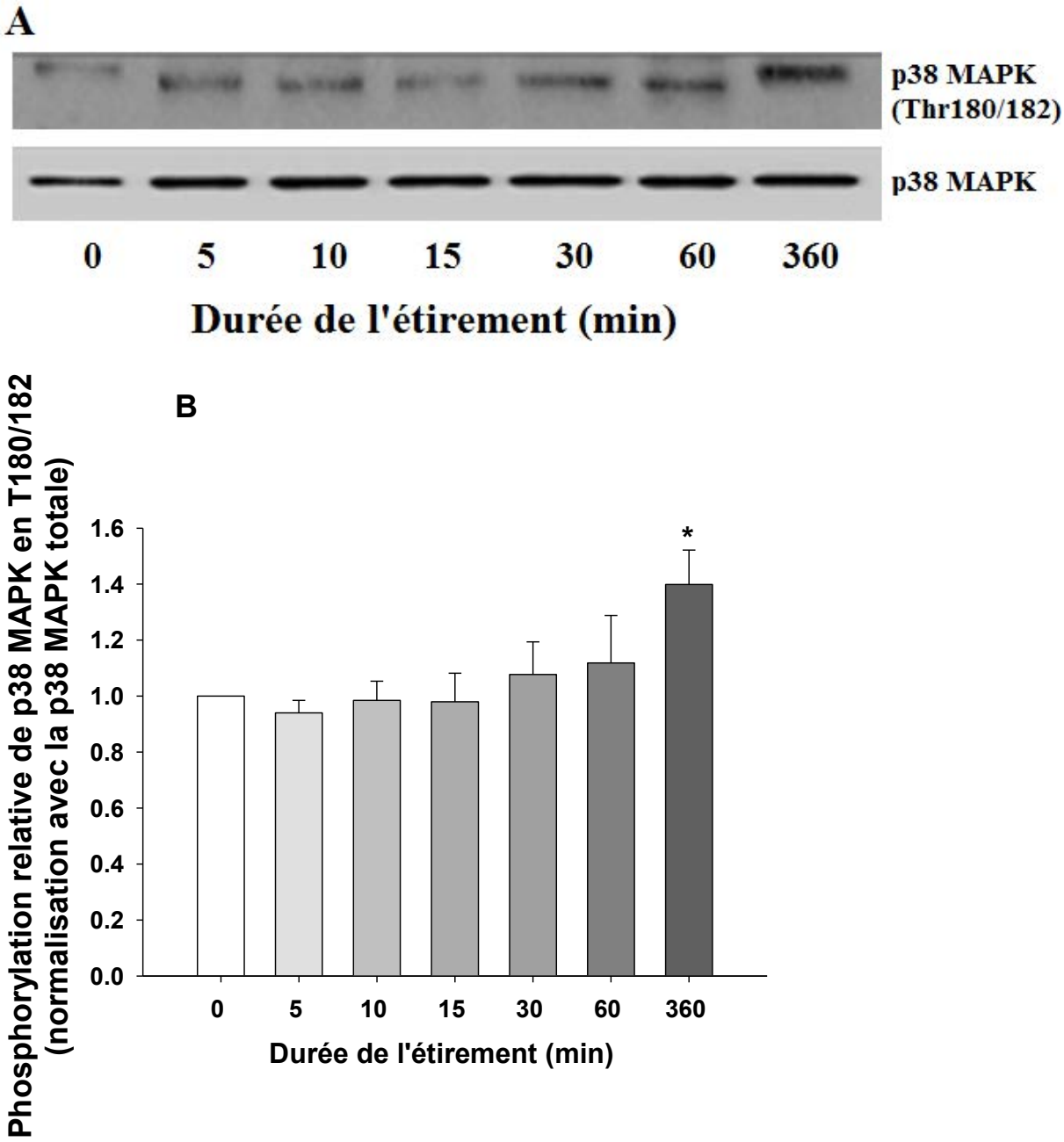


Figure 68 : Phosphorylation de p38 en T180/T182 en réponse à l'étirement.

La phosphorylation de p38MAPK est calculée par rapport à l'expression de p38MAPK totale. Les cellules sont soumises à un étirement de 5 min à 360 min. A) Résultat de blot ; B) Quantification. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *p≤0.05 par rapport à T0.

Les résultats montrent qu'il y a une augmentation significative de la phosphorylation de p38MAPK de 40% à 360 min d'étirement cyclique (Figure 68).

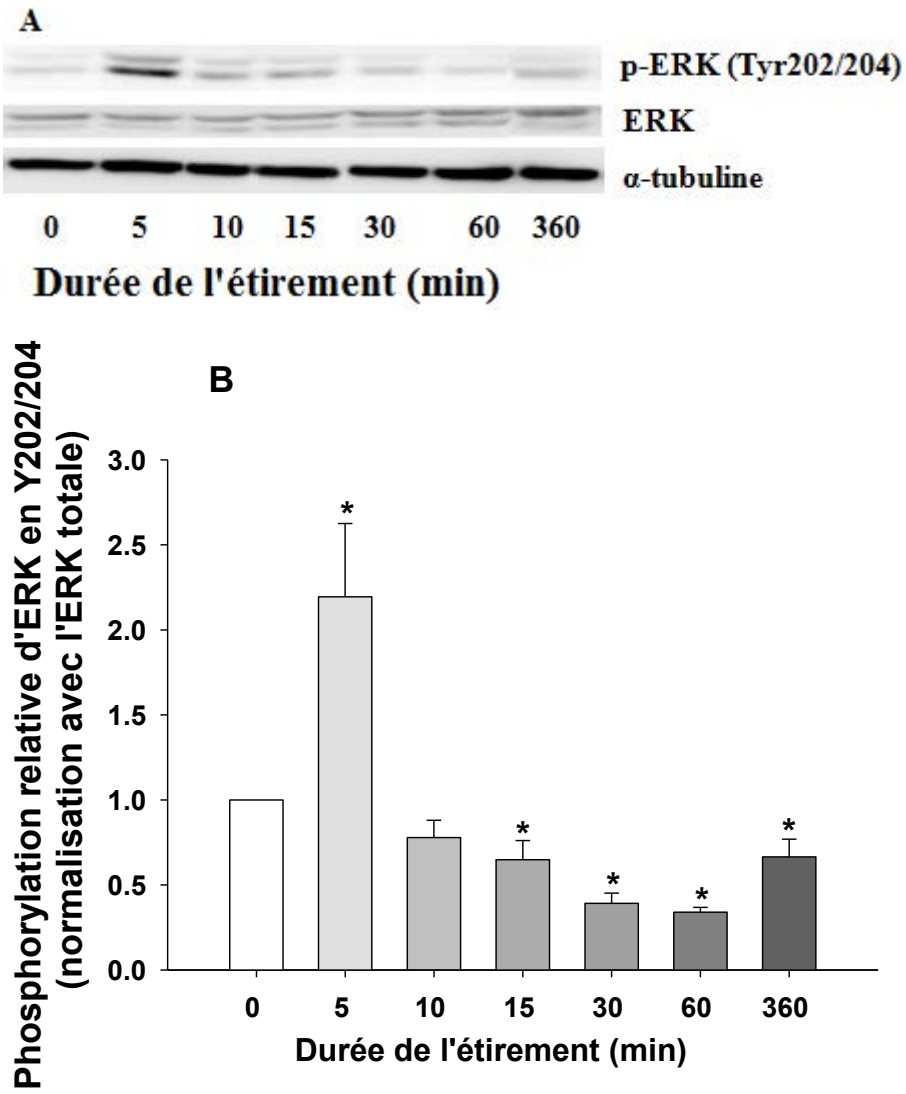


Figure 69 : Effet de l'étirement sur la phosphorylation d'ERK1/2 en Y202/Y204.

La phosphorylation d'ERK est calculée par rapport à l'expression d'ERK totale. Les cellules sont soumises à un étirement (10%, 1Hz) de 5 à 360 min. A) Résultat de blot ; B) Quantification. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *p≤0.05 par rapport à T0.

Les résultats montrent qu'il y a une augmentation de la phosphorylation d'ERK de 119% après 5 min d'étirement cyclique. Cette augmentation diminue rapidement dès 10 min (Figure 69).

En résumé, seul p38 est augmenté après 360 min d'étirement cyclique. Nous n'avons pas trouvé de différence sur le marquage Annexin V/PI, le clivage de Caspase 3 et le ratio de Bax/Bcl2. Nous concluons qu'il n'y a pas d'effet apoptotique de l'étirement cyclique sur les CML dans ces conditions expérimentales.

3. Effet de l'étirement cyclique sur la signalisation des intégrines dans les CML de rat

Nous avons étudié des molécules impliquées dans la signalisation des intégrines en réponse à l'étirement cyclique. Nous avons étudié la phosphorylation de Src (p-Y418), de FAK (p-Y576/577), d'AKT (p-T308) et d'ILK (p-T173) ainsi que le clivage de taline.

3.1. Phosphorylation de Src

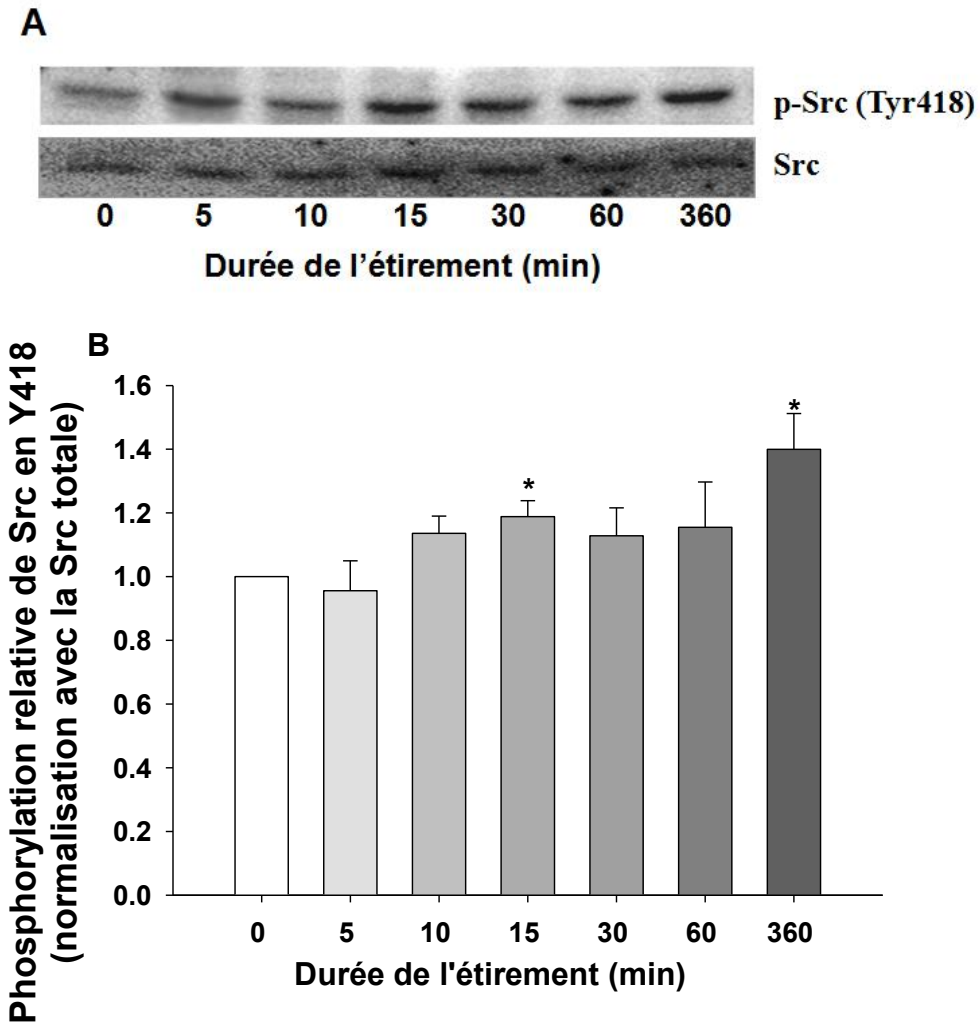


Figure 70 : Effet de l'étirement cyclique sur la phosphorylation de Src en Y418.

Les cellules sont soumises à l'étirement cyclique de 5 min à 360 min; La phosphorylation de Src est calculée par rapport à l'expression de la Src totale. A) Résultat de blot ; B) Quantification. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *$p \leq 0.05$ par rapport aux contrôles sans l'étirement.

Les résultats montrent une augmentation significative de la phosphorylation de Src en Y418 induite par l'étirement cyclique à 15 min à 360min, avec un pic à 15 min de 19% puis 360 min de 40% (Figure 70).

3.2. Phosphorylation de FAK

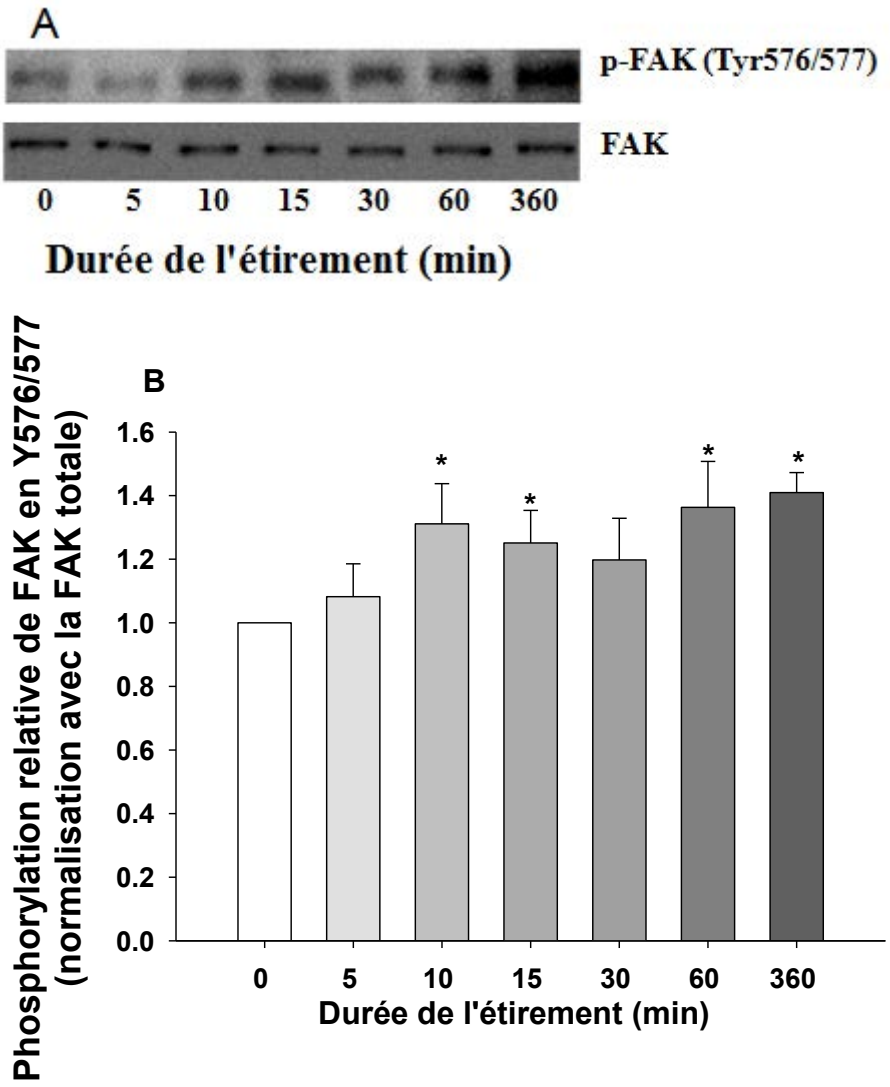


Figure 71 : Effet de l'étirement cyclique sur la phosphorylation de FAK en Y576/577.

Les cellules sont soumises à un étirement de 5 min à 360 min. La phosphorylation de FAK est calculée par rapport à l'expression de FAK totale. A) Résultat de blot ; B) Quantification. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *p≤0.05 par rapport aux contrôles sans l'étirement.

Les résultats montrent une augmentation significative de la phosphorylation de FAK en Y576/577 induite par l'étirement cyclique à partir de 10 min jusqu'à 360 min, avec un effet maximum à 360 min de 41% (Figure 71).

3.3. Phosphorylation d'AKT

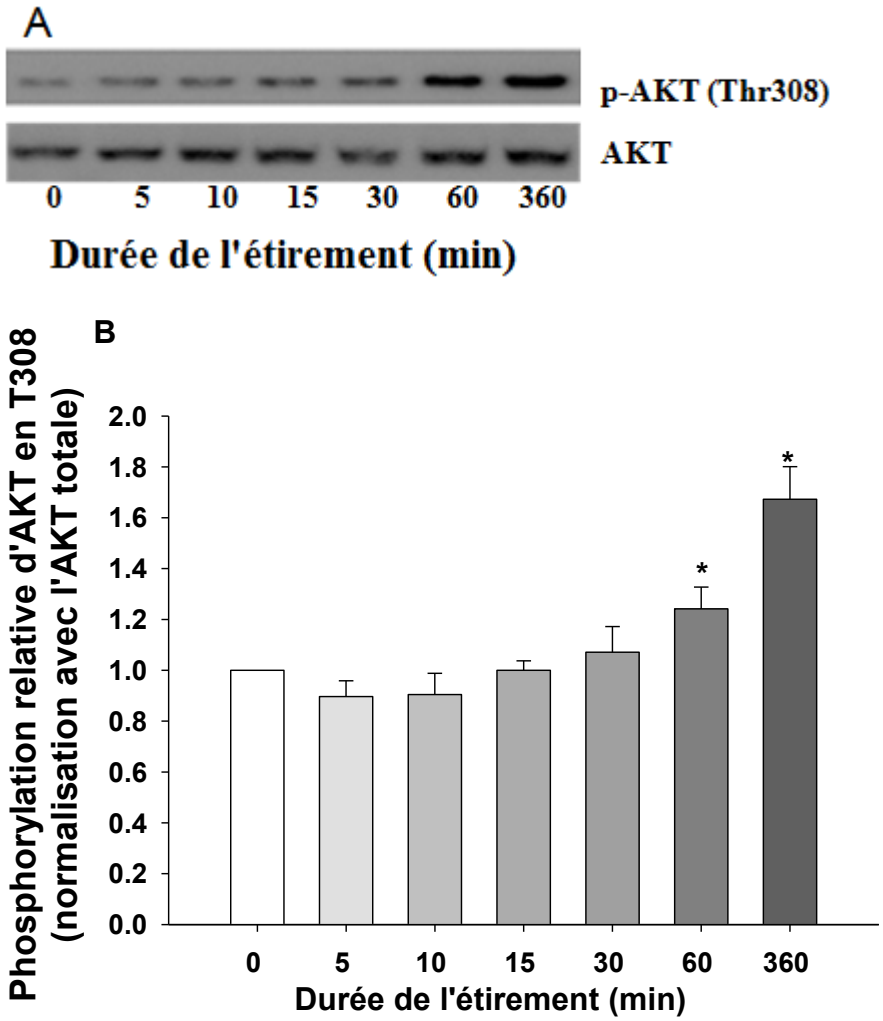


Figure 72 : Effet de l'étirement cyclique sur la phosphorylation d'AKT en Thr 308.

Les cellules sont soumises à un étirement de 5 min à 360 min. La phosphorylation d'AKT est calculée par rapport à l'expression d'AKT totale. A) Résultat de blot ; B) Quantification. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *p≤0.05 par rapport aux contrôles sans l'étirement.

Les résultats montrent une augmentation progressive de la phosphorylation d'AKT en T308 induite par l'étirement cyclique qui devient significative à 60 min et 360min (24 à 67%) **(Figure 72).**

3.4. Clivage de la taline

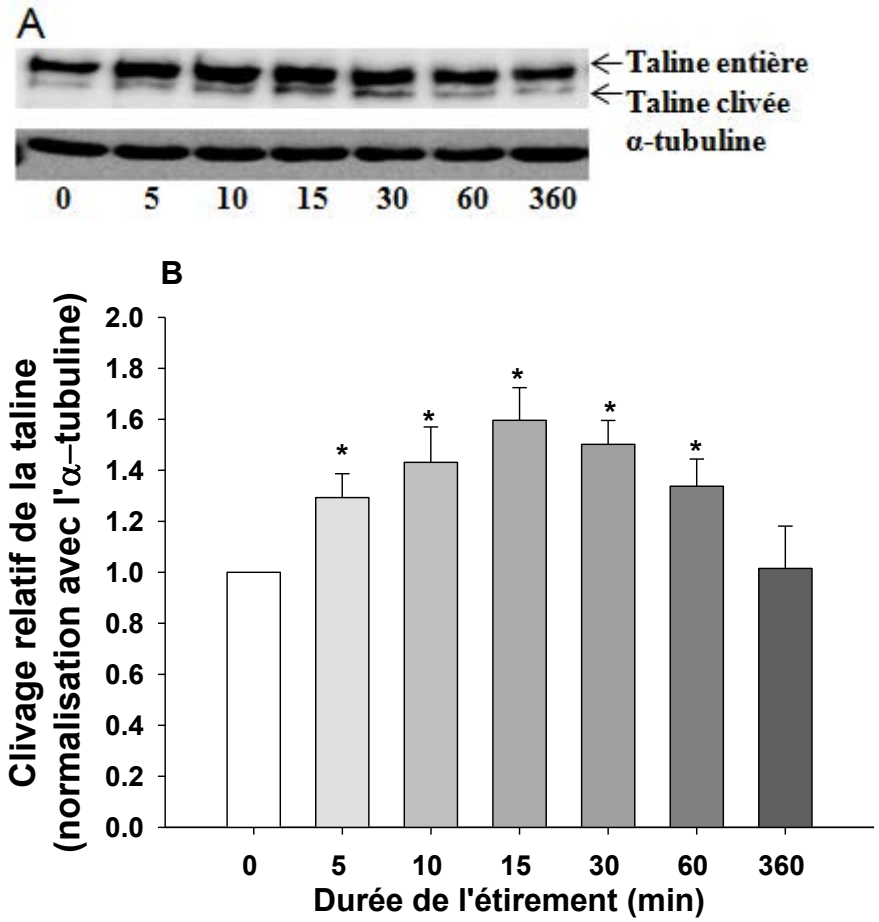


Figure 73 : Effet de l'étirement cyclique sur le clivage de la taline.

Les cellules sont soumises à un étirement de 5 à 360 min. Le clivage de la taline est calculé comme étant la taline clivée par rapport à la taline totale et normalisée par l'expression de l'α-tubuline. A) Résultat de blot ; B) Quantification. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *p≤0.05 par rapport aux contrôles sans l'étirement.

Les résultats montrent une augmentation significative du clivage de la taline induite par l'étirement cyclique à partir de 5 min de 29% jusqu'à 60 min de 34%, avec un pic de 60% à 15 min puis une diminution jusqu'aux valeurs de base à 360min (Figure 73).

3.5. Phosphorylation d'ILK

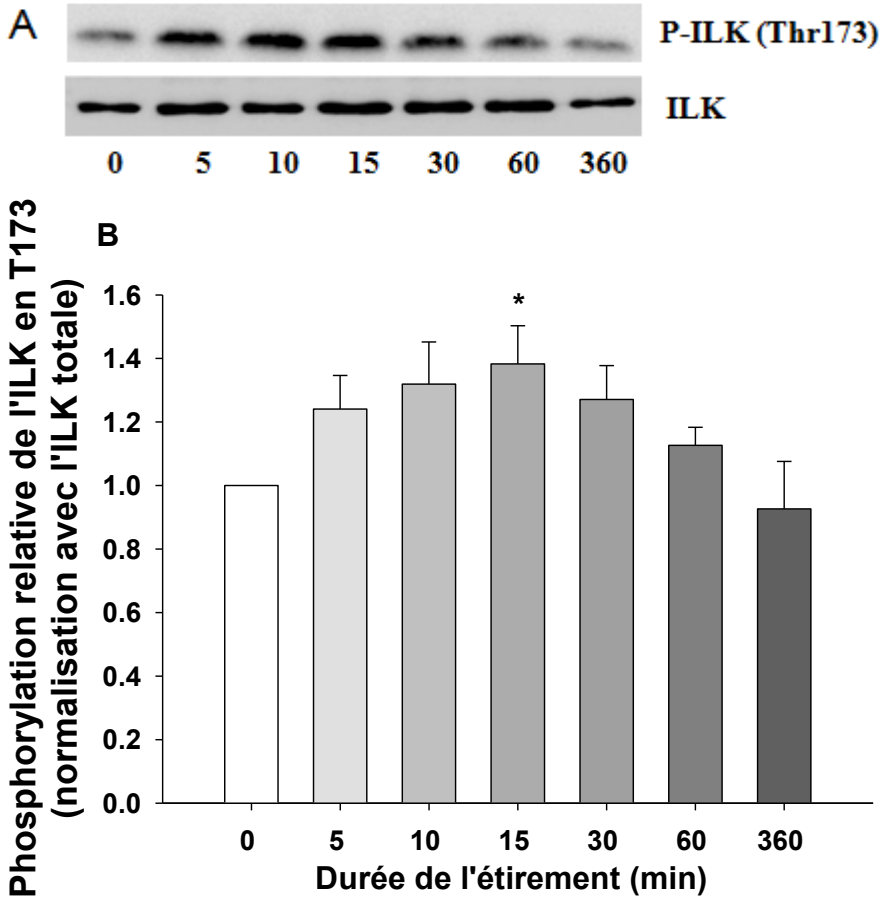


Figure 74 : Effet de l'étirement cyclique sur la phosphorylation de l'ILK en Thr 173.

Les cellules sont soumises à un étirement de 5 min à 360 min. La phosphorylation d'ILK est calculée par rapport à l'expression d'ILK totale. A) Résultat de blot ; B) Quantification. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *p≤0.05 par rapport aux contrôles sans l'étirement.

Les résultats montrent qu'il y a une augmentation progressive de la phosphorylation de ILK en T173 induite par l'étirement cyclique qui est significative à 15 min (38%) puis diminue jusqu'aux valeurs de base à 360 min (Figure 74).

En résumé, en réponse à l'étirement cyclique nous avons mis en évidence qu'il y a une augmentation significative i) de la phosphorylation de Src en Y418 à 15 et 360 min ; ii) de la phosphorylation de FAK en Y576/577 entre 10 et 360 min ; iii) de la phosphorylation de AKT en T308 de 60 à 360 min ; iv) du clivage de taline de 5 à 60 min ; et v) de la phosphorylation de ILK à 15 min.

4. Effet des contraintes mécaniques cycliques sur la génération de thrombine par les CML

Afin d'étudier l'effet des contraintes mécaniques cycliques sur la génération de thrombine par les CML, nous avons mesuré trois paramètres i) l'adhésion à la prothrombine ; ii) l'activité des phospholipides procoagulants (PPA); iii) le potentiel thrombinique (ETP).

4.1. Adhésion des CML de rat à la prothrombine

La génération de thrombine nécessite l'adhésion des CML à la prothrombine afin d'être activée par le complexe de la prothrombinase.

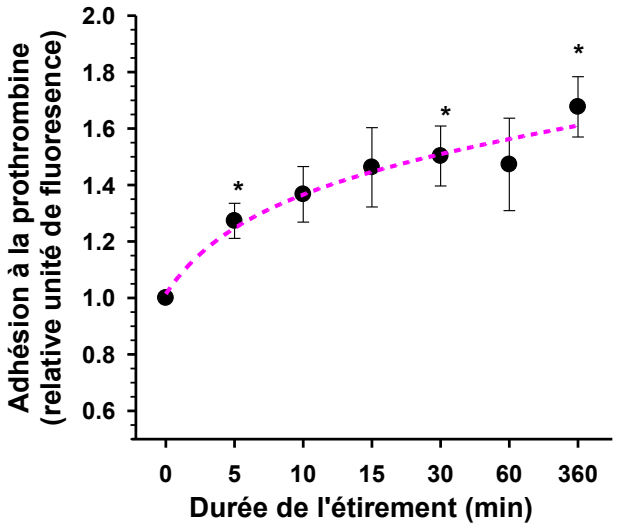


Figure 75 : Effet de l'étirement sur l'adhésion des CML de rat à la prothrombine.
Les cellules sont soumises à un étirement (10%, 1Hz) de 5 à 360 min. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM d'au moins trois expériences indépendantes. *P≤0.05 par rapport à leur control (0 min).

Les résultats montrent une augmentation significative de l'adhésion des CML à la prothrombine après 5 min de stretch (27%) et un effet maximum à 360 min de 68% (Figure 75).

4.2. Activité procoagulante des phospholipides membranaires

L'activation protéolytique de la prothrombine a lieu aux surfaces des CML où l'activité procoagulante des phospholipides nécessite laformation d'un complexe prothrombinase qui inclut les facteurs de coagulation FXa, FVa et de calcium. Nous avons ainsi étudié l'effet de

l'étirement cyclique sur l'exposition des phospholipides anioniques aux surfaces des CML via la mesure d'activité procoagulante des phospholipides (PPA).

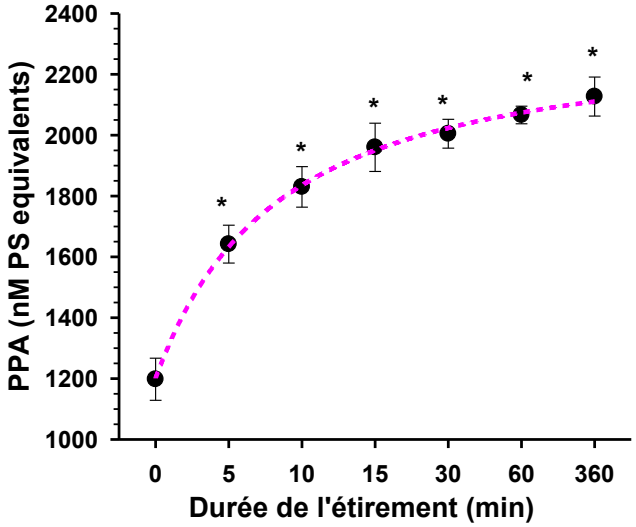


Figure 76 : Effet de l'étirement cyclique sur le PPA.

Les CML de rat sont soumises à un étirement (10%, 1Hz) de 5 à 360 min. Les résultats sont exprimés en valeurs de moyenne±SEM (nM d'équivalents PhtdSer) d'au moins trois expériences indépendantes. *P≤0.05 par rapport à leur control (0 min).

Les résultats montrent une augmentation significative de PPA à partir de 5 min jusqu'à 360 min de 444 à 929 nM avec un effet maximum à 360 min (Figure 76).

4.3. Potentiel thrombinique

Puisque l'étirement cyclique induit l'adhésion des CML à la prothrombine et l'augmentation du PPA, nous avons donc déterminé le changement de la génération de thrombine par la méthode de thrombinographie.

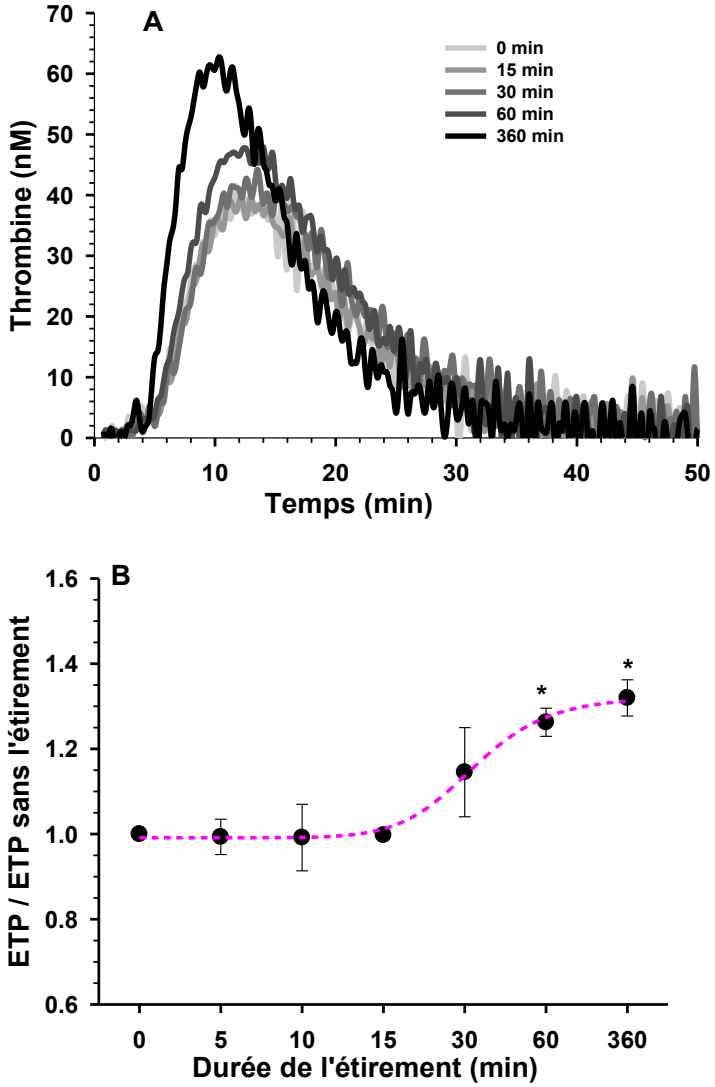


Figure 77 : Effet de l'étirement cyclique sur l'ETP : (A) Thrombinogrammes ; (B) ETP.

Les cellules sont soumises à un étirement (10%, 1Hz) de 5 à 360 min. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM d'au moins trois expériences indépendantes. *P≤0.05 par rapport à leur control (0 min).

Les résultats montrent que la génération de thrombine est augmentée significativement à 60 min (26%) et à 360 min (32%) en réponse à l'étirement cyclique avec un effet maximum à 360 min (Figure 77)

En résumé, nous avons mis en évidence pour la première fois que l'étirement cyclique augmente significativement i) l'adhésion des CML à la prothrombine ; ii) l'exposition des phospholipides anioniques aux surfaces des CML ; et iii) la capacité des CML à supporter la génération de la thrombine.

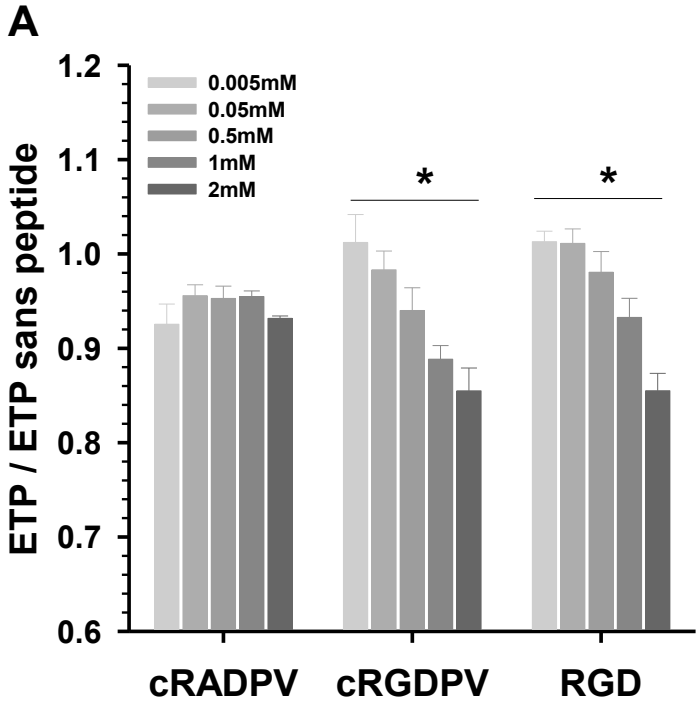
5. Implication de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans la génération de thrombine par les CML

Afin de démontrer l'implication de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans la génération de thrombine par les CML, nous avons inhibé les effets de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ soit par des peptides mimétiques (RGD, cRGDPV), soit par un siRNA dirigé contre la sous-unité α_v de l'intégrine. Nous avons utilisé comme control un peptide cRADPV, un siRNA non spécifique universel et un siRNA dirigé contre la sous-unité α_5 des intégrines. Nous avons étudié i) l'adhésion des CML à la prothrombine ; ii) le PPA ; iii) l'ETP dans les CML stretchées ou non-stretchées.

5.1. Réponses des CML dans la condition statique

Nous avons dans un premier temps démontré l'implication de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans la génération de thrombine.

5.1.1. Peptides



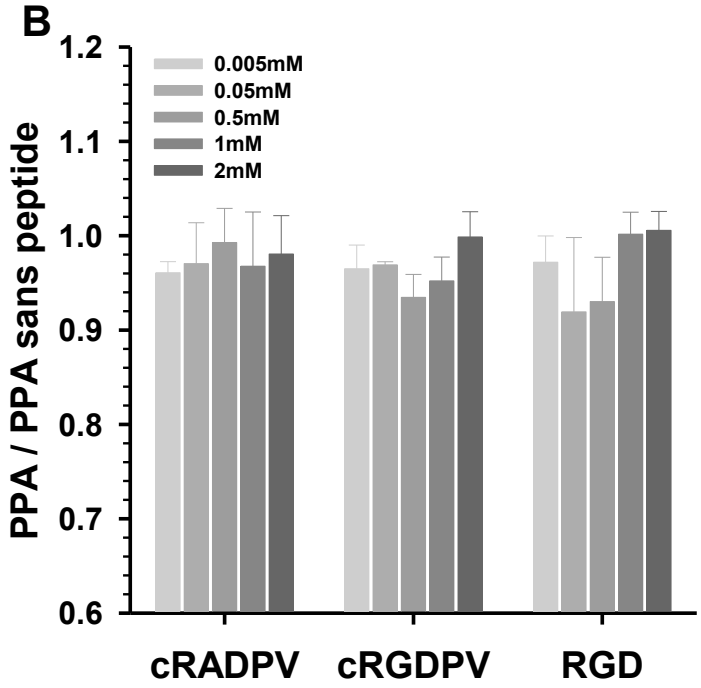


Figure 78 : Effets des peptides RGD et cRGDPV sur la génération de thrombine par les CML. A) ETP ; B) PPA. Chaque mesure a été normalisée par les témoins « sans peptides ». Les valeurs représent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *$p \leq 0.05$ par rapport au groupe cRADPV. cRADPV: peptide contrôle ; cRGDPV: peptide mimétique d'$\alpha_v\beta_3$; RGD : peptide linéaire ; ETP : le potentiel thrombinique.

Nous avons montré un effet concentration dépendant des peptides RGD cyclique et linéaires sur la capacité des CML à supporter la génération de thrombine Figure 78A. En revanche ces peptides n'ont aucun effet sur l'activité procoagulante des phospholipides Figure 78 B. Le résultat de la Figure 78A montre que, en fonction de la concentration de 0.005 à 2 mM, i) le peptide contrôle cRADPV n'a aucun effet sur l'ETP ; ii) le peptide mimétique cRGDPV inhibe l'ETP de façon concentration dépendante avec un effet maximum de 15% à 2mM ; iii) le peptide RGD linéaire inhibe aussi l'ETP de façon concentration dépendante avec un effet maximum de 14% à 2mM.

Le résultat de la Figure 78B montre que, quelque soit le peptide et la dose, il n'y pas d'effet significatif sur PPA.

5.1.2. siARN d'αv

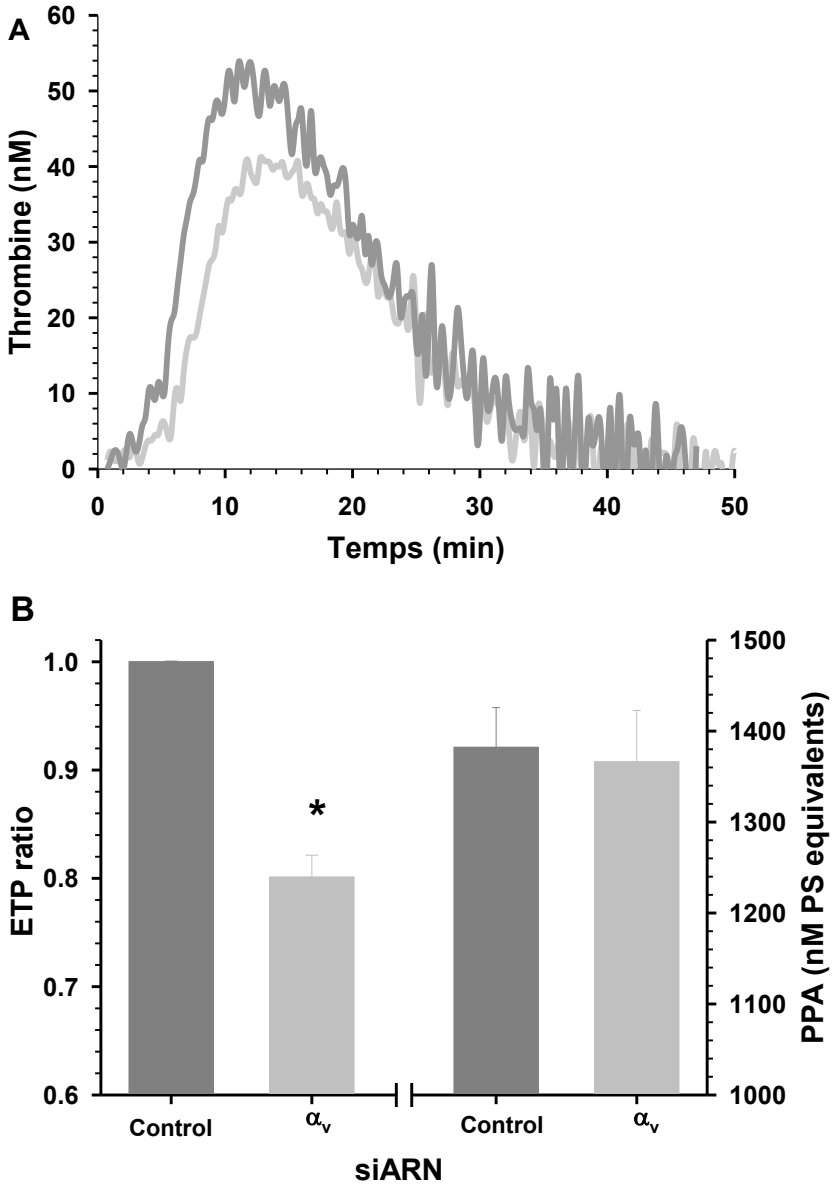


Figure 79 : Effets de siARN ciblé d'α_v sur la génération de thrombine par les CML

(A) Thrombinogrammes; (B) ETP et PPA en présence de siARN contrôle (gris foncé) et de siARN α_v (gris claire). Les valeurs représent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *p≤0.05 par rapport à leur contrôle. ETP : le potentiel thrombotique ; PPA : l'activité procoagulante des phospholipides

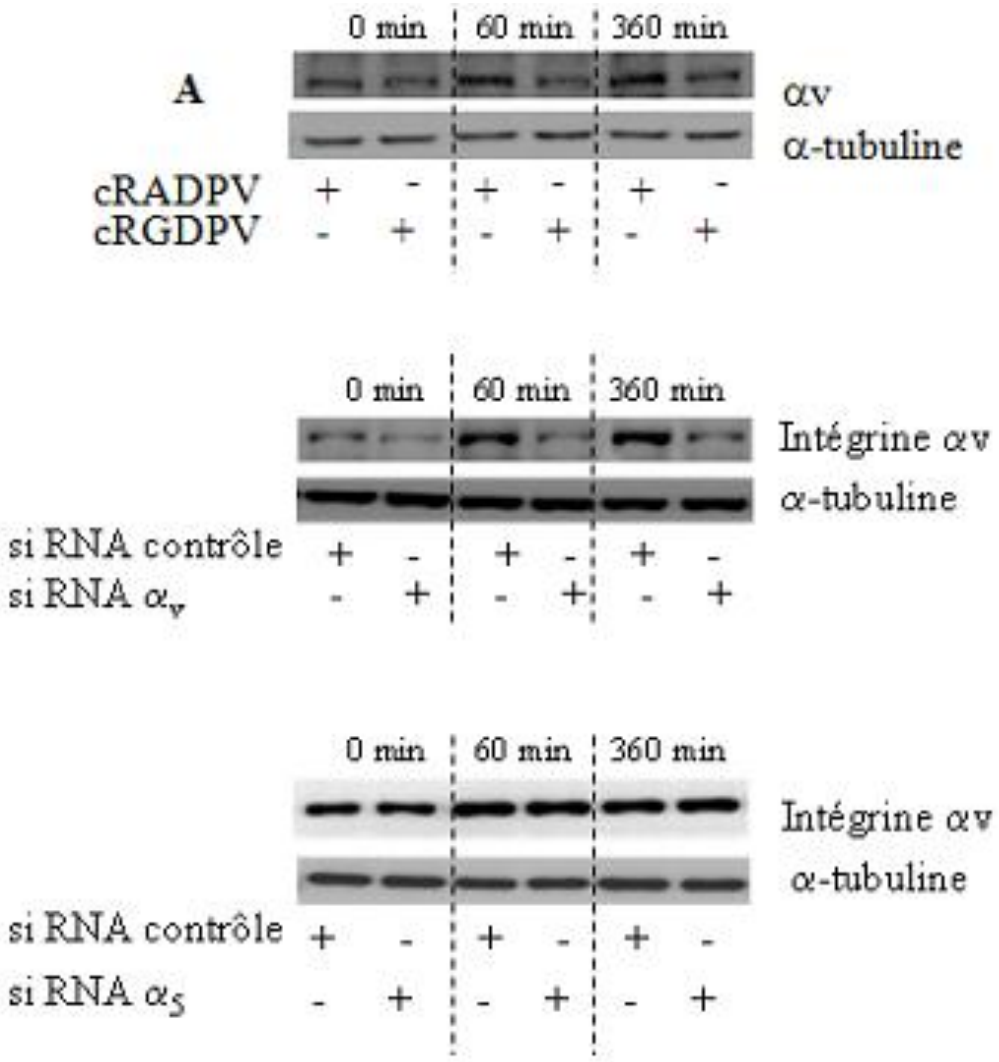
Le siARN α_v inhibe l'expression des intégrines α_v et la génération de thrombine à la surface des CML de 20% par rapport à celle de siARN contrôle. Il n'a pas d'effet significatif sur le PPA (Figure 79).

5.2. Réponse des CML à l'étirement cyclique

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'implication de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans l'augmentation de la génération de thrombine en réponse aux contraintes mécaniques.

5.2.1. Expression d'α_v

Nous avons tout d'abord étudié l'expression protéique de la sous-unité α_v après incubation des cellules en présence du peptide cRGDPV, du siARN α_v et α_5.



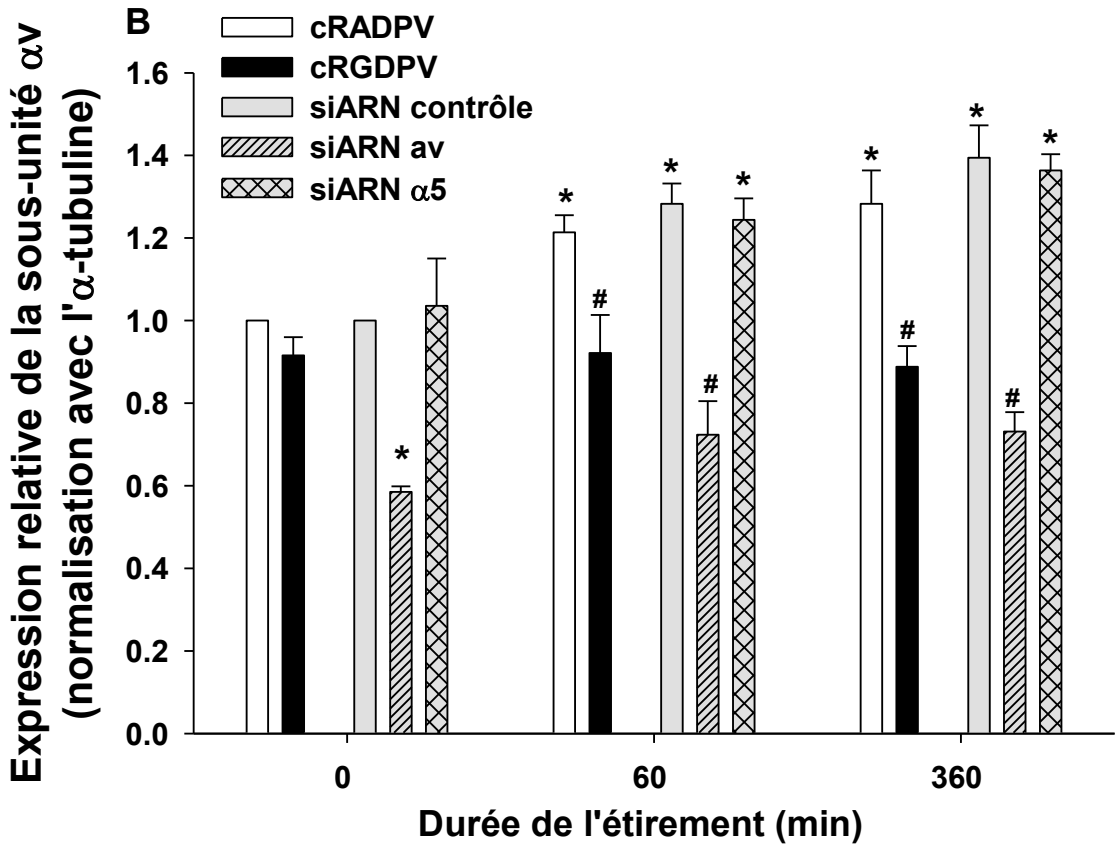


Figure 80 : Effet du peptide antagonist cRGDPV, du siARN α_v et α_5 sur l'expression de la sous-unité α_v en réponse à l'étirement cyclique.

L'expression relative des protéines est calculée par rapport à l'expression de l'α-tubuline. Les cellules sont soumises à l'étirement (10%, 1Hz) pendant 60 et 360 min. A) Résultat de blot ; B) Quantification. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *p≤0.05 par rapport au peptide contrôle (cRADPV) ou au siARN contrôle sans l'étirement; #p≤0.05 par rapport aux peptides contrôles ou au siARN contrôle avec l'étirement.

Le résultat montre une augmentation significative de la sous-unité α_v induite par l'étirement cyclique à partir de 60 min (28%) jusqu'à 360 min (39%). Le pepide antagonist cRGDPV est capable de bloquer significativement cette augmentation de 60 min (29%) à 360 min (39%) par rapport aux peptides contrôles cRADPV avec l'étirement. Le siARN α_v inhibe significativement l'expression d'α_v sans l'étirement (41%) et avec l'étirement cyclique de 60 min (41%) à 360 min (66%) par rapport au siARN contrôle. Le siARN α_5 n'a pas d'effet significatif sur l'expression d'α_v au repos et après l'étirement (Figure 80).

5.2.2. Adhésion

Nous avons déjà montré qu'il y a une augmentation de l'adhésion des CML à la prothrombine induite par l'étirement cyclique à partir de 5 min avec un effet maximum à 360 min. Ici, nous avons choisi 360 min pour étudier l'implication de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

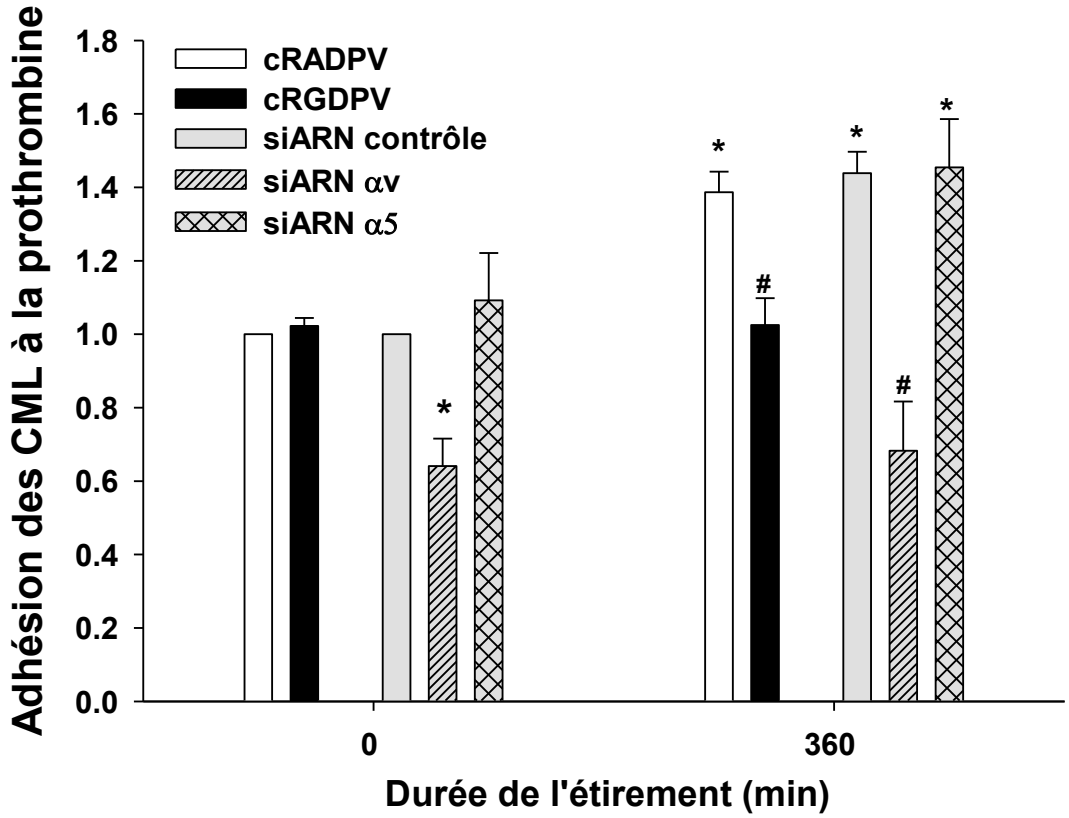


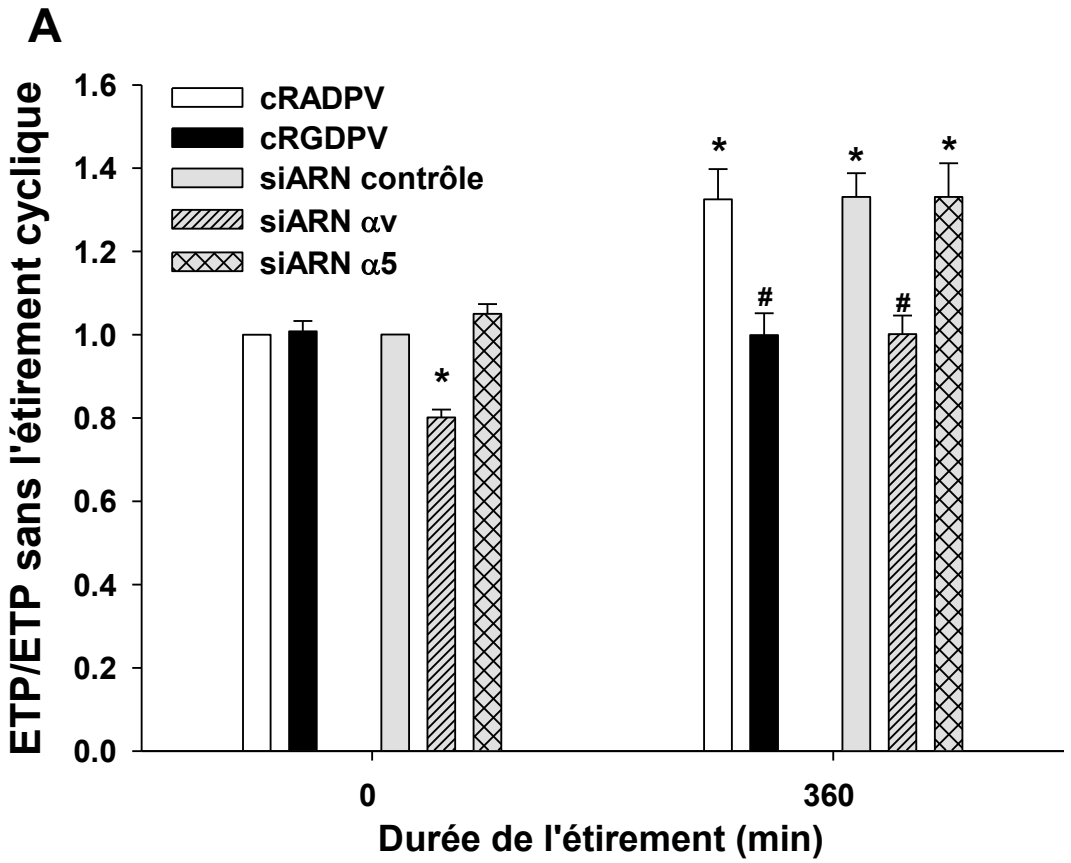
Figure 81 : Effet du peptide antagonist cRGDPV, du siARN α_v et α_5 sur l'adhésion des CML à la prothrombine en réponse à l'étirement cyclique.

Les cellules sont soumises à l'étirement cyclique (10%, 1Hz) pendant 360 min. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *$p \leq 0.05$ par rapport au peptide contrôle (cRADPV) ou au siARN contrôle sans l'étirement; #$p \leq 0.05$ par rapport aux peptides contrôles ou au siARN contrôle avec l'étirement.

En présence du peptide control (cRADPV) nous avons une augmentation significative de l'adhésion des CML à la prothrombine à 360 min d'étirement cyclique de 39%. Une augmentation similaire est obtenue en présence du siRNA control (44%) et du siRNA α_5 (39%). Cette augmentation est bloquée significativement par le peptide antagonist cRGDPV et par le siRNA a_v. Le siARN α_5 n'a pas d'effet significatif sur l'adhésion des CML à la prothrombine (Figure 81).

5.2.3. ETP

Nous avons précédement montré qu'il y a une augmentation de l'ETP par les CML induite par l'étirement cyclique à partir de 60 min avec l'effet maximum à 360 min. Ainsi, nous avons choisi 360 min pour étudier l'effet du peptide antagonist cRGDPV et du siARN α_v et α_5 sur l'ETP.



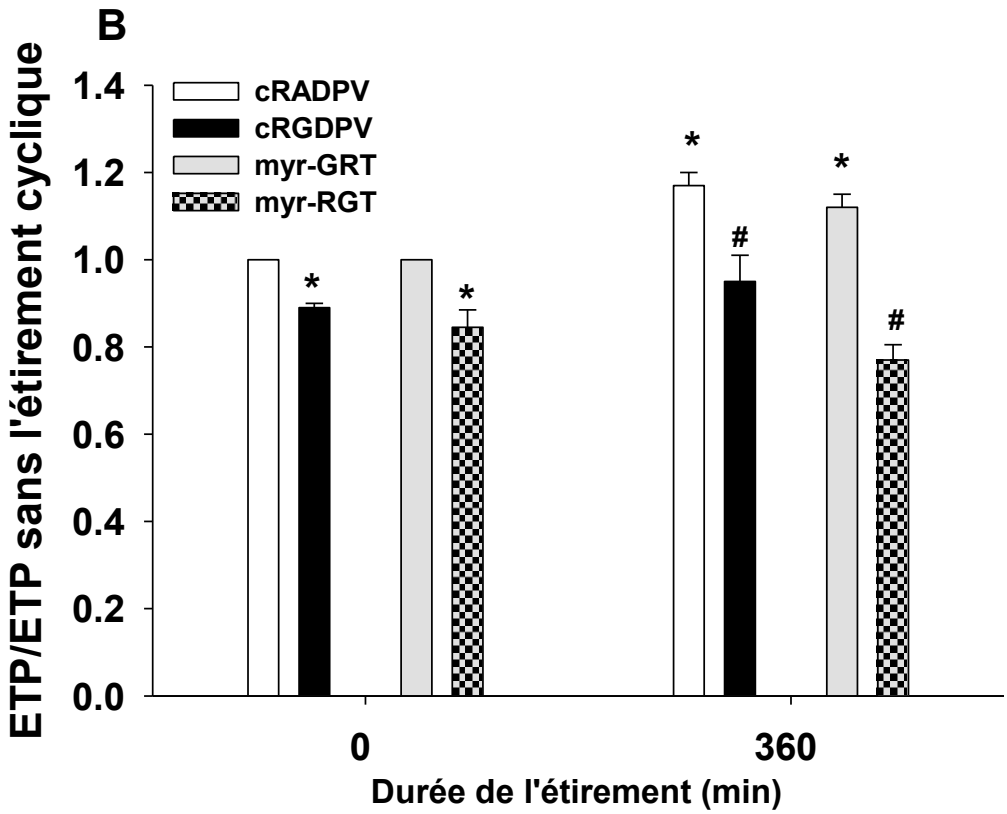


Figure 82 : Effet des différents peptides et siARN$_S$ sur l'ETP aux CML en réponse à l'étirement cyclique.

Les cellules sont soumises à l'étirement cyclique (10%, 1Hz) pendant 360 min. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. A) Effet du peptide antagonist cRGDPV à la concentration 0.5mM, du siARN α_v et α_5 ; B) Effet des peptides cRGDPV et myr-RGT à la concentration 1mM. *p≤0.05 par rapport au peptide contrôle (cRADPV ou myr-GRT) ou au siARN contrôle sans l'étirement; #p≤0.05 par rapport aux peptides contrôles ou au siARN contrôle avec l'étirement.

Le Figure 82 A montre qu'en présence du peptide control (cRADPV), du siRNA control et du siRNA α_5 nous avons une augmentation significative de l'ETP de 33% après 360 min de stretch. Cette augmentation est bloquée complètement et significativement par le peptide antagonist cRGDPV. Le siRNA αv inhibe l'ETP de 20% au niveau de base et de 33% à 360 min de l'étirement. Le siARN α_5 n'a pas d'effet significatif sur l'ETP.

Le Figure 82 B montre que l'augmentation de l'ETP à 360 min de l'étirement cyclique est bloqué significativement par le peptide cRGDPV et myr-RGT de 22% et 35% respectivement. A la concentration de 1mM, cet effet d'inhibition était aussi observé dans les CML sans l'étirement traitées par ces peptides par rapport aux peptides contrôles.

En résumé, nous avons montré :

i) l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est impliqué dans la capacité des CML à produire de la thrombine

ii) le potentiel thrombinique des CML est indépendant de l'activité procoagulante des phospholipides

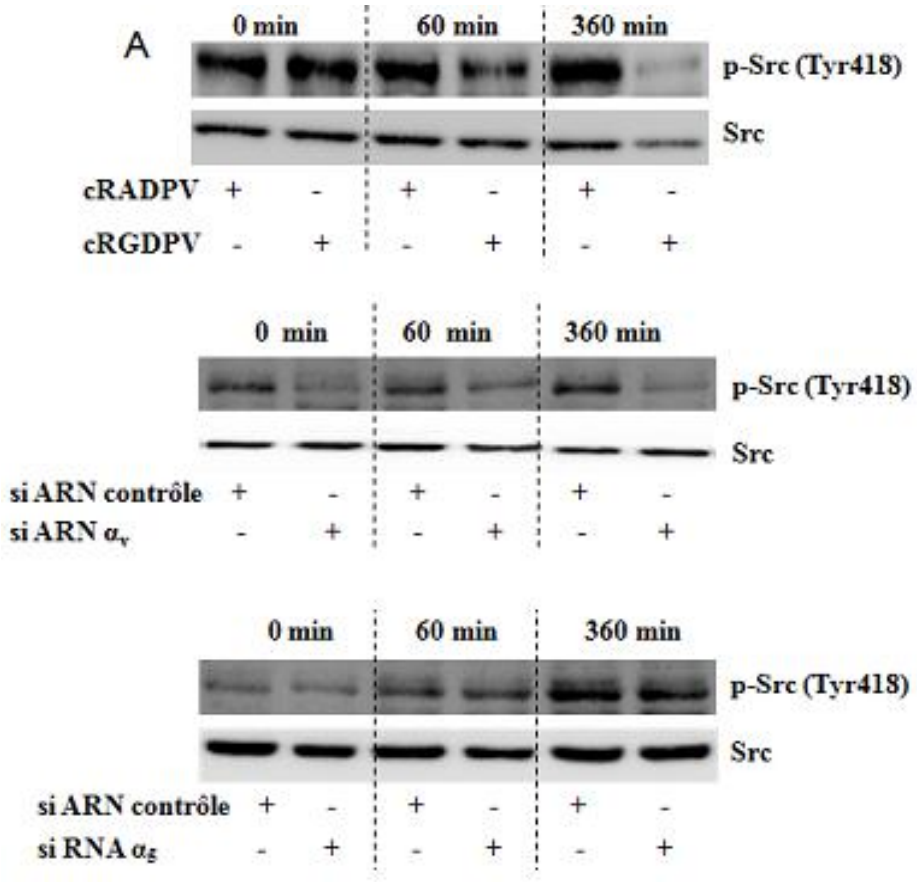
iii) l'augmentation du potentiel thrombinique des CML en réponse au stretch est également dépendant le l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

6. Voies de signalisation impliquées dans l'activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ en réponse aux contraintes mécaniques cycliques

6.1. Inhibition d'α_v

Nous avons regardé l'effet de l'inhibition d'$\alpha_v\beta_3$ soit par le peptide cyclique (cRGDPV) soit par le siARN α_v ou α_5, sur les voies de signalisation de l'intégrine.

6.1.1. Phosphorylation de Src



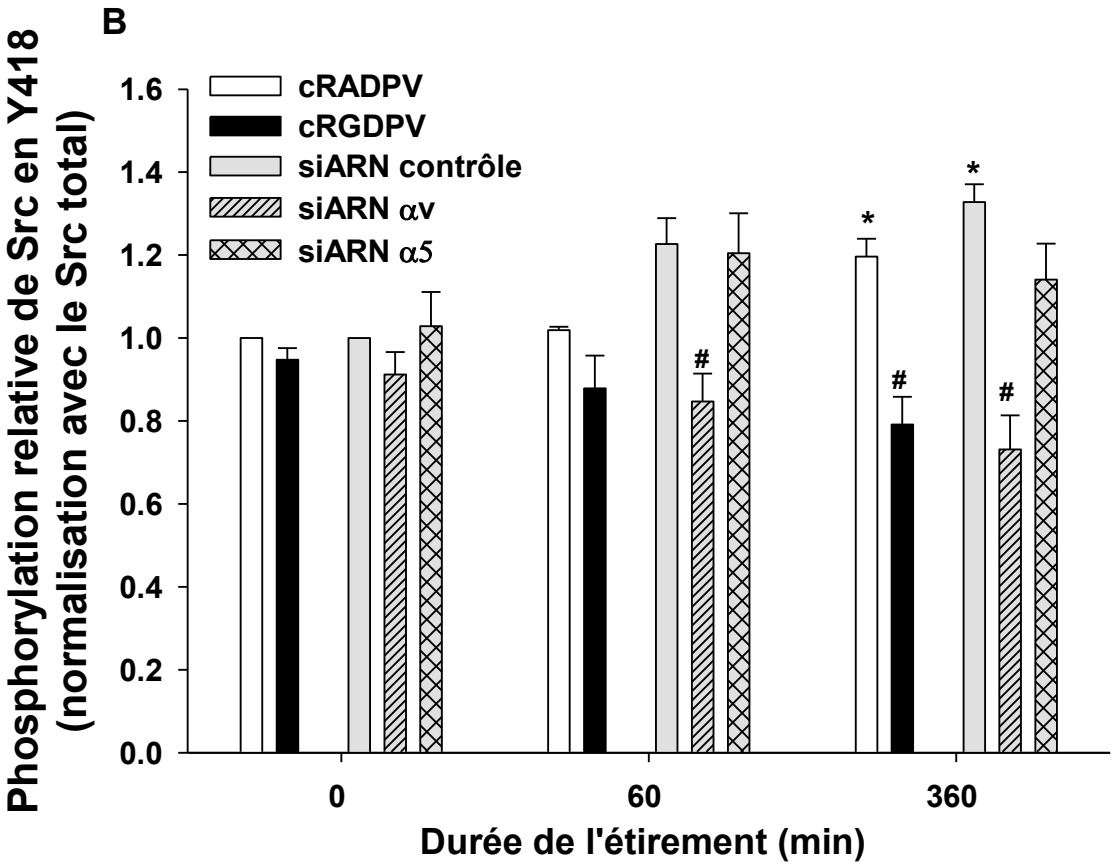


Figure 83 : Effet du peptide antagonist cRGDPV, du siARN α_v et α_5 sur la phosphorylation de Src en Y418.

Les cellules sont soumises à l'étirement cyclique pendant 60 et 360 min. La phosphorylation de Src est calculée par rapport à l'expression de Src totale. A) Résultat de blot ; B) Quantification. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *$p \leq 0.05$ par rapport au peptide contrôle (cRADPV) ou au siARN contrôle sans l'étirement; #$p \leq 0.05$ par rapport aux peptides contrôles ou au siARN contrôle avec l'étirement.

Comme démontré précédement après 360 min de stretch la phosphorylation de src est significativement augmentée (Figure 83). Cette augmentation est inhibée par le peptide antagonist cRGDPV de 41% à 360 min ainsi que par le siARN α_v, de 38% à 60 min et de 60% à 360 min respectivement. Il n'y a pas d'effet significatif du siARN α_5 sur cette augmentation de la phosphorylation de Src.

6.1.2. Phosphorylation de FAK

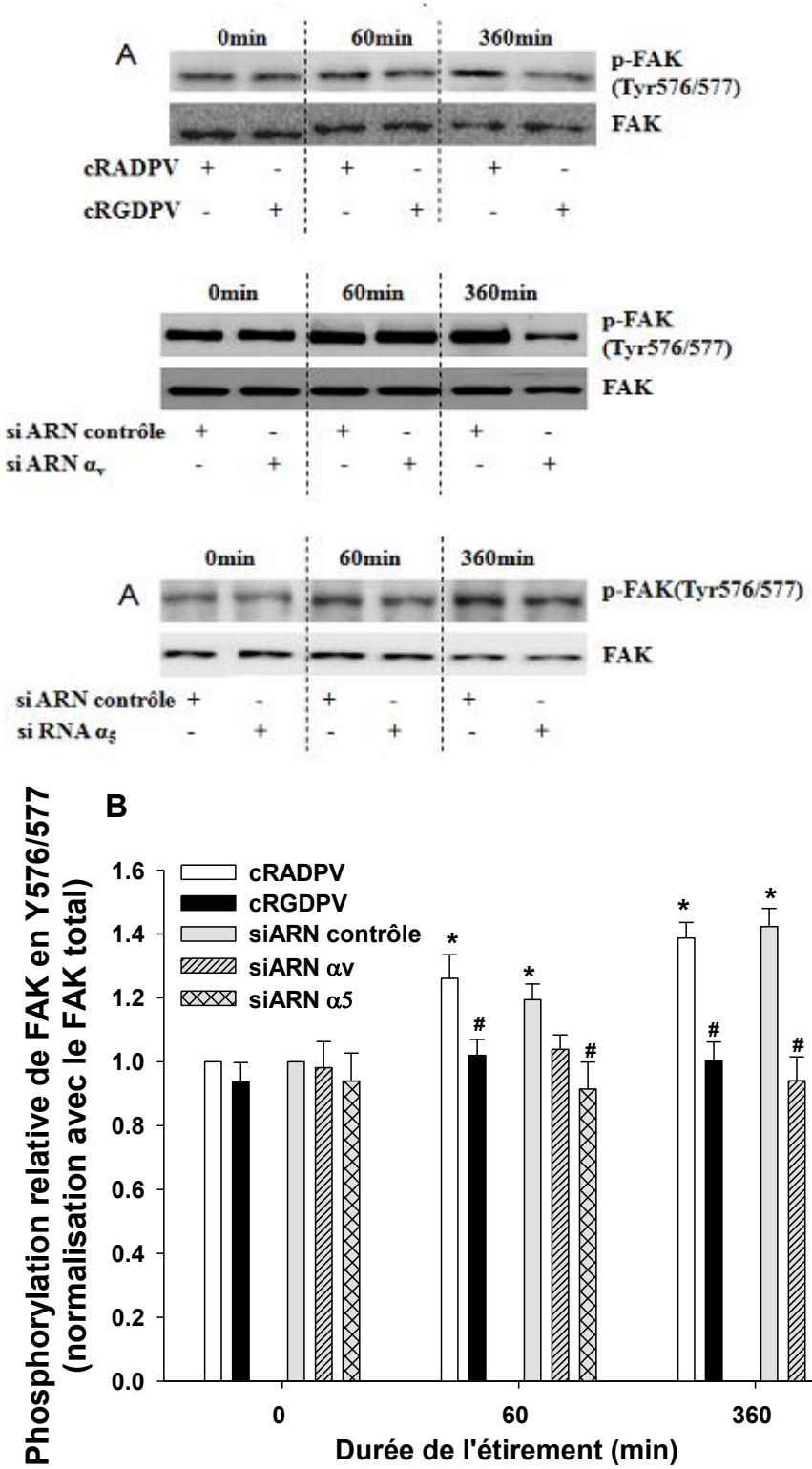


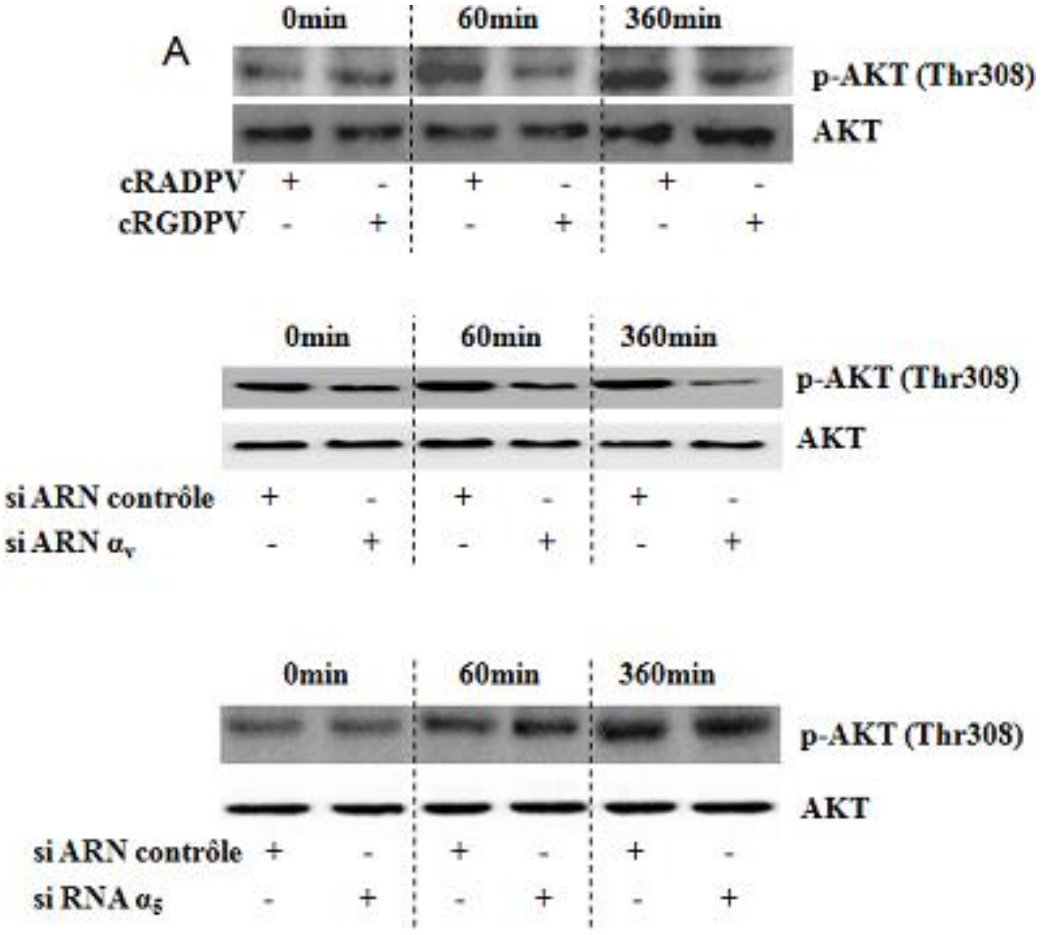
Figure 84 : Effet du peptide antagonist cRGDPV, du siARN α_v et α_5 sur la phosphorylation de FAK en Y576/577.

Les cellules sont soumises sous l'étirement cyclique pendant 60 et 360 min. La phosphorylation de FAK est calculée par rapport à l'expression de FAK totale. A) Résultat de blot ; B) Quantification. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes.

*p≤0.05 par rapport au peptide contrôle (cRADPV) ou au siARN contrôle sans l'étirement; #p≤0.05 par rapport aux peptides contrôles ou au siARN contrôle avec l'étirement.

Comme démontré précédement après 60 et 360 min d'étirement cyclique, la phosphorylation de FAK est significativement augmentée (Figure 84). Cette augmentation est inhibée par le peptide antagonist cRGDPV de 26% à 60 min et de 39% à 360 min respectivement. La phosphorylation de FAK est inhibée par le siARN α_v de 49% à 360 min de l'étirement. Cette augmentation est inhibée par le siARN α_5 de 28% à 60 min et de 52% à 360 min.

6.1.3. Phosphorylation d'AKT



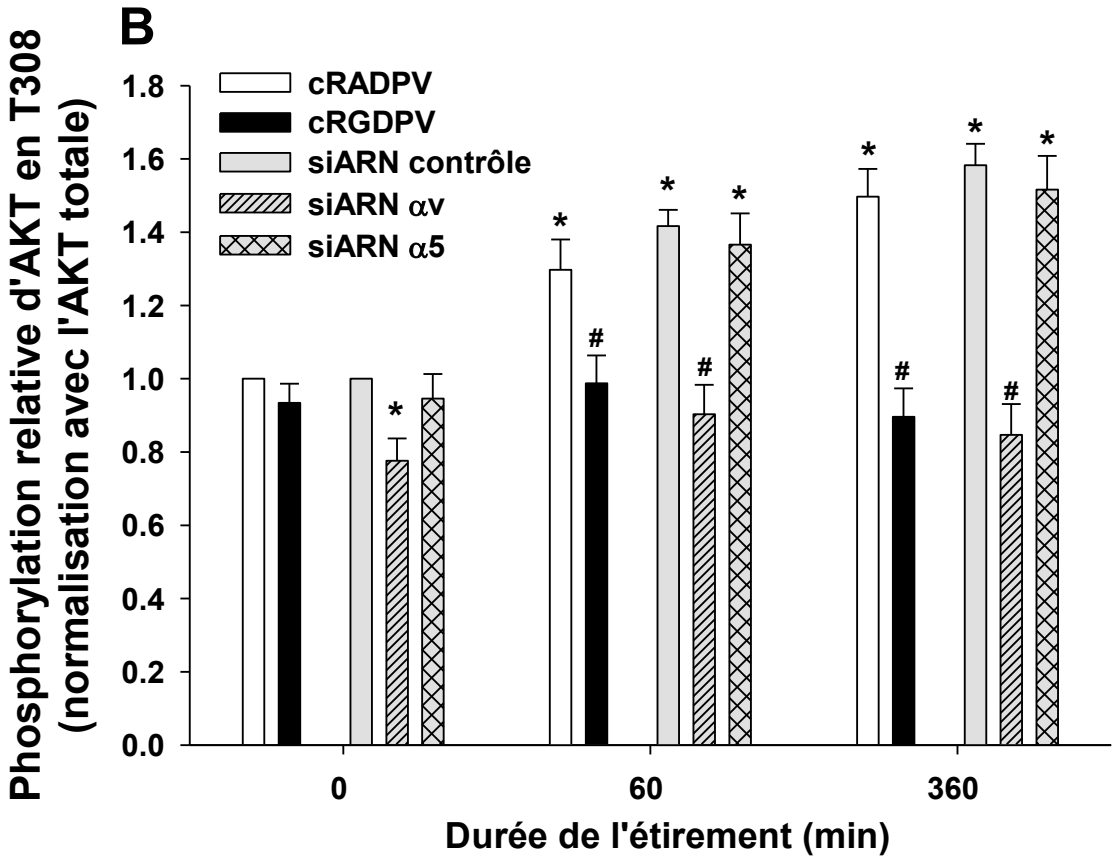


Figure 85 : Effet du peptide antagonist cRGDPV, du siARN α_v et α_5 sur la phosphorylation d'AKT en Thr308.

Les cellules sont soumises à l'étirement cyclique pendant 60 et 360 min. La phosphorylation d'AKT est calculée par rapport à l'expression d'AKT totale. A) Résultat de blot ; B) Quantification. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *p≤0.05 par rapport au peptide contrôle (cRADPV) ou au siARN contrôle sans l'étirement; #p≤0.05 par rapport aux peptides contrôles ou au siARN contrôle avec l'étirement.

Comme démontré précédement après 60 et 360 min d'étirement cyclique, la phosphorylation d'AKT en T308 est significativement augmentée (Figure 85). Cette augmentation est inhibée par le peptide antagonist cRGDPV par rapport au peptide contrôle cRADPV de 30% à 60 min et de 50% à 360 min respectivement. La phosphorylation d'AKT est inhibée par le siARN α_v par rapport au siARN contrôle de 32% à 0 min, de 51% à 60 min et de 75% à 360 min respectivement. Pendant cette période, il n'y aucun effet significatif de siARN α_5 sur la phosphorylation de l'AKT.

6.1.4. Clivage de la Taline

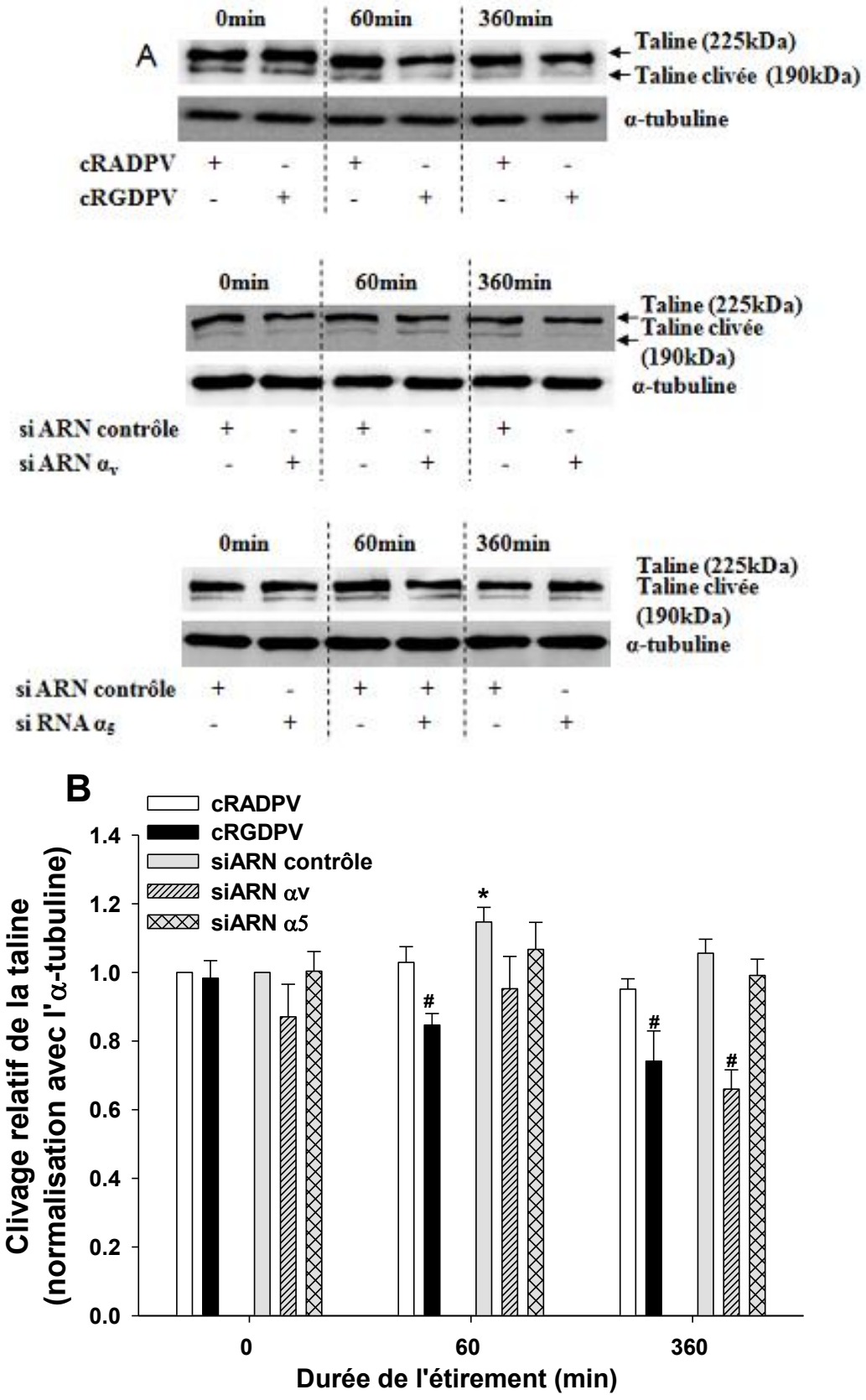
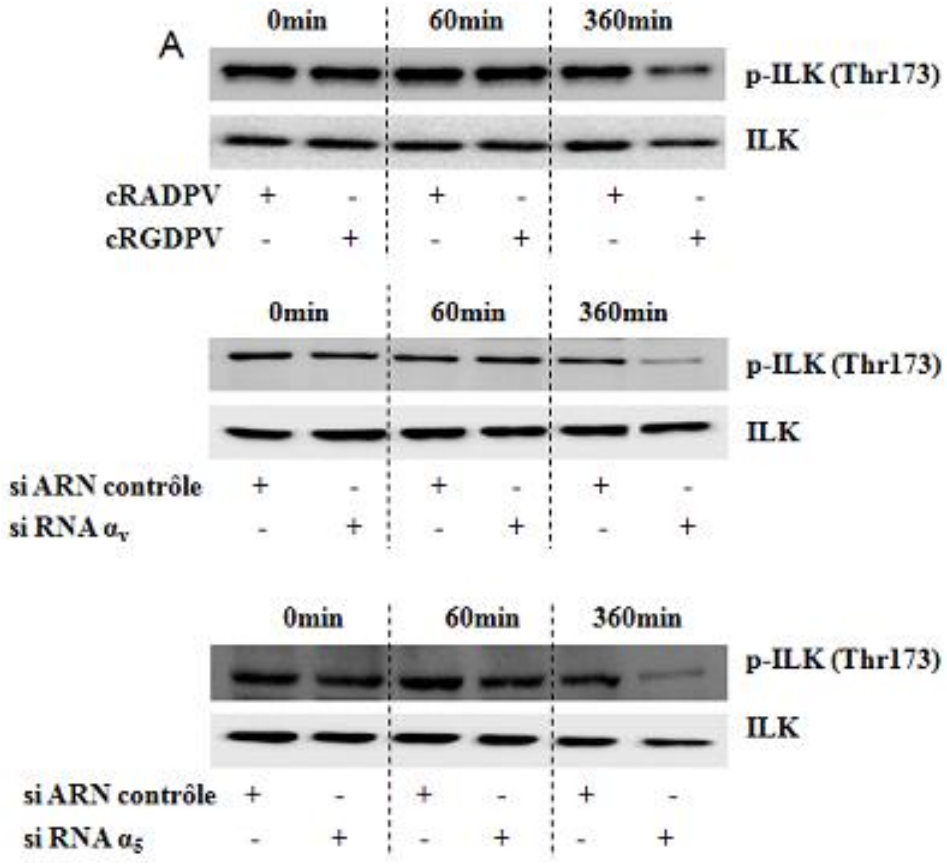


Figure 86 : Effet du peptide antagonist cRGDPV, du siARN α_v et α_5 sur le clivage de la taline.

Les cellules sont soumises à l'étirement cyclique pendant 60 et 360 min. Le clivage de la taline est calculé comme la taline clivée par rapport à la taline totale (la taline clivée plus la taline entière) et normalisée par l'expression de l'α-tubuline. A) Résultat de blot ; B) Quantification. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *p≤0.05 par rapport au peptide contrôle (cRADPV) ou au siARN contrôle sans l'étirement; #p≤0.05 par rapport aux peptides contrôles ou au siARN contrôle avec l'étirement.

Comme démontré précédement il y a une augmentation significative du clivage de taline induite par 60 min d'étirement cyclique (Figure 86). Cette augmentation est inhibée par le peptide antagonist cRGDPV par rapport au peptide contrôle cRADPV de 25% à 60 min et de 21% à 360 min respectivement. Le résultat montre une inhibition significative du clivage de la taline par le siARN α_v de 49.5% par rapport au siARN contrôle à 360 min. Le siARN α_5 n'a pas d'effet significatif sur ce clivage.

6.1.5. Phosphorylation d'ILK



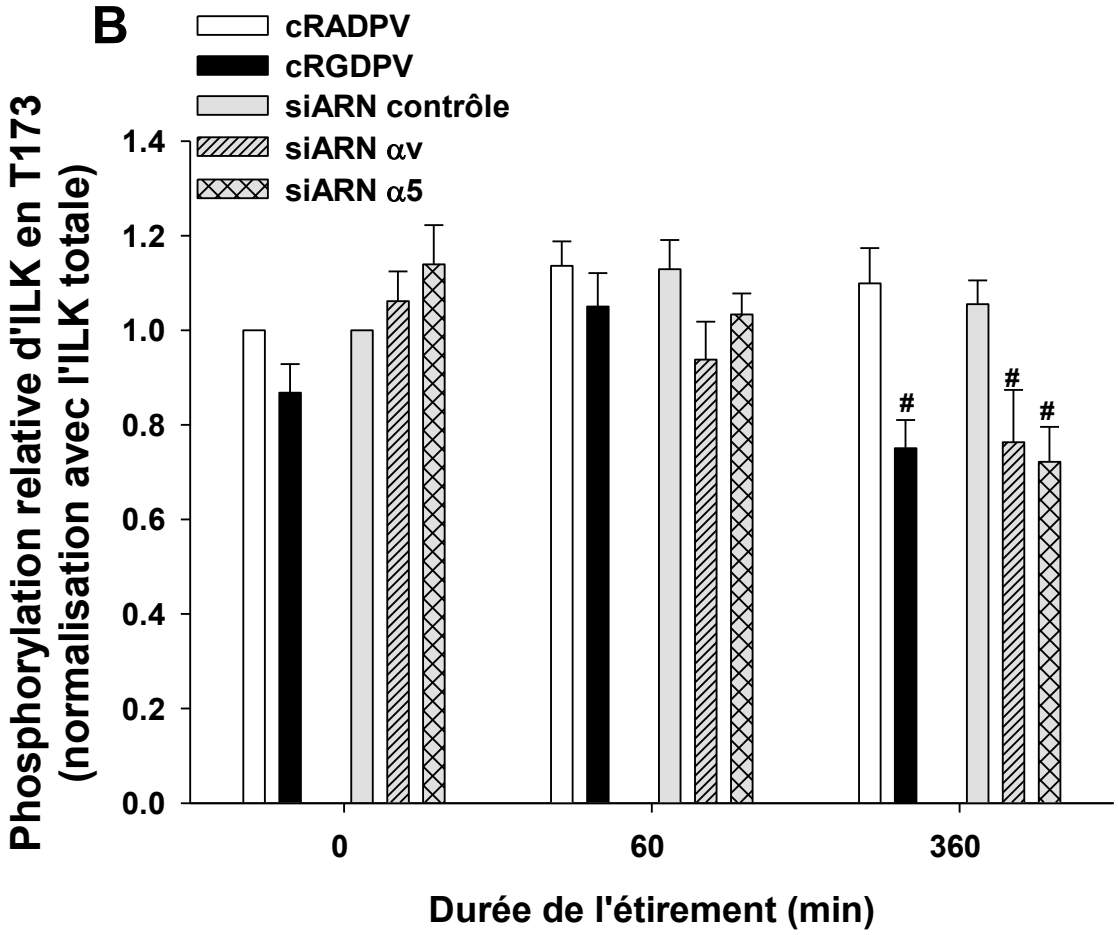


Figure 87 : Effet du peptide antagonist cRGDPV, du siARN α_v et α_5 sur la phosphorylation d'ILK en Thr173.

Les cellules sont soumises à l'étirement cyclique pendant 60 et 360 min. La phosphorylation d'ILK est calculée par rapport à l'expression d'ILK totale. A) Résultat de blot ; B) Quantification. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. #p≤0.05 par rapport aux peptides contrôles ou au siARN contrôle avec l'étirement.

Le résultat montre une inhibition significative de la phosphorylation d'ILK par le peptide antagonist cRGDPV et le siRNA α_v et α_5. Par rapport au peptide contrôle cRADPV, cette inhibition est de 35% à 360 min de l'étirement (Figure 87). Cette inhibition est de 22% à 360 min de l'étirement cyclique respectivement avec le siRNA α_v comparé au siRNA control. La phosphorylation d'ILK est inhibée par le si ARN α_5 de 33% par rapport au siARN contrôle à 360 min.

6.2. Effets du siARN ILK

Nous avons étudié l'effet du siARN ILK sur l'expression de l'ILK et de l'αv ainsi que sur la signalisation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ induite par l'étirement cyclique.

6.2.1. Expression de l'αv

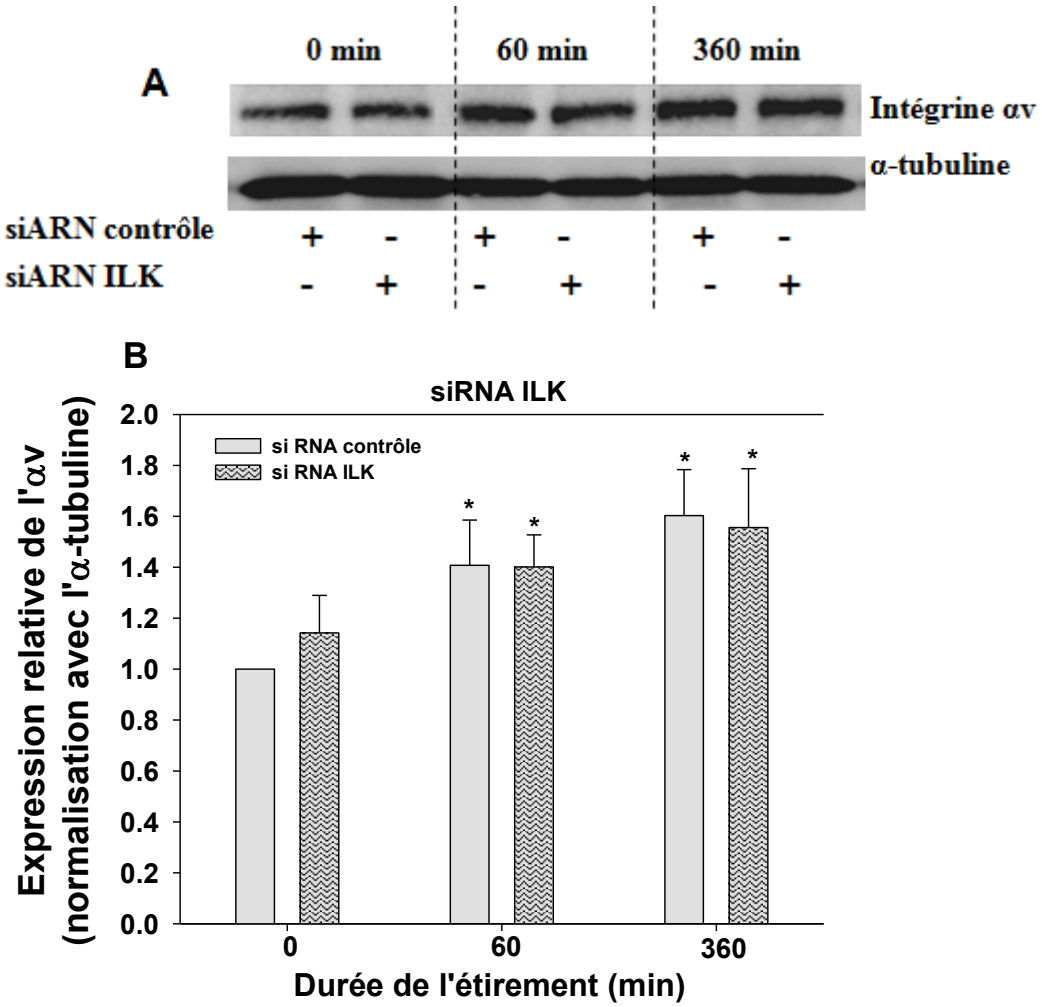


Figure 88 : Effet de siARN ILK sur l'expression de l'αv.

Les cellules sont soumises à l'étirement cyclique pendant 60 et 360 min. L'expression relative de l'αv est normalisée avec l'α-tubuline. A) Résultat de blot ; B) Quantification. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *p≤0.05 par rapport au siARN contrôle à 0 min.

Le résultat montre une augmentation significative de l'expression de l'α_v après 60 et 360 min d'étirement cyclique. Cette augmentation est de 41 et 60% avec l'effet maximum à 360 min. Le siARN ILK n'inhibe pas cette augmentation de l'α_v induite par l'étirement cyclique (Figure 88).

6.2.2. Signalisation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

En utilisant le siARN ILK, nous avons ensuite étudié la phosphorylation de Src (p-Y418), de Fak (p-Y576/577), d'Akt (p-T308) et d'ILK (p-T173) ainsi que le clivage de taline en réponse à l'étirement cyclique.

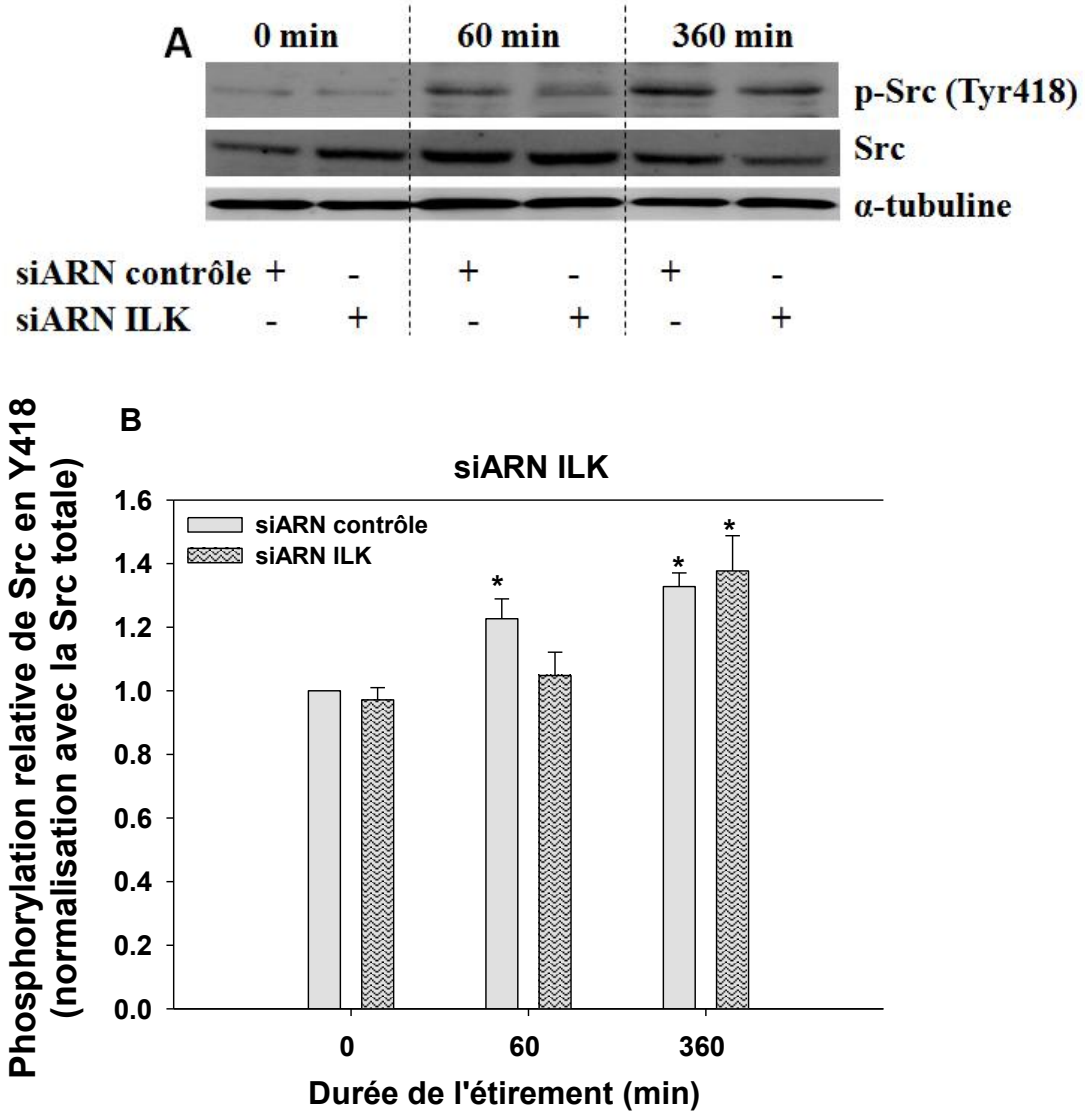


Figure 89 : Effet de siARN ILK sur la phosphorylation de Src en Y418.

Les cellules sont soumises à l'étirement cyclique pendant 60 et 360 min. La phosphorylation de la Src est calculée par rapport à la Src totale. A) Résultat de blot ; B) Quantification. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *p≤0.05 par rapport au siARN contrôle à 0 min.

Le siARN ILK n'a pas effet significatif sur la phosphorylation de Src (Figure 89).

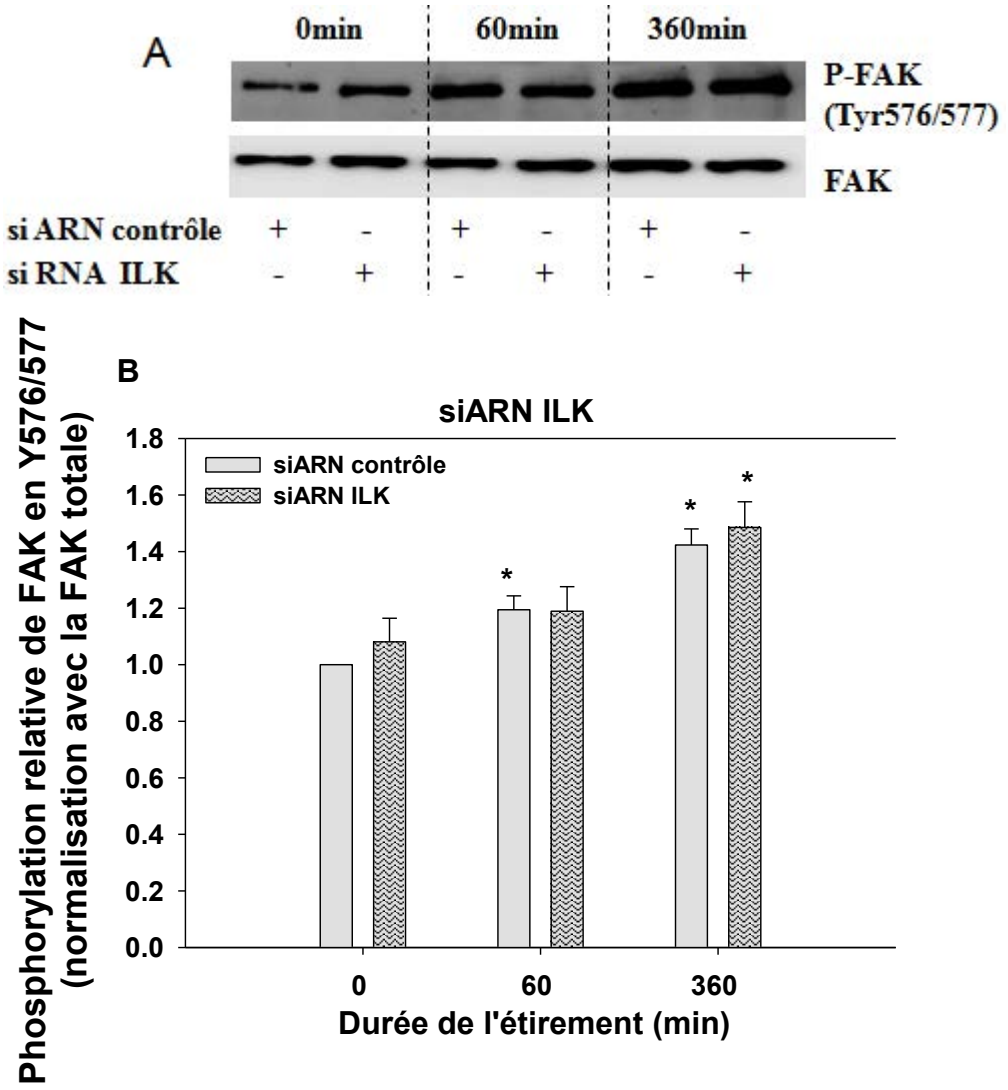
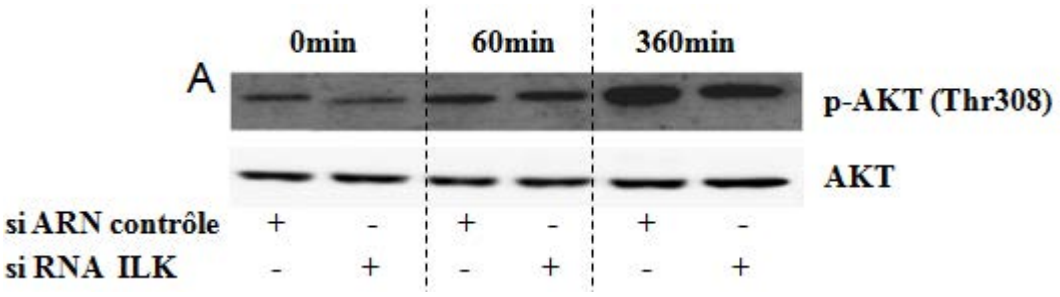


Figure 90 : Effet de siARN ILK sur la phosphorylation de FAK en Y576/577.

Les cellules sont soumises à l'étirement cyclique pendant 60 et 360 min. La phosphorylation de la FAK est calculée par rapport à la FAK totale. A) Résultat de blot ; B) Quantification. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *p≤0.05 par rapport au siARN contrôle à 0 min.

Le siARN ILK n'a pas effet significatif sur la phosphorylation de FAK (Figure 90).



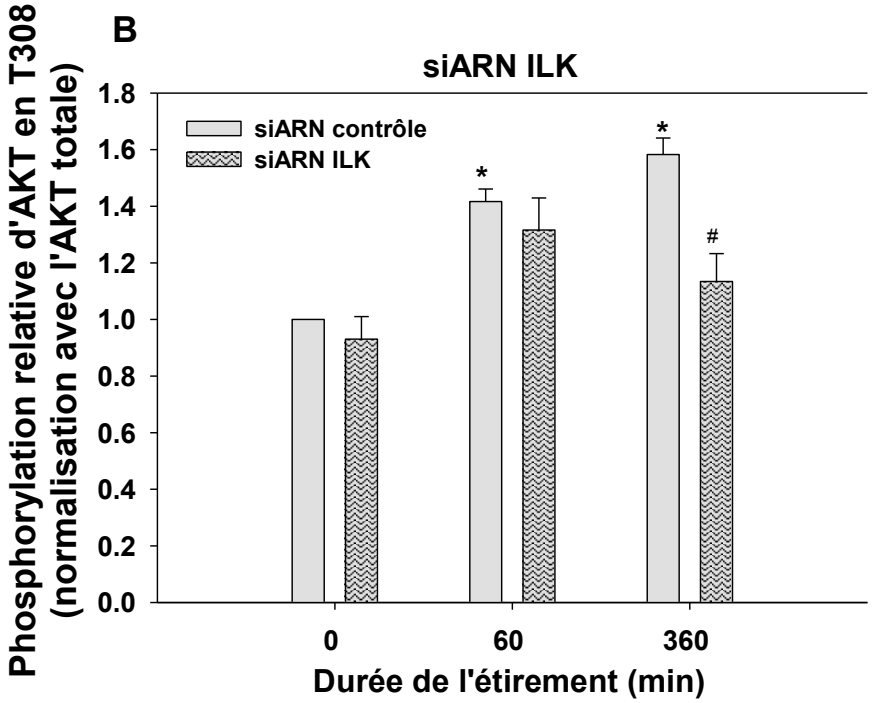


Figure 91 : Effet de siARN ILK sur la phosphorylation d'AKT en Thr308.

Les cellules sont soumises sous l'étirement cyclique pendant 60 et 360 min. Le clivage de taline est calculé par rapport à la taline totale également normalisée avec l'α-tubuline. A) Résultat de blot ; B) Quantification. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *p≤0.05 par rapport au siARN contrôle à 0 min. #p≤0.05 par rapport au siARN contrôle à 360 min de l'étirement.

Il y a une inhibition de la phosphorylation d'AKT de 44,8% par le siARN ILK par rapport au siARN contrôle à 360 min de l'étirement cyclique (Figure 91).

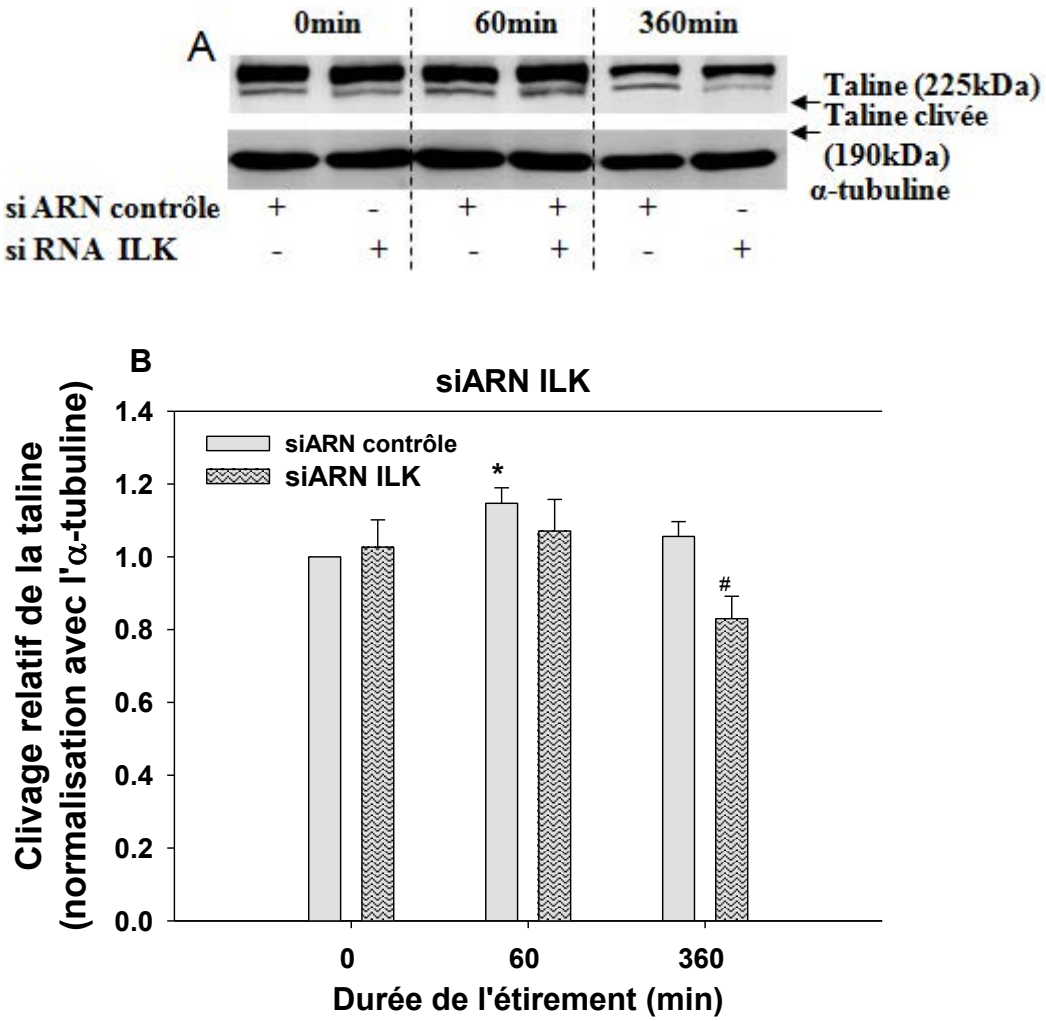


Figure 92 : Effet de siARN ILK sur le clivage de la taline.

Les cellules sont soumises sous l'étirement cyclique pendant 60 et 360 min. Le clivage de taline est calculé par rapport à la taline totale également normalisée avec l'α-tubuline. A) Résultat de blot ; B) Quantification. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *p≤0.05 par rapport au siARN contrôle à 0 min. #p≤0.05 par rapport au siARN contrôle à 360 min de l'étirement.

Le siARN ILK inhibe le clivage de taline significativement de 23% à 360 min de l'étirement cyclique par rapport au siARN contrôle (Figure 92).

6.3. Effets du siARN taline

Nous avons étudié l'effet du siARN taline sur l'expression de la taline et de l'αv ainsi que la signalisation de l'intégrine αvβ3 induite par l'étirement cyclique.

6.3.1. Expression de l'α_v

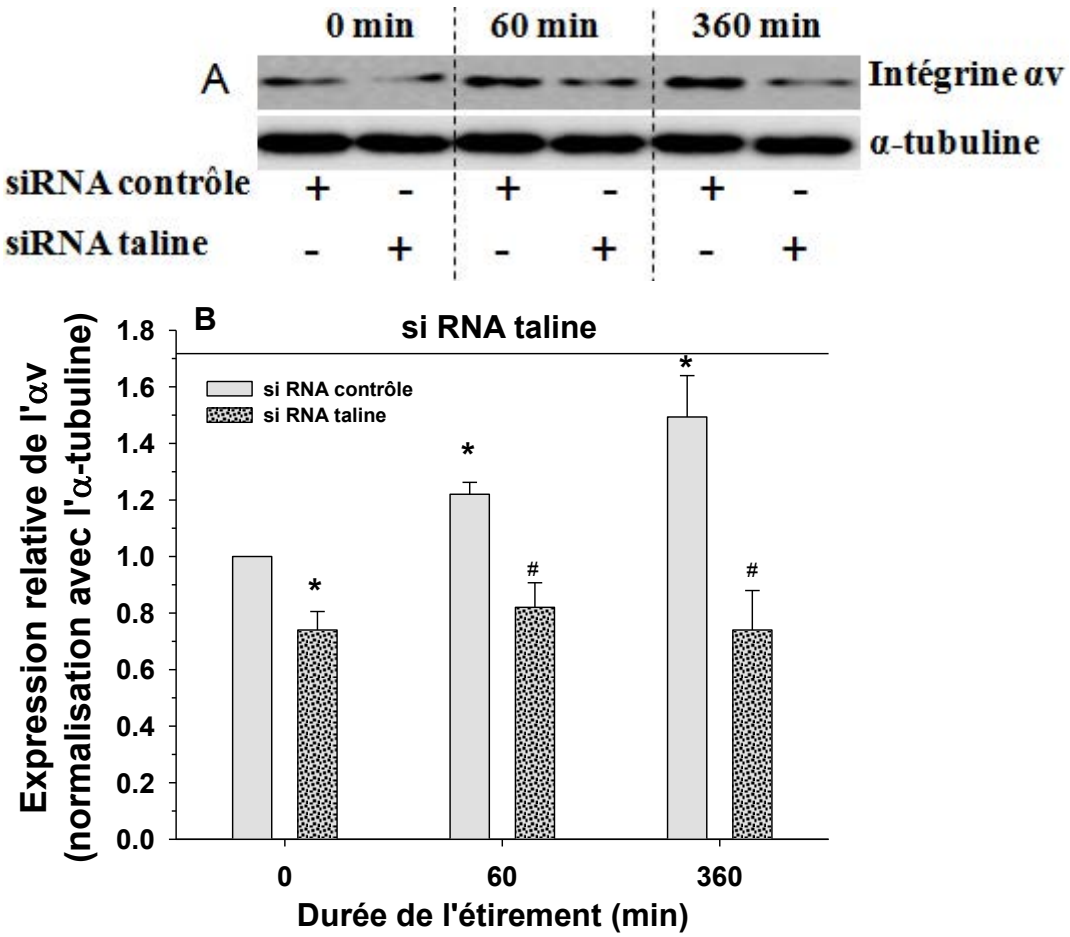


Figure 93 : Effet de siARN taline sur l'expression de l'α_v.

Les cellules sont soumises à l'étirement cyclique pendant 60 et 360 min. L'expression relative de l'α_v est normalisée avec l'α-tubuline. A) Résultat de blot ; B) Quantification. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *p≤0.05 par rapport au siARN contrôle à 0 min. #p≤0.05 par rapport au siARN contrôle dans les mêmes conditions.

Le siARN taline inhibe l'expression de la sous-unité α_v de 26% en conditions statique. En réponse aux contraintes mécaniques l'expression de l'α_v à 60 et 360 min est inhibée de 40 et 75% respectivement (Figure 93).

6.3.2. Signalisation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

En utilisant le siARN taline, nous avons étudié la phosphorylation de Src (p-Y418), de Fak (p-Y576/577), d'AKT (p-T308) et d'ILK (p-T173) ainsi que le clivage de taline en réponse à l'étirement cyclique.

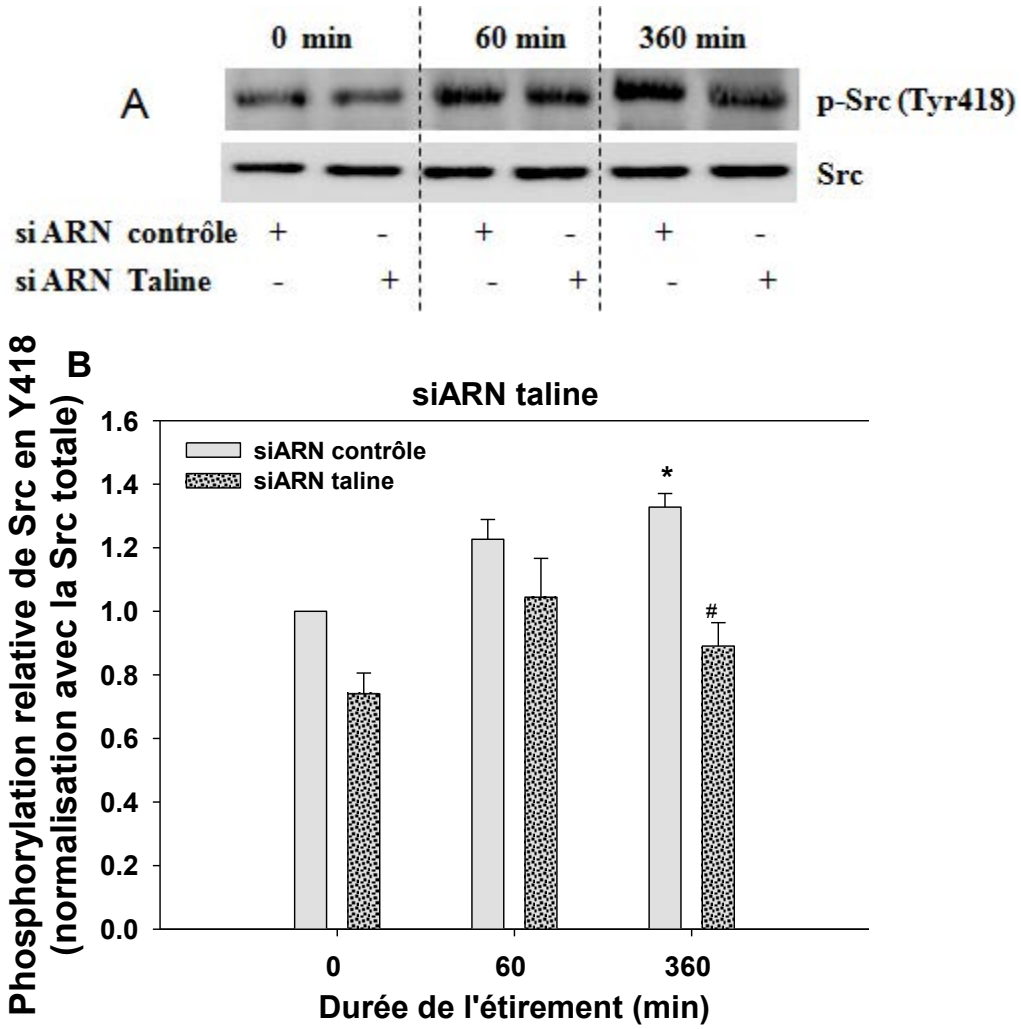


Figure 94 : Effet de siARN taline sur la phosphorylation de Src en Y418.

Les cellules sont soumises sous l'étirement cyclique pendant 60 et 360 min. La phosphorylation de Src est calculée par rapport à la Src totale. A) Résultat de blot ; B) Quantification. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *p≤0.05 par rapport au siARN contrôle à 0 min. #p≤0.05 par rapport au siARN contrôle à 360 min de l'étirement.

L'augmentation de la phosphorylation de Src en réponse au stretch est inhibiée significativement par le siARN taline de 43,7% par rapport au siARN contrôle à 360 min (Figure 94).

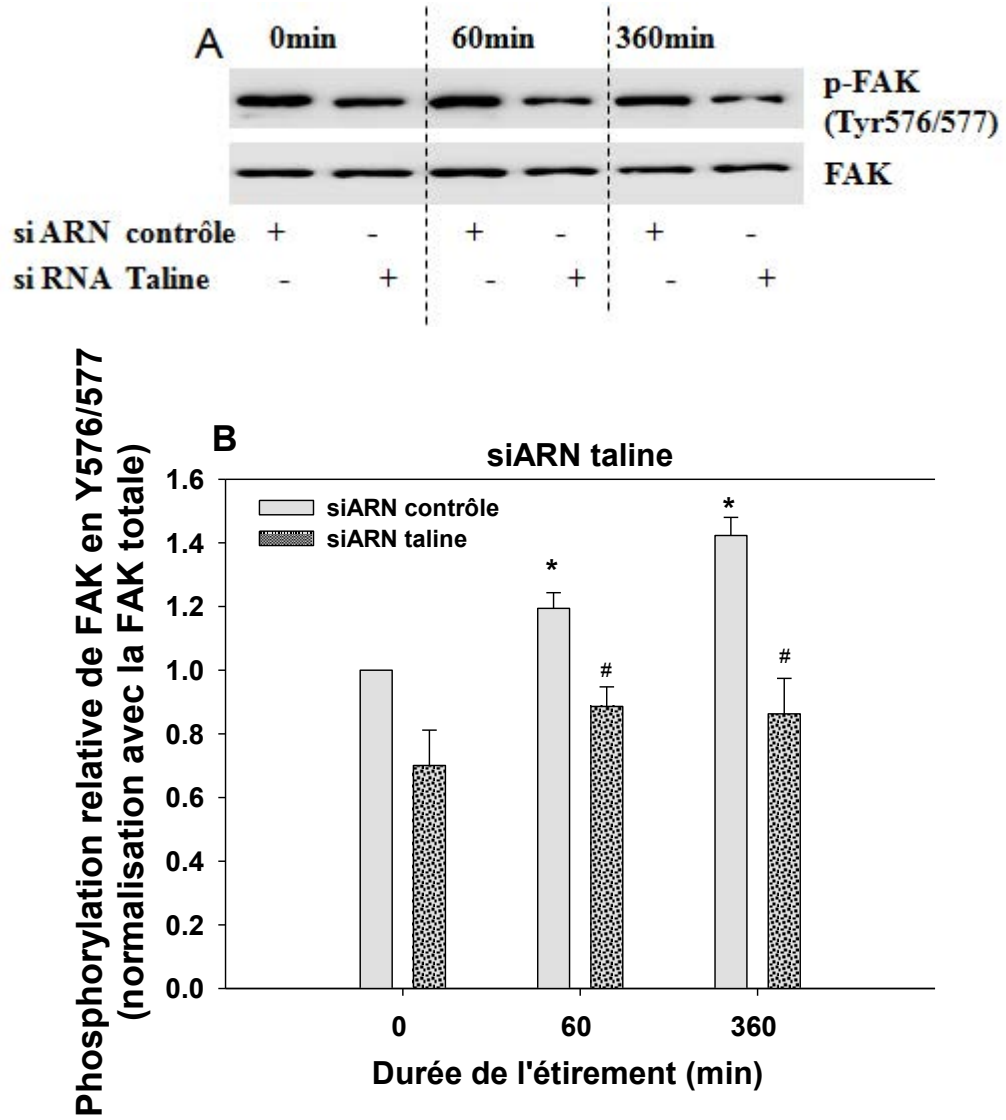


Figure 95 : Effet de siARN taline sur la phosphorylation de FAK en Y576/577.

Les cellules sont soumises à l'étirement cyclique pendant 60 et 360 min. La phosphorylation de FAK est calculée par rapport à la FAK totale. A) Résultat de blot ; B) Quantification. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *p≤0.05 par rapport au siARN contrôle à 0 min. #p≤0.05 par rapport au siARN contrôle à 60 et 360 min de l'étirement.

La phosphorylation de FAK est significativement inhibée par le siARN taline de 30,9% à 60 min et de 56,0% à 360 min par rapport au siARN contrôle (Figure 95).

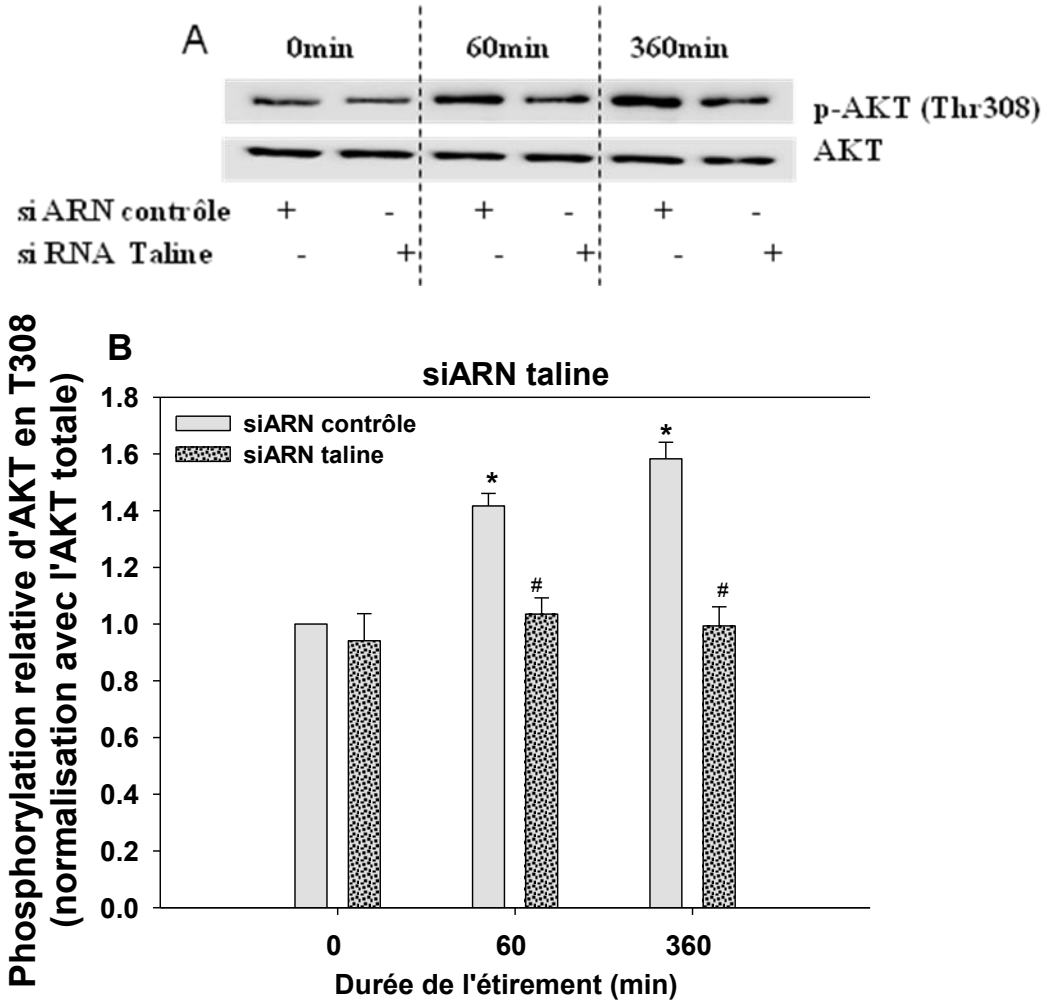
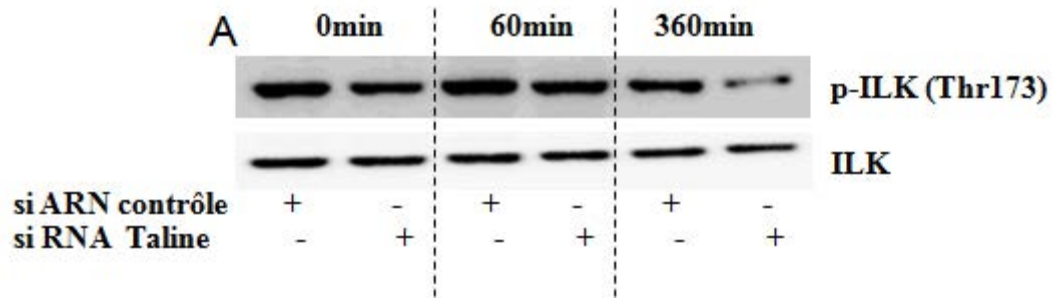


Figure 96 : Effet de siARN taline sur la phosphorylation d'AKT en Thr308.

Les cellules sont soumises à l'étirement cyclique pendant 60 et 360 min. La phosphorylation d'AKT est calculée par rapport à l'AKT totale. A) Résultat de blot ; B) Quantification. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *p≤0.05 par rapport au siARN contrôle à 0 min. #p≤0.05 par rapport au siARN contrôle à 60 et 360 min de l'étirement.

Le siARN taline inhibe la phosphorylation d'AKT de 38,2% et 58,9% par rapport au siARN contrôle à 60 et 360 min respectivement (Figure 96).



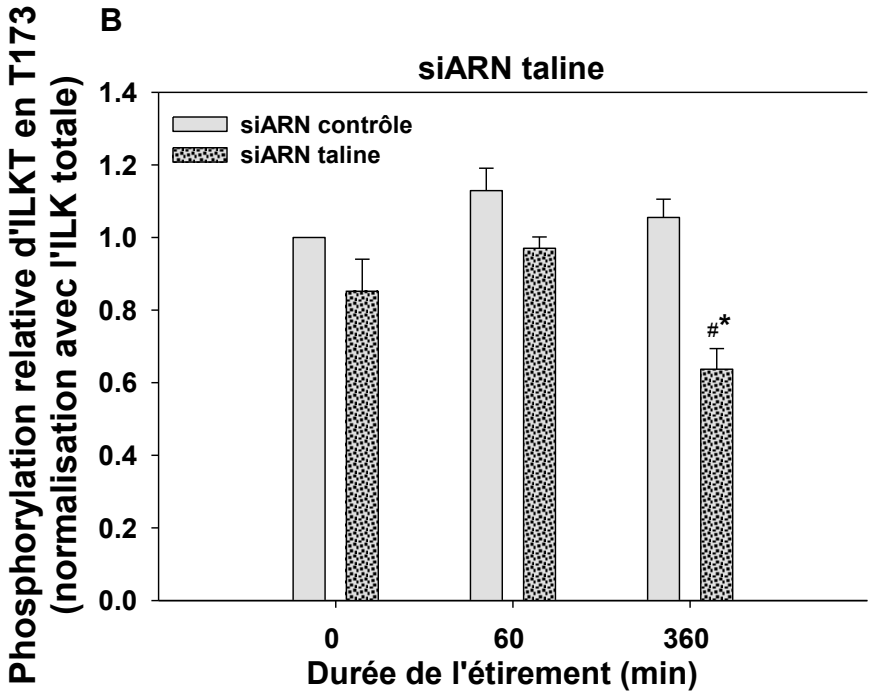


Figure 97 : Effet de siARN taline sur la phosphorylation d'ILK en Thr173.

Les cellules sont soumises à l'étirement cyclique pendant 60 et 360 min. Le clivage de taline est calculé par rapport à la taline totale également normalisée avec l'α-tubuline. A) Résultat de blot ; B) Quantification. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de trois puits d'au moins trois expériences indépendantes. *p≤0.05 par rapport au siARN contrôle à 0 min. #p≤0.05 par rapport au siARN contrôle à 360 min de l'étirement.

Le siARN taline inhibe significativement la phosphorylation de l'ILK à 360 min d'étirement cyclique de 36,3 et 41,8% par rapport au siARN contrôle sans l'étirement cyclique ou au siARN contrôle après 360 min d'étirement respectivement (Figure 97).

En résumé de cette partie, nous avons mis en évidence que i) le peptide antagonist (cRGDPV) de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et le siARN ciblé α_v inhibent la phosphorylation de Src, FAK, AKT et ILK ainsi que le clivage de taline lors de l'étirement cyclique ; ii) le siARN taline a inhibé non seulement l'expression de l'α_v mais aussi la phosphorylation de Src, FAK, AKT et ILK lors de l'étirement cyclique, iii) le siARN ILK n'a pas d'effet sur l'expression de l'α_v, mais il a inhibé la phosphorylation de AKT et le clivage de taline lors de l'étirement cyclique. Ainsi, nous avons démontré que les molécules de signalisation comme Src, AKT et taline sont impliquées spécifiquement dans l'activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ induite par l'étirement cyclique.

VII. Conclusions et Discussion

1. Conclusion générale

Dans cette thèse, nous avons montré pour la première fois l'effet d'un étirement mécanique cyclique d'une déformation de 10% à une fréquence de 1Hz sur une fonction particulière des CML vasculaires, la capacité à soutenir la génération de la thrombine.

Les résultats principaux de cette étude montrent que 1) l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est impliquée dans la génération de thrombine à la surfece des CML vasculaires de rat ; 2) l'étirement mécanique cyclique (10%, 1Hz) régule positivement l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, l'adhésion des CML vasculaires à la prothrombine et la génération de thrombine ; 3) des mécanismes impliquent la voie de signalisation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Ce phénomène pourrait contribuer aux effets thrombotiques et cellulaires de la thrombine dans la paroi vasculaire en réponse à l'augmentation de la pression pulsée chez l'hypertendu et dans les maladies liées au vieillissement.

2. Discussion

2.1. Phénotype du modèle cellulaire

Les CML de la paroi vasculaire sont constamment soumises aux forces de distension par la pression intra-luminale. Une élévation de la tension artérielle provoque l'expansion de la paroi vasculaire, caractérisée par l'hypertrophie des CML et le maintien du phénotype contractile (Hellstrand et al. 2005). Le modèle « Flexcell » utilisé dans ce travail est souvent utilisé dans la littérature pour analyser la réponse cellulaire aux contraintes mécaniques cycliques (Haga et al. 2007). Dans ces études, différentes fonctions cellulaires sont réglées individuellement par les contraintes mécaniques de différentes magnitudes de 7 à 15%, aux fréquences de 0.5 à 2 Hz et avec des durées de quelques minutes à plusieurs jours. Les CML s'adaptent à un environnement pour une certaine modulation phénotypique correspondant à une fonction précise, y compris la différenciation (Reusch et al. 1996), la prolifération (Wilson et al. 1993), l'apoptose (Wernig et al. 2003) et la migration (von Offenberg Sweeney et al. 2004). Mais les mécanismes impliqués dans les changements fonctionnels en réponse aux contraintes mécaniques et l'interconnections des fonctions restent encore à étudier. Par exemple, Nguyen *et al.* ont montré que l'expression de PAR-1 est induite par un étirement cyclique (1Hz, 20%) menant à une augmentation de la proliferation des CML vasculaires en réponse à la thrombine exogène (Nguyen et al. 2001). Les CML vasculaires sont aussi capables de générer leur propre thrombine aux surfaces des cellules grâce à l'exposition des

phosphatidylsérine en cas d'apoptose (Flynn et al. 1997), mais aussi dans les CML non-apoptotiques (Pathak et al. 2006).

Ainsi, nous avons tout d'abord étudié le phénotype cellulaire en présence d'étirement cyclique. Nous avons trouvé que l'étirement cyclique (10%, 1Hz) pendant 6h n'a pas d'effet sur l'organisation du cytosquelette par microscopie confocale. Les résultats du marquage « AnnexinV/PI » réalisé en cytometrie de flux montrent qu'il n'y a pas d'augmentation de l'apoptose par rapport au contrôle. Nous n'avons pas trouvé d'augmentation du ratio Bax/Bcl2 ni de clivage de la caspase 3. Nous avons donc conclu qu'il n'y a pas d'effet apoptotique de l'étirement cyclique sur les CML dans ces conditions expérimentales. Chapman *et al.* ont montré que l'étirement cyclique dans les mêmes conditions inhibe la croissance et la prolifération des CML, et cette inhibition ne passe ni par l'apoptose ni par la nécrose, mais résulte d'une inhibition de la phosphorylation de « retinoblastoma protein » (Rb) induite par l'étirement cyclique (Chapman et al. 2000). Cheng *et al.* ont aussi montré que l'étirement cyclique dans cette condition peut protéger les CML de l'apoptose dans les CML traitées par l'Ox-LDL. Ils ont démontré un mécanisme concernant la stabilisation de la protéine PINCH-1 par l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Cette stabilisation empêche la désorganisation du cytosquelette et finalement désactive Bax (Cheng et al. 2007). Tous ces résultats sont en accord avec l'absence de changement du cytosquelette que nous avons trouvé, l'augmentation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et l'activation de l'ILK. D'ailleurs, la formation du complexe IPP (ILK-PINCH-Parvine) est impliquée dans l'activation de la signalisation des intégrines et surtout dans l'assemblage du cytosquelette de l'actine pendant le processus d'adhésion focale (Legate et al. 2006).

En revanche, les résultats de PCR quantitative en temps réel et le western blot montrent une augmentation de l'expression des marqueurs de différenciation (α-SMA, SM-MHC) au niveau protéique et au niveau transcriptionnel. Zhou *et al.* ont montré que l'étirement cyclique (10%, 0.3Hz) est capable d'induire l'expression d'un gène nommé « Cyr61 » qui code pour une «cycteine-rich heparin-binding » protéine qui favorise l'expression de l'α-SMA gènes (Zhou et al. 2005). Par un réseau bien intégré, l'étirement mécanique cyclique est capable de moduler la croissance et la différenciation des CML vasculaires (Albinsson et al. 2007) (Standley et al. 1999). Dans cette thèse, nous avons mis en évidence que l'étirement mécanique cyclique (10%, 1Hz) est capable d'induire une différenciation des CML vasculaires d'une façon temps dépendante *in vitro*.

D'ailleurs, nous avons montré une activation précoce d'ERK à 5 min d'étirement cyclique avec une chute 10 min après. Son implication dans l'induction de la transcription des « immediate-early genes » requiert son activation rapide (Albinsson et al. 2004). ERK est un

marqueur principal de la prolifération et la dédifférenciation cellulaire, l'inhibition d'ERK correspond donc au phénotype de différenciation des CML induit par les contraintes mécaniques.

2.2. Génération de thrombine induite par les contraintes mécaniques

La capacité cellulaire de générer la thrombine est déterminée par l'équilibre des activités procoagulantes et anticoagulantes dans les cellules. Par exemple, l'expression de TF démarre le processus de la coagulation, alors que l'exposition de la phosphatidylsérine est nécessaire pour une plus forte génération de thrombine (Subbaiah et al. 1976). L'expression de ces propriétés est cellule-spécifiques. Aird *et al.* ont montré que des cellules issues de territoires vasculaires différents réagissent différemment aux stimulations dans leur microenvironnement en ce qui concerne la capacité à générer la thrombine (Aird 2007). Par exemple, les CML et les fibroblastes sont hautement procoagulantes et prêtes à soutenir l'hémostase (Rodgers et al. 1983) (Ovanesov et al. 2005). Nous avons montré qu'il y a une augmentation précoce de l'activité de phosphatidylsérine aux surfaces des CML à partir de 5 min de stimulation mécanique. Schématiquement, le « flip-flop » membranaire conduit à l'expression des phospholipides anioniques et procoagulants à la surface cellulaire, ce qui est nécessaire pour la formation du complexe prothrombinase : FVa, FXa, FII, phospholipides et calcium (Figure 98). Généralement, l'assemblage du complexe de prothrombinase sur cette surface du phospholipide anionique est fourni par les plaquettes activées. Monroe *et al.* ont déjà montré qu'il y a une augmentation de la phosphatidylserine à la membrane plaquettaire lors de l'activation de la prothrombine (Monroe et al. 2002).

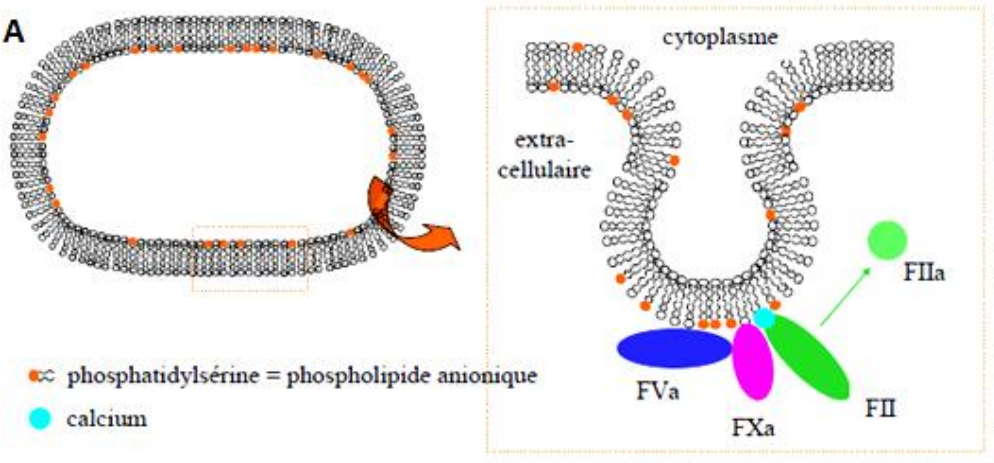


Figure 98 : Représentation schématique du « flip-flop » membranaire.

Il conduit à l'expression des phospholipides anioniques et procoagulants à la surface cellulaire. Formation du complexe de prothrombinase : FVa, FXa, FII, phospholipides et calcium.

Flynn *et al.* ont mis en évidence que les CML apoptotiques fournissent cette surface phospholipide anionique pour la capacité cellulaire de la génération de thrombine (Flynn et al. 1997). Cependant, nous n'avons pas trouvé d'augmentation d'apoptose dans notre modèle. Pathak *et al.* ont aussi montré que la translocation de la phosphatidylsérine à la membrane extracellulaire ne vient pas seulement de l'apoptose cellulaire (Pathak et al. 2006). Ici, nous avons démontré qu'il y a une augmentation de PPA au niveau des CML induite par l'étirement cyclique à partir de 5 min. Nous avons montré aussi que cette activité des phospholides procoagulants n'est pas le plus important déterminant pour favoriser la génération de thrombine en réponse aux contraintes mécaniques car la génération de thrombine augmente à partir de 60 min. Il a été montré que la reconnaissance de la prothrombine par les CML dépend de l'activation de son récepteur membranaire, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Byzova et al. 1998). Nous avons donc envisagé que les contraintes mécaniques contribuent à l'adhésion des CML à la prothrombine *via* l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ afin de faciliter la génération de thrombine au niveau cellulaire.

2.3. Génération de thrombine induite par l'étirement mécanique cyclique dépendant de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

Dans la littérature, il a été montré et validé que la liaison de la prothrombine aux récepteurs des intégrines peut apporter un « pool » de prothrombine afin de favoriser son activation par le facteur complexe Xa/Va aux plaquettes (Stouffer et al. 2003) (Byzova et al. 1998). En supposant que l'étirement favorise la capacité de l'adhésion des CML à la prothrombine par l'activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, cette adhésion cellulaire à la prothrombine pourrait lui permettre de transformer la prothrombine aux surfaces phospholipides anioniques membranaires des CML. Selon cette hypothèse, nous avons tout d'abord montré, dans les conditions statiques (sans étirement), qu'une inhibition de l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ par le siARN α_v induit une diminution de 20% de la génération de thrombine. C'est-à-dire que la présence de cette intégrine est très importante pour la génération de thrombine par les CML. Nous avons également bloqué la liaison de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ à la prothrombine par le peptide mimétique cRGDPV. Nous avons mis en évidence une diminution de l'ETP en fonction de la concentration de peptide cRGDPV. Ces résultats indiquent la médiation et l'importance de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans la génération de thrombine par les CML.

Afin de démontrer l'implication de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans la génération de thrombine induite par les contraintes mécaniques, nous avons étudié le profil de la cinétique de l'adhésion des CML à la prothrombine, l'activité des phospholipides procoagulants et la génération de thrombine (ETP) en fonction du temps d'étirement. Nous avons montré que l'intégrine αvβ3

est augmentée significativement après 60 et 360 min d'étirement cyclique, parallèlement à une augmentation de l'ETP. Pour vérifier ce résultat, nous devions analyser l'état de l'activation ou le « clustering » de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ en cytométrie, mais les anticorps commerciaux que nous pouvons obtenir ne sont pas capables de reconnaitre la molécule d'origine de rat. Néanmoins, nous avons montré que cette augmentation de l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ induite par l'étirement cyclique est supprimée par les peptides cRGDPV. Nous avons donc conclu que l'activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est une conséquence de la signalisation « outside–in » mais également « inside-out ». Puisque les peptides cRGDPV inhibe aussi l'augmentation de l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ en réponse à l'étirement, nous avons émis l'hypothèse que l'interruption de la signalisation « outside-in » de l'intégrine pourrait aboutir à une diminution de l'activité des facteurs de transcription dans le noyau, ce qui inhibe l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ par le voie « inside-out » (Boudreau et al. 1999).

De façon cohérente, cet effet d'inhibition sur l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ par les peptides cRGDPV se retrouve sur l'adhésion des CML à la prothrombine et également sur l'ETP. Ce qui montre le rôle indispensable de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans ces conditions d'augmentation par les contraintes mécaniques. En réponse à l'étirement cyclique, le peptide antagoniste pourrait empêcher directement la formation du complexe prothrombinase basée sur l'accrochage de la prothrombine à la surface des phospholipides des CML.

Par rapport au peptide cRGDPV, les résultats de siARN α_v montrent que la présence d'αv est un facteur déterminant pour l'adhésion et la génération de thrombine à la surface des CML. La différence entre les deux approches est que, le peptide mimétique inhibe la signalisation « outside-in » d'$\alpha_v\beta_3$, mais le siARN α_v inhibe plutôt l'expression d'α_v sans supprimer complètement son activité. Nous avons ainsi observé que les CML transfectées par le siARN αv maintiennent leur réponse aux contraintes mécaniques même si ces effets sont très faibles. Pour cette raison, nous avons aussi trouvé un ETP augmenté après 6h d'étirement par rapport au siARN α_v sans l'étirement. En revanche, l'inhibition d'une autre intégrine comme α5 n'induit pas de modification de l'expression d'α_v, de l'adhésion ou de l'ETP. Ainsi, nous avons mis en évidence que l'implication de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans la génération de thrombine par les CML de rat est spécifique.

2.4. Molécules responsables de la signalisation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ activées par l'étirement mécanique cyclique impliqués dans la génération de thrombine

Nous avons montré une activation de la voie générale de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ par cinq molécules différentes, Src, FAK, AKT, taline et ILK. La voie de Src-FAK est activée rapidement tout au long du processus à partir de 10 min jusqu'à 360 min d'étirement cyclique. L'activation de Src-FAK reflète une réponse des adhésions focales préexistantes pour adapter la charge mécanique en offrant un carrefour moléculaire pour les interactions des différentes molécules de la signalisation (Mitra et al. 2006). Nous avons trouvé que l'activité de Src dépendait strictement de l'expression et de l'activité de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. A l'inverse, la phosphorylation de FAK est essentielle pour la voie de signalisation commune des intégrines, car son activité peut être inhibée aussi par le siARN α5.

La protéine du cytosquelette taline reste la meilleure molécule impliquée dans l'activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Harburger et al. 2009) (Moser et al. 2009) (Critchley et al. 2008). L'activation d'$\alpha_v\beta_3$ se traduit par une augmentation de l'adhésion des CML à la prothrombine, qui est connu comme un ligand dépendant de l'activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Byzova et al. 1998) (Stouffer et al. 2003). Nous avons trouvé que l'étirement cyclique augmente le clivage de la taline de 5 à 60 min, alors que le clivage de la taline par le calpaïne 2 augmente l'affinité des intégrines à la taline (Yan et al. 2001; Franco et al. 2004) (Figure 99). L'effet de l'étirement cyclique sur la taline indique un engagement rapide de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et des molécules de signalisation dans ce modèle.

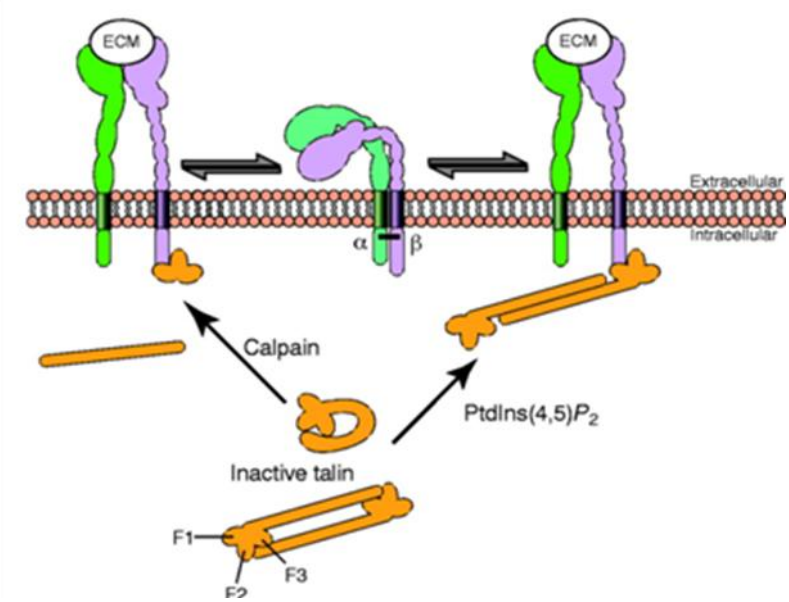


Figure 99 : Dimer de la taline et son activation.

Ce schéma nous montre des mécanismes potentiels de la régulation de l'activation des intégrines médiée par la taline. A l'état de base, la taline est sous la forme inactive verrouillée. Un clivage par la calpaïne libère la tête de la taline. Ensuite, la liaison de la tête de la taline à la queue des intégrines β induit un changement de conformation dans le domaine extracellulaire de la sous-unité β, ce qui conduit à une augmentaion de l'affinité des intégrines pour leurs ligands. Les interactions de la taline avec le phosphatidylinostol diphosphate (PIP2) facilite l'activation de la taline.
Adaptée d'après (Calderwood et al, 2004).

Roca-Cusachs *et al.* ont montré que la « clusterisation » de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ détermine la force de l'adhésion tandis que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et la taline permettent la mécanotransduction (Roca-Cusachs et al. 2009). Par le peptide mimétique, nous avons montré que l'inhibition de la signalisation « outside-in » de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ amène aussi une diminution du clivage de taline. Par le siARN α_v et taline, nous avons confirmé que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est indispensable au clivage de taline et que la présence de la taline est nécessaire pour renforcer et maintenir la signalisation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. L'absence de la sous-unité α_v ou de la taline aboutit à une inhibition de toutes les molécules de la signalisation. D'ailleurs, nous avons aussi trouvé que l'effet du siARN taline est semblable à celui du siARN α_v sur l'expression de l'intégrine α_v. C'est-à-dire que le siARN taline inhibe non seulement l'expression de taline mais aussi l'expression de l'α_v. Parce que la taline est impliquée dans la signalisation bidirectionnelle des intégrines (Tadokoro et al. 2003), elle pourrait se lier aux intégrines et renforcer la signalisation. L'absence de la taline abouti donc à une interruption du signal « ouside-in » induite par les contraintes mécaniques. A l'inverse, l'inhibition de la taline pourrait empêcher l'activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ par la voie « inside-out ». Basé sur cette hypothèse, au niveau de la fonction des CML, nous avons montré une augmentation précoce de l'adhésion des CML à la prothrombine et également une augmentation significative de l'expression protéique de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ à partir de 60 min d'étirement cyclique. Un regroupement rapide des molécules de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ suivi par une localisation de la prothrombine à la surface des CML permet donc une plus forte génération de thrombine par la suite.
D'ailleurs, l'ILK partage avec la taline des fonctions dans l'activation des intégrines grâce à leur liaison à la queue de la sous-unité β (Bottcher et al. 2009). La taline est considérée plutôt comme une protéine du cytosquette, alors que ILK est considérée comme une sérine-thréonine protéine-kinase et une protéine scaffold. Dans les CML de rat, nous avons conclu que l'effet des contraintes mécaniques sur la phosphorylation de l'ILK dépendait du signal de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$-taline. Le résultat de siARN ILK indique que l'ILK empêche principalement la signalisation « inside-out » dans ce modèle. Nos résultats sont en accord avec une autre

étude sur la voie de l'ILK-intégrine dans les plaquettes (Honda et al. 2009). Néanmoins, l'activation d'ILK est aussi contrôlée par le signal de l'intégrine α_5. L'activité d'une sérine-thréonine protéine-kinase de l'ILK lui permet de phosphoryler AKT de manière PI3K indépendante (Persad et al. 2001). Effectivement, nous avons montré que l'inhibition directe de l'ILK par le siARN ILK ou indirecte par un siARN α_v et taline aboutit à une atténuation de la phosphorylation de l'AKT induite par l'étirement cyclique. Sedding *et al.* ont aussi montré que la le blocage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ par un autre inhibiteur spécifique (XJ735) empêche l'activation d'AKT (Sedding et al. 2005). Mais l'implication directe de l'AKT dans la génération de thrombine n'est pas connue encore.

Ainsi, pour établir la liaison entre la signalisation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et la génération de thrombine, nous avons réalisé des expériences utilisant le peptide mimétique myr-RGT. Le peptide RGT correspond à la séquence de la partie carboxy-terminale cytoplasmique de la sous-unité β_3 des intégrines. Le peptide mimétique cRGDPV inhibe directement la liaison extracellulaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et la prothrombine, mais le peptide RGT inhibe sélectivement la signalisation « outside-in » en piégeant l'interaction intracellulaire de Src et β_3. Jusqu'à présent, les effets du peptide RGT sur la fonction cellulaire ont seulement été montrés dans les cellules CHO et les plaquettes (Xi et al. 2003) (Su et al. 2008). Nous avons montré pour la première fois que le peptide RGT à la concentration de 1mM est capable d'inhiber la génération de thrombine non seulement dans la condition statique mais aussi après 6h de l'étirement cyclique. L'ensemble de ces résultats confirme que la génération de thrombine nécessite l'activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ pour l'adhésion de la prothrombine et dépend de la signalisation « outside-in » *via* l'intégrine $\alpha_v\beta_3$-Src afin de favoriser la génération de thrombine (Figure 100). Pour l'instant, nous ne pouvons pas exclure un effet indirect sur la signalisation « inside-out » par le peptide RGT dans la génération de thrombine. Nous avons montré aussi que la concentration 1mM est efficace pour bloquer complètement l'effet des contraintes mécaniques par ces peptides.

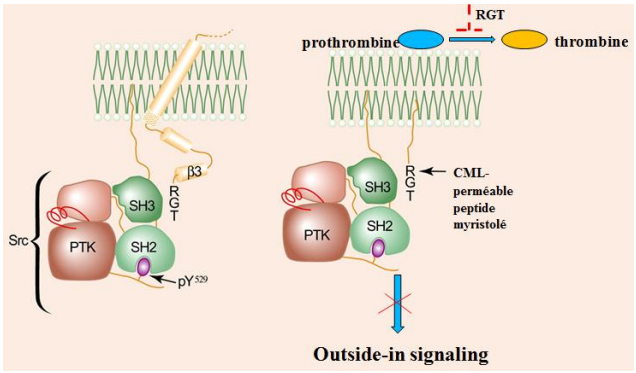


Figure 100 : Effet d'inhibition du peptide RGT myristolé sur la génération de thrombine *via* la voie intégrine β_3-Src.

Le peptide RGT inhibe sélectivement la signalisation « outside-in » en piégeant l'interaction intracellulaire de Src et β3. La myristoylation du peptide RGT permet la pénétrabilité de ce peptide afin d'intervenir dans l'interaction de Src et β3 de manière intracellulaire.

En résumé, nous avons trouvé que l'étirement cyclique active la voie de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Figure 101), en particulier le clivage de la taline et la phosphorylation d'AKT et de Src.

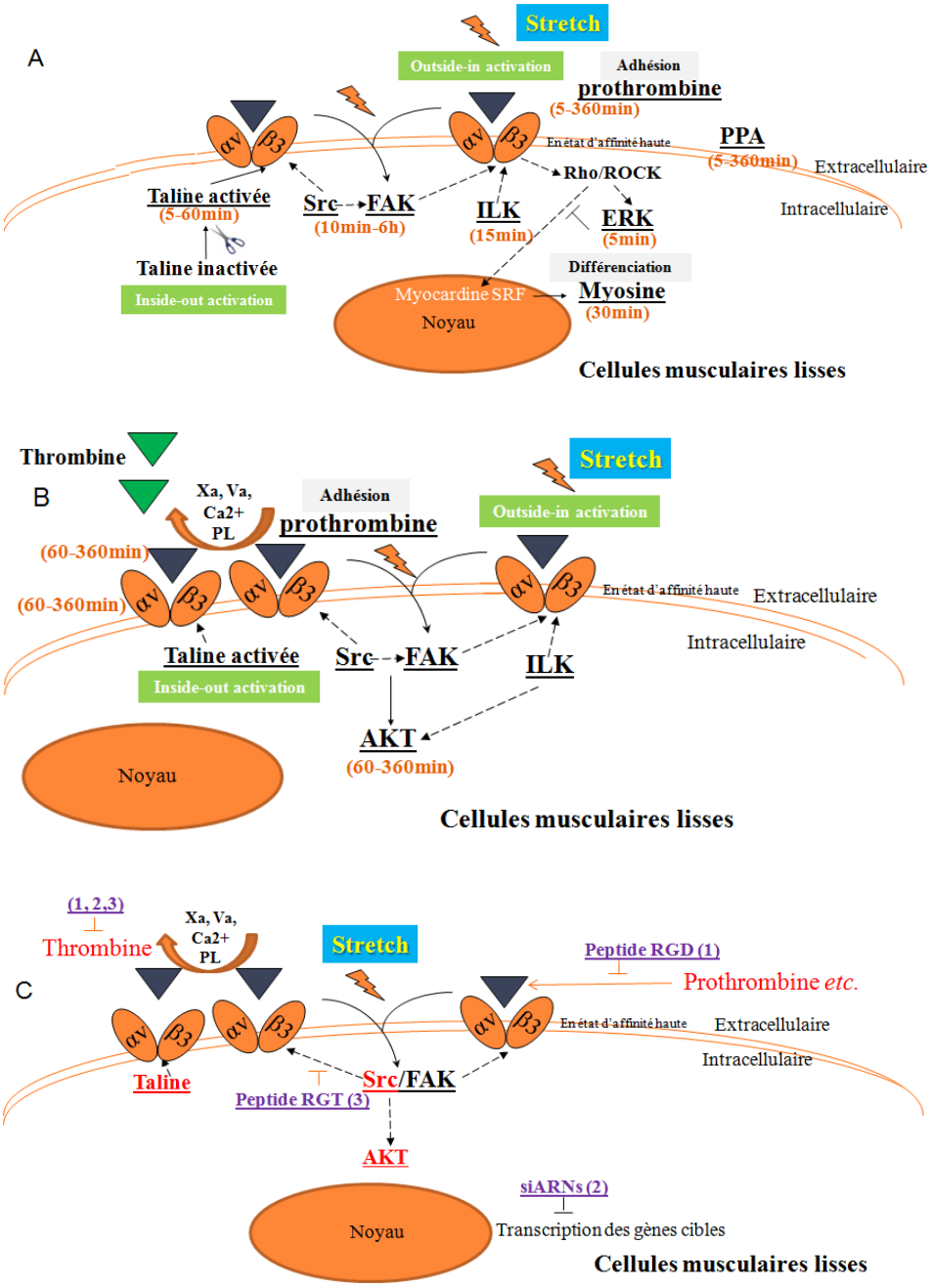


Figure 101 : Implication de la voie de signalisation d'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans l'augementation de la génération de thrombine induite par l'étirement cyclique.

A) Activation précoce (à partir de 5 min d'étirement cyclique) des molécules de signalisation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et phénotype de différenciation des CML ; B) Activation tardive des molécules de

signalisation et augmentation de la génération de thrombine à la surface des CML (à partir de 60 min d'étirement cyclique) ; C) L'inhibition de la signalisation et de l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ par les peptides RGD, RGT ainsi que le siARN α_v entraine une inhibition de la génération de thrombine à la surface des CML. Dans la voie de signalisation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ nous avons montré que l'étirement cyclique induit une activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ de manière « outside-in » à l'aide du peptide RGT et aussi « inside-out » avec le peptide RGD et le siRNA taline. La signalisation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ permet de recruter très rapidement des molécules de l'adhésion focale comme le Src et la FAK. Elles servent à la fois comme un complexe pour s'accrocher et phosphoryler plusieurs protéines en aval de la signalisation des intégrines afin de traduire le signal mécanique en signal biochimique. Les contraintes mécaniques peuvent aussi induire une activation de la protéine taline, qui joue un rôle très important dans la voie de signalisation bidirectionnelle de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Le clivage de taline permet de libérer la tête de la taline qui se lie avec la queue de l'intégrine β_3 pour l'activer. L'ensemble de cette figure montre que la présence de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ activée est indispensable pour la génération de thrombine à la surface des CML induite par l'étirement cyclique.

2.5. Implication potentielle de la génération de thrombine à la surface des CML dans des conditions physiopathologiques *in vivo*

L'ensemble de ces résultats nous permet d'aborder une partie des mécanismes impliqués dans les complications liées aux maladies vasculaires comme l'hypertension, l'anévrisme de l'aorte thoracique et l'athérosclérose.

D'abord, nous pouvons comprendre que la génération de thrombine à la surface des CML soit facilitée par une rupture de la barrière endothéliale. En présence d'une pression pulsée élevée chez les hypertendus, l'activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ participe au remodelage eutrophique de la paroi artérielle (Heerkens et al. 2006). Cette activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ en réponse aux contraintes mécaniques *in vivo* peut augmenter le risque thrombotique. La thrombine pourrait non seulement stimuler sa propre production à la surface des CML en présence de facteur tissulaire (Vidwans et al. 2010) mais aussi intervenir directement sur les CML induisant leur prolifération, la migration (Martin et al. 2009) et la formation des plaques d'adhésions focales dans les CML (Sajid et al. 2003). La thrombine est donc capable de modifier les propriétés phénotypiques des CML qui pourront ainsi libérer à l'interface sang-paroi des facteurs procoagulants en présence de l'hypertension artérielle (HTA) (Stouffer et al. 2003) (Patterson et al. 2003).

Un autre exemple est l'implication de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans la formation des lésions d'athérosclérose en présence d'HTA. D'une part, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a un effet anti-apoptotique pour stabiliser les plaques d'athérome et également permettre l'adhésion des CML à la MEC

au début de la formation des lésions d'athérosclérose. La pénétration et la formation des lipoprotéines de faible densité oxydées (ox-LDL) dans l'intima induisent une réponse inflammatoire des CML. Les LDL oxydés induisent directement la migration et la prolifération des CML. L'activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans les CML en réponse aux contraintes mécaniques protègent les cellules de l'apoptose induite par LDL oxydés *via* la stabilisation du PINCH1 et du cytosquelette (Cheng et al. 2007).

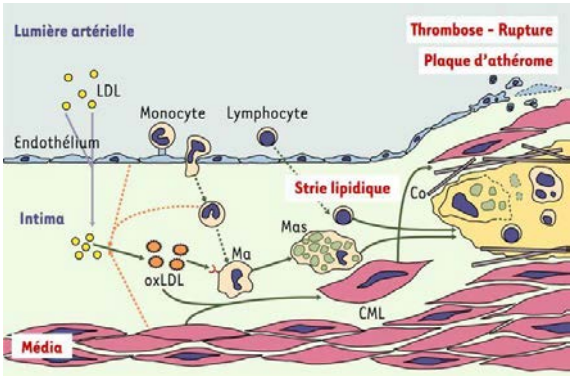


Figure 102 : Initiation et le development des lésions d'athérosclérose.

L'initiation de l'athérosclérose est la pénétration de lipoprotéines athérogènes. Dans l'étape précoce, LDL oxydés induit la migration et la prolifération des CML. Dans le développement et rupture des lésions d'athérosclérose, la présence des facteurs de la coagulation du sang et des récepteurs comme l'intégrine plaquettaire $\alpha_{IIb}\beta_3$ favorise la thrombose intravasculaire.

Adaptée d'après (Borissoff et al. 2009)

D'autre part, la famille des intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$-$\alpha_v\beta_3$ aurait un effet thrombotique lors de l'hémorragie de la plaque d'athérome. Il a été montré que la présence de la fibrine, du facteur tissulaire et de l'intégrine plaquettaire $\alpha_{IIb}\beta_3$ favorise la thrombose intravasculaire dans le développement et la rupture des plaques d'athérosclérose (Choudhury et al. 2007) (Borissoff et al. 2009) (Figure 102).

Les résultats que nous avons obtenus dans cette thèse pourraient améliorer les connaissances sur les fonctions de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ activée, en particulier sa reconnaissance de la prothrombine à la surface des CML. La génération de thrombine à la surface des CML pourrait jouer un rôle très important dans la rupture de la plaque d'athérome. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives sur les potentialités thérapeutiques et le développement des nouveaux anticoagulants agissant en amont de la formation de thrombine comme les anti-Xa. Ceci de façon à neutraliser la formation de faibles concentrations en thrombine qui sont suffisantes pour une action mitogène sur les CML.

VIII. Perspectives

Dans ce projet, nos résultats indiquent que l'étirement cyclique d'une déformation de 10% à une fréquence de 1Hz stimule la génération de thrombine par les CML de rat grâce à un mécanisme dépendant de la voie de signalisation de l'intégrine αvβ3. La plus grande partie de notre étude s'est déroulée dans des conditions aiguës de 5 min à 6h. Il serait souhaitable de pouvoir vérifier et comparer ces résultats avec ceux obtenus dans des conditions chroniques de 24h à plusieurs jours. En fait, nous avons déjà réalisé une partie de ce travail, et les résultats préliminaires montrent que l'étirement cyclique (10%,1Hz) pendant 5 jours induit aussi une différenciation des CML de rat et également une augmentation des sous-unités α_v, β_3 et β_1 des intégrines. Il serait intéressant aussi d'étudier l'effet de l'étirement cyclique chronique sur la génération de thrombine à la surface des CML de rat et des mécanismes moléculaires impliqués.

La condition de l'étirement cyclique que nous avons utilisé sur les CML de rat dans cette thèse est encore dans le cadre de la stimulation physiologique (Chapman et al. 2000). Il est donc nécessaire de réaliser une étude sur l'effet de la contrainte mécanique cyclique dans le cadre d'une stimulation supraphysiologique sur la génération de thrombine. D'ailleurs, l'effet des contraintes mécaniques sur le phénotype cellulaire dépend de l'amplitude de la déformation, de la fréquence et aussi du temps d'exposition (Birukov et al. 1995) (Qu et al. 2007). Des changements du phénotype cellulaire pourraient influer sur la capacité de la génération de thrombine à la surface des CML. De façon intéressante, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ participe non seulement dans la génération de thrombine à la surface des CML mais aussi influe sur de nombreuses réponses cellulaires de la thrombine, par exemple, la prolifération, l'activation de JNK-1 et la formation des adhésions focales (Stouffer et al. 2003) (Sajid et al. 2003). Il serait donc interessant de pouvoir valider les résultats sur les CML de rat soit sur les CML humaines *in vitro,* soit sur des anneaux d'artères d'animaux sains soumis au préalable à des contraintes mécaniques cycliques pathologique ou éventuellement prélevées sur des animaux hypertendus traités ou non avec des peptides mimétiques de l'intégrines $\alpha_v\beta_3$ *in vivo*.

Dans ce travail, nous n'avons pas pu montrer des preuves plus directes de l'activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. A l'avenir, nous voudrions réaliser des tests pour monter directement l'activation de cette intégrine en réponse aux contraintes mécaniques cycliques afin de préciser et distinguer si l'effet de l'augmentation de l'adhésion des CML à la prothrombine est du à une augmentation de son expression ou plutôt à une augmentation de son activation.

En ce qui concerne le mécanisme moléculaire, nous avons montré que le clivage de taline, la phosphorylation d'AKT et de Src dépendent de l'intégrine αv. Il serait souhaitable aussi de pouvoir compléter des expériences sur la liaison entre la voie de signalisation et la génération de thrombine (en cours).

Par ailleurs, les réponses des CML aux contraintes mécaniques sont impliquées dans de nombreuses maladies vasculaires, par exemple, l'hypertension, l'anévrisme de l'aorte thoracique (AAT), l'athérosclérose et la rigidité artérielle (Hoffman et al. 2011) (Qiu et al. 2010). Les changements phénotypiques des CML vasculaires sont cruciaux dans la pathogenèse de ces maladies. Les forces hémodynamiques, en modulant la production de la thrombine aux surfaces des CML vasculaires, peuvent jouer un rôle important dans plusieurs fonctions cellulaires comme la migration, la prolifération et l'apoptose, ainsi que la formation d'adhésion focale. Dans le cas de la pression pulsée élevée comme chez l'hypertendu systolique, la génération accrue de la thrombine peut jouer un rôle important dans la formation locale de thrombus (Regnault et al. 2011). L'ensemble de ces résultats montre que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ joue un rôle dans un système intégré vasculaire et également dans la coagulation.

Ce travail offrirait la possibilité d'améliorer les interventions thérapeutiques actuelles à l'athérothrombose. Toutefois, l'effet thérapeutique des inhibiteurs directs de la thrombine ou des agents d'anti-intégrines serait entravé par des saignements excessifs (Investigators 2000) (Cannon et al. 1998) (Shattil 1999). En particulier, le risque de l'utilisation des agents d'anti-intégrines est un blocage non seulement de la voie en amont de la génération de thrombine au sein de la paroi vasculaire, mais aussi des intégrines plaquettaires. Pour cette raison, il serait important de cibler la fonction spécifique de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ comme le récepteur de la prothrombine.

Clarifier les interactions entre les fonctions de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et les contraintes mécaniques dans les CML vasculaires est un défi majeur pour de futures recherches.

IX. Références

Abram, C. L. and C. A. Lowell (2009). "The ins and outs of leukocyte integrin signaling." Annu Rev Immunol **27**: 339-62.

Adam, R. M., J. A. Roth, H. L. Cheng, D. C. Rice, J. Khoury, S. B. Bauer, C. A. Peters and M. R. Freeman (2003). "Signaling through PI3K/Akt mediates stretch and PDGF-BB-dependent DNA synthesis in bladder smooth muscle cells." J Urol **169**(6): 2388-93.

Adams, J. C. and F. M. Watt (1989). "Fibronectin inhibits the terminal differentiation of human keratinocytes." Nature **340**(6231): 307-9.

Aikawa, M., P. N. Sivam, M. Kuro-o, K. Kimura, K. Nakahara, S. Takewaki, M. Ueda, H. Yamaguchi, Y. Yazaki, M. Periasamy and et al. (1993). "Human smooth muscle myosin heavy chain isoforms as molecular markers for vascular development and atherosclerosis." Circ Res **73**(6): 1000-12.

Aikawa, R., I. Komuro, T. Yamazaki, Y. Zou, S. Kudoh, W. Zhu, T. Kadowaki and Y. Yazaki (1999). "Rho family small G proteins play critical roles in mechanical stress-induced hypertrophic responses in cardiac myocytes." Circ Res **84**(4): 458-66.

Aird, W. C. (2007). "Vascular bed-specific thrombosis." J Thromb Haemost **5 Suppl 1**: 283-91.

Albinsson, S. and P. Hellstrand (2007). "Integration of signal pathways for stretch-dependent growth and differentiation in vascular smooth muscle." Am J Physiol Cell Physiol **293**(2): C772-82.

Albinsson, S., I. Nordstrom and P. Hellstrand (2004). "Stretch of the vascular wall induces smooth muscle differentiation by promoting actin polymerization." J Biol Chem **279**(33): 34849-55.

Andjelkovic, M., T. Jakubowicz, P. Cron, X. F. Ming, J. W. Han and B. A. Hemmings (1996). "Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 5699-704.

Apenberg, S., M. A. Freyberg and P. Friedl (2003). "Shear stress induces apoptosis in vascular smooth muscle cells via an autocrine Fas/FasL pathway." Biochem Biophys Res Commun **310**(2): 355-9.

Arias-Salgado, E. G., S. Lizano, S. Sarkar, J. S. Brugge, M. H. Ginsberg and S. J. Shattil (2003). "Src kinase activation by direct interaction with the integrin beta cytoplasmic domain." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13298-302.

Ashton, G. H. (2004). "Kindler syndrome." Clin Exp Dermatol **29**(2): 116-21.

Balendran, A., A. Casamayor, M. Deak, A. Paterson, P. Gaffney, R. Currie, C. P. Downes and D. R. Alessi (1999). "PDK1 acquires PDK2 activity in the presence of a synthetic peptide derived from the carboxyl terminus of PRK2." Curr Biol **9**(8): 393-404.

Ballestrem, C., B. Hinz, B. A. Imhof and B. Wehrle-Haller (2001). "Marching at the front and dragging behind: differential alphaVbeta3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior." J Cell Biol **155**(7): 1319-32.

Bandyopadhyay, A. and S. Raghavan (2009). "Defining the role of integrin alphavbeta6 in cancer." Curr Drug Targets **10**(7): 645-52.

Bar-Shavit, R., V. Sabbah, M. G. Lampugnani, P. C. Marchisio, J. W. Fenton, 2nd, I. Vlodavsky and E. Dejana (1991). "An Arg-Gly-Asp sequence within thrombin promotes endothelial cell adhesion." J Cell Biol **112**(2): 335-44.

Bar, H., P. Wende, L. Watson, S. Denger, G. van Eys, J. Kreuzer and L. Jahn (2002). "Smoothelin is an indicator of reversible phenotype modulation of smooth muscle cells in balloon-injured rat carotid arteries." Basic Res Cardiol **97**(1): 9-16.

Barberis, L., K. K. Wary, G. Fiucci, F. Liu, E. Hirsch, M. Brancaccio, F. Altruda, G. Tarone and F. G. Giancotti (2000). "Distinct roles of the adaptor protein Shc and focal adhesion kinase in integrin signaling to ERK." J Biol Chem **275**(47): 36532-40.

Bendeck, M. P., C. Irvin, M. Reidy, L. Smith, D. Mulholland, M. Horton and C. M. Giachelli (2000). "Smooth muscle cell matrix metalloproteinase production is stimulated via alpha(v)beta(3) integrin." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(6): 1467-72.

Bendeck, M. P. and M. T. Nakada (2001). "The beta3 integrin antagonist m7E3 reduces matrix metalloproteinase activity and smooth muscle cell migration." J Vasc Res **38**(6): 590-9.

Berndt, M. C. and R. K. Andrews (2011). "Bernard-Soulier syndrome." Haematologica **96**(3): 355-9.

Berrier, A. L. and K. M. Yamada (2007). "Cell-matrix adhesion." J Cell Physiol **213**(3): 565-73.

Bianchi, A., M. E. Gervasi and A. V. Bakin (2010). "Role of beta5-integrin in epithelial-mesenchymal transition in response to TGFbeta." Cell Cycle **9**(8).

Birukov, K. G., V. P. Shirinsky, O. V. Stepanova, V. A. Tkachuk, A. W. Hahn, T. J. Resink and V. N. Smirnov (1995). "Stretch affects phenotype and proliferation of vascular smooth muscle cells." Mol Cell Biochem **144**(2): 131-9.

Bishop, J. E. and G. Lindahl (1999). "Regulation of cardiovascular collagen synthesis by mechanical load." Cardiovasc Res **42**(1): 27-44.

Blockmans, D., H. Deckmyn and J. Vermylen (1995). "Platelet activation." Blood Rev **9**(3): 143-56.

Boettiger, D., L. Lynch, S. Blystone and F. Huber (2001). "Distinct ligand-binding modes for integrin alpha(v)beta(3)-mediated adhesion to fibronectin versus vitronectin." J Biol Chem **276**(34): 31684-90.

Borissoff, J. I., H. M. Spronk, S. Heeneman and H. ten Cate (2009). "Is thrombin a key player in the 'coagulation-atherogenesis' maze?" Cardiovasc Res **82**(3): 392-403.

Bottcher, R. T., A. Lange and R. Fassler (2009). "How ILK and kindlins cooperate to orchestrate integrin signaling." Curr Opin Cell Biol **21**(5): 670-5.

Boudreau, N. J. and P. L. Jones (1999). "Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come." Biochem J **339 (Pt 3)**: 481-8.

Bretschneider, E., M. Braun, A. Fischer, M. Wittpoth, E. Glusa and K. Schror (2000). "Factor Xa acts as a PDGF-independent mitogen in human vascular smooth muscle cells." Thromb Haemost **84**(3): 499-505.

Brown, D. J., E. M. Rzucidlo, B. L. Merenick, R. J. Wagner, K. A. Martin and R. J. Powell (2005). "Endothelial cell activation of the smooth muscle cell phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway promotes differentiation." J Vasc Surg **41**(3): 509-16.

Brown, S. L., C. H. Lundgren, T. Nordt and S. Fujii (1994). "Stimulation of migration of human aortic smooth muscle cells by vitronectin: implications for atherosclerosis." Cardiovasc Res **28**(12): 1815-20.

Burridge, K. and L. Connell (1983). "Talin: a cytoskeletal component concentrated in adhesion plaques and other sites of actin-membrane interaction." Cell Motil **3**(5-6): 405-17.

Butenas, S. and K. G. Mann (2002). "Blood coagulation." Biochemistry (Mosc) **67**(1): 3-12.

Butler, B., M. P. Williams and S. D. Blystone (2003). "Ligand-dependent activation of integrin alpha vbeta 3." J Biol Chem **278**(7): 5264-70.

Byzova, T. V., C. K. Goldman, N. Pampori, K. A. Thomas, A. Bett, S. J. Shattil and E. F. Plow (2000). "A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins." Mol Cell **6**(4): 851-60.

Byzova, T. V. and E. F. Plow (1997). "Networking in the hemostatic system. Integrin alphaiibbeta3 binds prothrombin and influences its activation." J Biol Chem **272**(43): 27183-8.

Byzova, T. V. and E. F. Plow (1998). "Activation of alphaVbeta3 on vascular cells controls recognition of prothrombin." J Cell Biol **143**(7): 2081-92.

Byzova, T. V., R. Rabbani, S. E. D'Souza and E. F. Plow (1998). "Role of integrin alpha(v)beta3 in vascular biology." Thromb Haemost **80**(5): 726-34.

Cai, W. J., M. B. Li, X. Wu, S. Wu, W. Zhu, D. Chen, M. Luo, I. Eitenmuller, A. Kampmann, J. Schaper and W. Schaper (2009). "Activation of the integrins alpha 5beta 1 and alpha v beta 3 and focal adhesion kinase (FAK) during arteriogenesis." Mol Cell Biochem **322**(1-2): 161-9.

Calderwood, D. A. (2004). "Talin controls integrin activation." Biochem Soc Trans **32**(Pt3): 434-7.

Calderwood, D. A. and M. H. Ginsberg (2003). "Talin forges the links between integrins and actin." Nat Cell Biol **5**(8): 694-7.

Calderwood, D. A., B. Yan, J. M. de Pereda, B. G. Alvarez, Y. Fujioka, R. C. Liddington and M. H. Ginsberg (2002). "The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins." J Biol Chem **277**(24): 21749-58.

Cambier, S., D. Z. Mu, D. O'Connell, K. Boylen, W. Travis, W. H. Liu, V. C. Broaddus and S. L. Nishimura (2000). "A role for the integrin alphavbeta8 in the negative regulation of epithelial cell growth." Cancer Res **60**(24): 7084-93.

Campbell, R. A., K. A. Overmyer, C. H. Selzman, B. C. Sheridan and A. S. Wolberg (2009). "Contributions of extravascular and intravascular cells to fibrin network formation, structure, and stability." Blood **114**(23): 4886-96.

Campbell, W. B. and J. R. Falck (2007). "Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors." Hypertension **49**(3): 590-6.

Camper-Kirby, D., S. Welch, A. Walker, I. Shiraishi, K. D. Setchell, E. Schaefer, J. Kajstura, P. Anversa and M. A. Sussman (2001). "Myocardial Akt activation and gender: increased nuclear activity in females versus males." Circ Res **88**(10): 1020-7.

Cannon, C. P., C. H. McCabe, S. Borzak, T. D. Henry, M. D. Tischler, H. S. Mueller, R. Feldman, S. T. Palmeri, K. Ault, S. A. Hamilton, J. M. Rothman, W. F. Novotny and E. Braunwald (1998). "Randomized trial of an oral platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonist, sibrafiban, in patients after an acute coronary syndrome: results of the TIMI 12 trial. Thrombolysis in Myocardial Infarction." Circulation **97**(4): 340-9.

Carisey, A. and C. Ballestrem (2010). "Vinculin, an adapter protein in control of cell adhesion signalling." Eur J Cell Biol.

Carlos, T. M. and J. M. Harlan (1994). "Leukocyte-endothelial adhesion molecules." Blood **84**(7): 2068-101.

Chapman, G. B., W. Durante, J. D. Hellums and A. I. Schafer (2000). "Physiological cyclic stretch causes cell cycle arrest in cultured vascular smooth muscle cells." Am J Physiol Heart Circ Physiol **278**(3): H748-54.

Chen, A. H., D. S. Gortler, S. Kilaru, O. Araim, S. G. Frangos and B. E. Sumpio (2001). "Cyclic strain activates the pro-survival Akt protein kinase in bovine aortic smooth muscle cells." Surgery **130**(2): 378-81.

Chen, H. C., P. A. Appeddu, J. T. Parsons, J. D. Hildebrand, M. D. Schaller and J. L. Guan (1995). "Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin." J Biol Chem **270**(28): 16995-9.

Chen, J., P. R. Somanath, O. Razorenova, W. S. Chen, N. Hay, P. Bornstein and T. V. Byzova (2005). "Akt1 regulates pathological angiogenesis, vascular maturation and permeability in vivo." Nat Med **11**(11): 1188-96.

Chen, Y. J., Y. Y. Wei, H. T. Chen, Y. C. Fong, C. J. Hsu, C. H. Tsai, H. C. Hsu, S. H. Liu and C. H. Tang (2009). "Osteopontin increases migration and MMP-9 up-regulation via alphavbeta3 integrin, FAK, ERK, and NF-kappaB-dependent pathway in human chondrosarcoma cells." J Cell Physiol **221**(1): 98-108.

Choudhury, R. P., V. Fuster, et al. (2004). "Molecular, cellular and functional imaging of atherothrombosis." Nat Rev Drug Discov **3**(11): 913-25.

Cheng, J., J. Zhang, A. Merched, L. Zhang, P. Zhang, L. Truong, A. M. Boriek and J. Du (2007). "Mechanical stretch inhibits oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells by up-regulating integrin alphavbeta3 and stablization of PINCH-1." J Biol Chem **282**(47): 34268-75.

Cheng, J., J. Zhang, A. Merched, L. Zhang, P. Zhang, L. Truong, A. M. Boriek and J. Du (2007). "αvβ3." J Biol Chem **282**(47): 34268-75.

Ciambrone, G. J. and P. J. McKeown-Longo (1992). "Vitronectin regulates the synthesis and localization of urokinase-type plasminogen activator in HT-1080 cells." J Biol Chem **267**(19): 13617-22.

Ciambrone, G. J. and P. J. McKeown-Longo (1992). "Vitronectin regulates the synthesis and localization of urokinase-type plasminogen activator in HT-1080 cells." J Biol Chem **267**(19): 13617-22.

Cintorino, M., E. Bellizzi de Marco, P. Leoncini, S. A. Tripodi, L. J. Xu, A. P. Sappino, A. Schmitt-Graff and G. Gabbiani (1991). "Expression of alpha-smooth-muscle actin in stromal cells of the uterine cervix during epithelial neoplastic changes." Int J Cancer **47**(6): 843-6.

Clyman, R. I., F. Mauray and R. H. Kramer (1992). "Beta 1 and beta 3 integrins have different roles in the adhesion and migration of vascular smooth muscle cells on extracellular matrix." Exp Cell Res **200**(2): 272-84.

Coats, P., Y. P. Jarajapu, C. Hillier, J. C. McGrath and C. Daly (2003). "The use of fluorescent nuclear dyes and laser scanning confocal microscopy to study the cellular aspects of arterial remodelling in human subjects with critical limb ischaemia." Exp Physiol **88**(4): 547-54.

Colombatti, A., P. Bonaldo and R. Doliana (1993). "Type A modules: interacting domains found in several non-fibrillar collagens and in other extracellular matrix proteins." Matrix **13**(4): 297-306.

Cooper, J. A., K. L. Gould, C. A. Cartwright and T. Hunter (1986). "Tyr527 is phosphorylated in pp60c-src: implications for regulation." Science **231**(4744): 1431-4.

Cornelissen, J., J. Armstrong and C. M. Holt (2004). "Mechanical stretch induces phosphorylation of p38-MAPK and apoptosis in human saphenous vein." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(3): 451-6.

Cowan, K. J. and K. B. Storey (2003). "Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress." J Exp Biol **206**(Pt 7): 1107-15.

Critchley, D. R. and A. R. Gingras (2008). "Talin at a glance." J Cell Sci **121**(Pt 9): 1345-7.

Czuchra, A., H. Meyer, K. R. Legate, C. Brakebusch and R. Fassler (2006). "Genetic analysis of beta1 integrin "activation motifs" in mice." J Cell Biol **174**(6): 889-99.

Darby, I., O. Skalli and G. Gabbiani (1990). "Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing." Lab Invest **63**(1): 21-9.

Dardik, R., B. Shenkman, I. Tamarin, R. Eskaraev, J. Harsfalvi, D. Varon and A. Inbal (2002). "Factor XIII mediates adhesion of platelets to endothelial cells through alpha(v)beta(3) and glycoprotein IIb/IIIa integrins." Thromb Res **105**(4): 317-23.

de Melker, A. A. and A. Sonnenberg (1999). "Integrins: alternative splicing as a mechanism to regulate ligand binding and integrin signaling events." Bioessays **21**(6): 499-509.

De Mey, J. G., P. M. Schiffers, R. H. Hilgers and M. M. Sanders (2005). "Toward functional genomics of flow-induced outward remodeling of resistance arteries." Am J Physiol Heart Circ Physiol **288**(3): H1022-7.

Degryse, B., S. Orlando, M. Resnati, S. A. Rabbani and F. Blasi (2001). "Urokinase/urokinase receptor and vitronectin/alpha(v)beta(3) integrin induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization through different signaling pathways." Oncogene **20**(16): 2032-43.

Delcommenne, M., C. Tan, V. Gray, L. Rue, J. Woodgett and S. Dedhar (1998). "Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(19): 11211-6.

DeMali, K. A., C. A. Barlow and K. Burridge (2002). "Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion." J Cell Biol **159**(5): 881-91.

DePasquale, J. A. and C. S. Izzard (1991). "Accumulation of talin in nodes at the edge of the lamellipodium and separate incorporation into adhesion plaques at focal contacts in fibroblasts." J Cell Biol **113**(6): 1351-9.

Destaing, O., E. Planus, D. Bouvard, C. Oddou, C. Badowski, V. Bossy, A. Raducanu, B. Fourcade, C. Albiges-Rizo and M. R. Block (2010). "{beta}1A Integrin is a Master Regulator of Invadosome Organization and Function." Mol Biol Cell.

Di Stefano, I., D. R. Koopmans and B. L. Langille (1998). "Modulation of arterial growth of the rabbit carotid artery associated with experimental elevation of blood flow." J Vasc Res **35**(1): 1-7.

Dobrin, P. B. (1978). "Mechanical properties of arterises." Physiol Rev **58**(2): 397-460.

Downward, J. (1998). "Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt." Curr Opin Cell Biol **10**(2): 262-7.

Drew, J. S., C. Moos and R. A. Murphy (1991). "Localization of isoactins in isolated smooth muscle thin filaments by double gold immunolabeling." Am J Physiol **260**(6 Pt 1): C1332-40.

Duband, J. L., M. Gimona, M. Scatena, S. Sartore and J. V. Small (1993). "Calponin and SM 22 as differentiation markers of smooth muscle: spatiotemporal distribution during avian embryonic development." Differentiation **55**(1): 1-11.

Dubree, N. J., D. R. Artis, G. Castanedo, J. Marsters, D. Sutherlin, L. Caris, K. Clark, S. M. Keating, M. H. Beresini, H. Chiu, S. Fong, H. B. Lowman, N. J. Skelton and D. Y. Jackson (2002). "Selective alpha4beta7 integrin antagonists and their potential as antiinflammatory agents." J Med Chem **45**(16): 3451-7.

Eddinger, T. J. and D. P. Meer (1997). "Myosin isoform heterogeneity in single smooth muscle cells." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **117**(1): 29-38.

Eliceiri, B. P. and D. A. Cheresh (2000). "Role of alpha v integrins during angiogenesis." Cancer J **6 Suppl 3**: S245-9.

Engelen, J. J., L. E. Esterling, J. C. Albrechts, S. D. Detera-Wadleigh and G. J. van Eys (1997). "Assignment of the human gene for smoothelin (SMTN) to chromosome 22q12 by fluorescence in situ hybridization and radiation hybrid mapping." Genomics **43**(2): 245-7.

Enomoto, A., H. Murakami, N. Asai, N. Morone, T. Watanabe, K. Kawai, Y. Murakumo, J. Usukura, K. Kaibuchi and M. Takahashi (2005). "Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE." Dev Cell **9**(3): 389-402.

Fatigati, V. and R. A. Murphy (1984). "Actin and tropomyosin variants in smooth muscles. Dependence on tissue type." J Biol Chem **259**(23): 14383-8.

Felding-Habermann, B. and D. A. Cheresh (1993). "Vitronectin and its receptors." Curr Opin Cell Biol **5**(5): 864-8.

Flevaris, P., A. Stojanovic, H. Gong, A. Chishti, E. Welch and X. Du (2007). "A molecular switch that controls cell spreading and retraction." J Cell Biol **179**(3): 553-65.

Flynn, P. D., C. D. Byrne, T. P. Baglin, P. L. Weissberg and M. R. Bennett (1997). "Thrombin generation by apoptotic vascular smooth muscle cells." Blood **89**(12): 4378-84.

Frame, M. C. (2002). "Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour." Biochim Biophys Acta **1602**(2): 114-30.

Franco, S. J., M. A. Rodgers, B. J. Perrin, J. Han, D. A. Bennin, D. R. Critchley and A. Huttenlocher (2004). "Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics." Nat Cell Biol **6**(10): 977-83.

Friedrich, E. B., E. Liu, S. Sinha, S. Cook, D. S. Milstone, C. A. MacRae, M. Mariotti, P. J. Kuhlencordt, T. Force, A. Rosenzweig, R. St-Arnaud, S. Dedhar and R. E. Gerszten (2004). "Integrin-linked kinase regulates endothelial cell survival and vascular development." Mol Cell Biol **24**(18): 8134-44.

Fukuda, T., K. Chen, X. Shi and C. Wu (2003). "PINCH-1 is an obligate partner of integrin-linked kinase (ILK) functioning in cell shape modulation, motility, and survival." J Biol Chem **278**(51): 51324-33.

Fullard, J. F. (2004). "The role of the platelet glycoprotein IIb/IIIa in thrombosis and haemostasis." Curr Pharm Des **10**(14): 1567-76.

Gabbiani, G., E. Schmid, S. Winter, C. Chaponnier, C. de Ckhastonay, J. Vandekerckhove, K. Weber and W. W. Franke (1981). "Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(1): 298-302.

Galis, Z. S., R. Kranzhofer, J. W. Fenton, 2nd and P. Libby (1997). "Thrombin promotes activation of matrix metalloproteinase-2 produced by cultured vascular smooth muscle cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **17**(3): 483-9.

Garcia, A. J. and D. Boettiger (1999). "Integrin-fibronectin interactions at the cell-material interface: initial integrin binding and signaling." Biomaterials **20**(23-24): 2427-33.

Garcia, A. J., F. Huber and D. Boettiger (1998). "Force required to break alpha5beta1 integrin-fibronectin bonds in intact adherent cells is sensitive to integrin activation state." J Biol Chem **273**(18): 10988-93.

Garofalo, R. S., S. J. Orena, K. Rafidi, A. J. Torchia, J. L. Stock, A. L. Hildebrandt, T. Coskran, S. C. Black, D. J. Brees, J. R. Wicks, J. D. McNeish and K. G. Coleman (2003). "Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta." J Clin Invest **112**(2): 197-208.

Geiger, B., J. P. Spatz and A. D. Bershadsky (2009). "Environmental sensing through focal adhesions." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(1): 21-33.

Giancotti, F. G. and E. Ruoslahti (1999). "Integrin signaling." Science **285**(5430): 1028-32.

Ginsberg, M. H., J. C. Loftus and E. F. Plow (1988). "Cytoadhesins, integrins, and platelets." Thromb Haemost **59**(1): 1-6.

Go, Y. M., Y. C. Boo, H. Park, M. C. Maland, R. Patel, K. A. Pritchard, Jr., Y. Fujio, K. Walsh, V. Darley-Usmar and H. Jo (2001). "Protein kinase B/Akt activates c-Jun NH(2)-terminal kinase by increasing NO production in response to shear stress." J Appl Physiol **91**(4): 1574-81.

Gomez, R. A., K. R. Lynch, B. C. Sturgill, J. P. Elwood, R. L. Chevalier, R. M. Carey and M. J. Peach (1989). "Distribution of renin mRNA and its protein in the developing kidney." Am J Physiol **257**(5 Pt 2): F850-8.

Gu, J., S. Nada, M. Okada and K. Sekiguchi (2003). "Csk regulates integrin-mediated signals: involvement of differential activation of ERK and Akt." Biochem Biophys Res Commun **303**(3): 973-7.

Gusev, N. B. (2001). "Some properties of caldesmon and calponin and the participation of these proteins in regulation of smooth muscle contraction and cytoskeleton formation." Biochemistry (Mosc) **66**(10): 1112-21.

Haddy, F. J., P. M. Vanhoutte and M. Feletou (2006). "Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **290**(3): R546-52.

Haga, J. H., Y. S. Li and S. Chien (2007). "Molecular basis of the effects of mechanical stretch on vascular smooth muscle cells." J Biomech **40**(5): 947-60.

Hahn, C. and M. A. Schwartz (2009). "Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(1): 53-62.

Halka, A. T., N. J. Turner, A. Carter, J. Ghosh, M. O. Murphy, J. P. Kirton, C. M. Kielty and M. G. Walker (2008). "The effects of stretch on vascular smooth muscle cell phenotype in vitro." Cardiovasc Pathol **17**(2): 98-102.

Hamada, K., T. Shimizu, T. Matsui, S. Tsukita and T. Hakoshima (2000). "Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain." EMBO J **19**(17): 4449-62.

Hamada, K., N. Takuwa, K. Yokoyama and Y. Takuwa (1998). "Stretch activates Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase in vascular smooth muscle cells through mechanisms involving autocrine ATP stimulation of purinoceptors." J Biol Chem **273**(11): 6334-40.

Hanada, M., J. Feng and B. A. Hemmings (2004). "Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target." Biochim Biophys Acta **1697**(1-2): 3-16.

Hanks, S. K., L. Ryzhova, N. Y. Shin and J. Brabek (2003). "Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility." Front Biosci **8**: d982-96.

Hannigan, G. E., C. Leung-Hagesteijn, L. Fitz-Gibbon, M. G. Coppolino, G. Radeva, J. Filmus, J. C. Bell and S. Dedhar (1996). "Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase." Nature **379**(6560): 91-6.

Hapke, S., H. Kessler, N. Arroyo de Prada, A. Benge, M. Schmitt, E. Lengyel and U. Reuning (2001). "Integrin alpha(v)beta(3)/vitronectin interaction affects expression of the urokinase system in human ovarian cancer cells." J Biol Chem **276**(28): 26340-8.

Harburger, D. S., M. Bouaouina and D. A. Calderwood (2009). "Kindlin-1 and -2 directly bind the C-terminal region of beta integrin cytoplasmic tails and exert integrin-specific activation effects." J Biol Chem **284**(17): 11485-97.

Harburger, D. S. and D. A. Calderwood (2009). "Integrin signalling at a glance." J Cell Sci **122**(Pt 2): 159-63.

Hato, T., N. Pampori and S. J. Shattil (1998). "Complementary roles for receptor clustering and conformational change in the adhesive and signaling functions of integrin alphaIIb beta3." J Cell Biol **141**(7): 1685-95.

Hauck, C. R., T. Hunter and D. D. Schlaepfer (2001). "The v-Src SH3 domain facilitates a cell adhesion-independent association with focal adhesion kinase." J Biol Chem **276**(21): 17653-62.

Hayashi, K., M. Takahashi, K. Kimura, W. Nishida, H. Saga and K. Sobue (1999). "Changes in the balance of phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (Akt) and the mitogen-activated protein kinases (ERK/p38MAPK) determine a phenotype of visceral and vascular smooth muscle cells." J Cell Biol **145**(4): 727-40.

Heerkens, E. H., A. S. Izzard and A. M. Heagerty (2007). "Integrins, vascular remodeling, and hypertension." Hypertension **49**(1): 1-4.

Heerkens, E. H., L. Shaw, A. Ryding, G. Brooker, J. J. Mullins, C. Austin, V. Ohanian and A. M. Heagerty (2006). "alphaV integrins are necessary for eutrophic inward remodeling of small arteries in hypertension." Hypertension **47**(2): 281-7.

Hellstrand, P. and S. Albinsson (2005). "Stretch-dependent growth and differentiation in vascular smooth muscle: role of the actin cytoskeleton." Can J Physiol Pharmacol **83**(10): 869-75.

Hemker, H. C., S. Wielders, H. Kessels and S. Beguin (1993). "Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential." Thromb Haemost **70**(4): 617-24.

Hemler, M. E., C. Huang and L. Schwarz (1987). "The VLA protein family. Characterization of five distinct cell surface heterodimers each with a common 130,000 molecular weight beta subunit." J Biol Chem **262**(7): 3300-9.

Hemmings, B. A. (1997). "Akt signaling: linking membrane events to life and death decisions." Science **275**(5300): 628-30.

Hervy, M., L. Hoffman and M. C. Beckerle (2006). "From the membrane to the nucleus and back again: bifunctional focal adhesion proteins." Curr Opin Cell Biol **18**(5): 524-32.

Hildebrand, J. D., M. D. Schaller and J. T. Parsons (1993). "Identification of sequences required for the efficient localization of the focal adhesion kinase, pp125FAK, to cellular focal adhesions." J Cell Biol **123**(4): 993-1005.

Hildebrand, J. D., M. D. Schaller and J. T. Parsons (1995). "Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein binds to the carboxyl terminal domain of focal adhesion kinase." Mol Biol Cell **6**(6): 637-47.

Hill, C. S. and R. Treisman (1995). "Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity." Cell **80**(2): 199-211.

Hirano, K. and H. Kanaide (2003). "Role of protease-activated receptors in the vascular system." J Atheroscler Thromb **10**(4): 211-25.

Hodivala-Dilke, K. M., K. P. McHugh, D. A. Tsakiris, H. Rayburn, D. Crowley, M. Ullman-Cullere, F. P. Ross, B. S. Coller, S. Teitelbaum and R. O. Hynes (1999). "Beta3-integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival." J Clin Invest **103**(2): 229-38.

Hoffman, B. D., C. Grashoff and M. A. Schwartz (2011). "Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction." Nature **475**(7356): 316-23.

Honda, S., H. Shirotani-Ikejima, S. Tadokoro, Y. Maeda, T. Kinoshita, Y. Tomiyama and T. Miyata (2009). "Integrin-linked kinase associated with integrin activation." Blood **113**(21): 5304-13.

Horton, M. A. (1997). "The alpha v beta 3 integrin "vitronectin receptor"." Int J Biochem Cell Biol **29**(5): 721-5.

Hoshiga, M., C. E. Alpers, L. L. Smith, C. M. Giachelli and S. M. Schwartz (1995). "Alpha-v beta-3 integrin expression in normal and atherosclerotic artery." Circ Res **77**(6): 1129-35.

Huber, P. A. (1997). "Caldesmon." Int J Biochem Cell Biol **29**(8-9): 1047-51.

Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." Cell **110**(6): 673-87.

Ingber, D. (1991). "Integrins as mechanochemical transducers." Curr Opin Cell Biol **3**(5): 841-8.

Intengan, H. D. and E. L. Schiffrin (2001). "Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis." Hypertension **38**(3 Pt 2): 581-7.

Investigators, T. S. (2000). "Comparison of sibrafiban with aspirin for prevention of cardiovascular events after acute coronary syndromes: a randomised trial. The SYMPHONY Investigators. Sibrafiban versus Aspirin to Yield Maximum Protection from Ischemic Heart Events Post-acute Coronary Syndromes." Lancet **355**(9201): 337-45.

Ishida, T., M. Ishida, J. Suero, M. Takahashi and B. C. Berk (1999). "Agonist-stimulated cytoskeletal reorganization and signal transduction at focal adhesions in vascular smooth muscle cells require c-Src." J Clin Invest **103**(6): 789-97.

Izard, T., G. Evans, R. A. Borgon, C. L. Rush, G. Bricogne and P. R. Bois (2004). "Vinculin activation by talin through helical bundle conversion." Nature **427**(6970): 171-5.

Izard, T. and C. Vonrhein (2004). "Structural basis for amplifying vinculin activation by talin." J Biol Chem **279**(26): 27667-78.

Jobard, F., B. Bouadjar, F. Caux, S. Hadj-Rabia, C. Has, F. Matsuda, J. Weissenbach, M. Lathrop, J. F. Prud'homme and J. Fischer (2003). "Identification of mutations in a new gene encoding a FERM family protein with a pleckstrin homology domain in Kindler syndrome." Hum Mol Genet **12**(8): 925-35.

Johnson, C. P., H. Y. Tang, C. Carag, D. W. Speicher and D. E. Discher (2007). "Forced unfolding of proteins within cells." Science **317**(5838): 663-6.

Johnson, L. N., M. E. Noble and D. J. Owen (1996). "Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation." Cell **85**(2): 149-58.

Kakar, P. and G. Y. Lip (2007). "Hypertension: endothelial dysfunction, the prothrombotic state and antithrombotic therapy." Expert Rev Cardiovasc Ther **5**(3): 441-50.

Kamikubo, Y., J. G. Neels and B. Degryse (2009). "Vitronectin inhibits plasminogen activator inhibitor-1-induced signalling and chemotaxis by blocking plasminogen activator inhibitor-1 binding to the low-density lipoprotein receptor-related protein." Int J Biochem Cell Biol **41**(3): 578-85.

Kanda, S., M. Kuzuya, M. A. Ramos, T. Koike, K. Yoshino, S. Ikeda and A. Iguchi (2000). "Matrix metalloproteinase and alphavbeta3 integrin-dependent vascular smooth muscle cell invasion through a type I collagen lattice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(4): 998-1005.

Kanda, Y., K. Mizuno, Y. Kuroki and Y. Watanabe (2001). "Thrombin-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation is mediated by epidermal growth factor receptor transactivation pathway." Br J Pharmacol **132**(8): 1657-64.

Kieffer, N. and D. R. Phillips (1990). "Platelet membrane glycoproteins: functions in cellular interactions." Annu Rev Cell Biol **6**: 329-57.

Kirk, R. I., M. R. Sanderson and K. M. Lerea (2000). "Threonine phosphorylation of the beta 3 integrin cytoplasmic tail, at a site recognized by PDK1 and Akt/PKB in vitro, regulates Shc binding." J Biol Chem **275**(40): 30901-6.

Kishimoto, T. K., K. O'Connor, A. Lee, T. M. Roberts and T. A. Springer (1987). "Cloning of the beta subunit of the leukocyte adhesion proteins: homology to an extracellular matrix receptor defines a novel supergene family." Cell **48**(4): 681-90.

Klingbeil, C. K., C. R. Hauck, D. A. Hsia, K. C. Jones, S. R. Reider and D. D. Schlaepfer (2001). "Targeting Pyk2 to beta 1-integrin-containing focal contacts rescues fibronectin-stimulated signaling and haptotactic motility defects of focal adhesion kinase-null cells." J Cell Biol **152**(1): 97-110.

Klinghoffer, R. A., C. Sachsenmaier, J. A. Cooper and P. Soriano (1999). "Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction." Embo J **18**(9): 2459-71.

Kokubo, T., H. Uchida and E. T. Choi (2007). "Integrin alpha(v)beta(3) as a target in the prevention of neointimal hyperplasia." J Vasc Surg **45 Suppl A**: A33-8.

Kolpakov, V., M. D. Rekhter, D. Gordon, W. H. Wang and T. J. Kulik (1995). "Effect of mechanical forces on growth and matrix protein synthesis in the in vitro pulmonary artery. Analysis of the role of individual cell types." Circ Res **77**(4): 823-31.

Kramer, J., C. Quensel, J. Meding, M. C. Cardoso and H. Leonhardt (2001). "Identification and characterization of novel smoothelin isoforms in vascular smooth muscle." J Vasc Res **38**(2): 120-32.

Krepinsky, J. C., Y. Li, Y. Chang, L. Liu, F. Peng, D. Wu, D. Tang, J. Scholey and A. J. Ingram (2005). "Akt mediates mechanical strain-induced collagen production by mesangial cells." J Am Soc Nephrol **16**(6): 1661-72.

Kuro-o, M., R. Nagai, H. Tsuchimochi, H. Katoh, Y. Yazaki, A. Ohkubo and F. Takaku (1989). "Developmentally regulated expression of vascular smooth muscle myosin heavy chain isoforms." J Biol Chem **264**(31): 18272-5.

Lai-Cheong, J. E., S. Ussar, K. Arita, I. R. Hart and J. A. McGrath (2008). "Colocalization of kindlin-1, kindlin-2, and migfilin at keratinocyte focal adhesion and relevance to the pathophysiology of Kindler syndrome." J Invest Dermatol **128**(9): 2156-65.

Landerholm, T. E., X. R. Dong, J. Lu, N. S. Belaguli, R. J. Schwartz and M. W. Majesky (1999). "A role for serum response factor in coronary smooth muscle differentiation from proepicardial cells." Development **126**(10): 2053-62.

Lane, N. E., W. Yao, M. C. Nakamura, M. B. Humphrey, D. Kimmel, X. Huang, D. Sheppard, F. P. Ross and S. L. Teitelbaum (2005). "Mice lacking the integrin beta5 subunit have accelerated osteoclast maturation and increased activity in the estrogen-deficient state." J Bone Miner Res **20**(1): 58-66.

Law, D. A., F. R. DeGuzman, P. Heiser, K. Ministri-Madrid, N. Killeen and D. R. Phillips (1999). "Integrin cytoplasmic tyrosine motif is required for outside-in alphaIIbbeta3 signalling and platelet function." Nature **401**(6755): 808-11.

Lebedev, O. I. (1992). "[Excessive cicatrization after glaucoma-control operations: the participation of plasma fibronectin]." Vestn Oftalmol **108**(4-6): 9-11.

Lee, R. T., W. H. Briggs, G. C. Cheng, H. B. Rossiter, P. Libby and T. Kupper (1997). "Mechanical deformation promotes secretion of IL-1 alpha and IL-1 receptor antagonist." J Immunol **159**(10): 5084-8.

Legate, K. R., E. Montanez, O. Kudlacek and R. Fassler (2006). "ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(1): 20-31.

Lehoux, S. and A. Tedgui (2003). "Cellular mechanics and gene expression in blood vessels." J Biomech **36**(5): 631-43.

Lele, M., M. Sajid, N. Wajih and G. A. Stouffer (2001). "Eptifibatide and 7E3, but not tirofiban, inhibit alpha(v)beta(3) integrin-mediated binding of smooth muscle cells to thrombospondin and prothrombin." Circulation **104**(5): 582-7.

Lerea, K. M., K. P. Cordero, K. S. Sakariassen, R. I. Kirk and V. A. Fried (1999). "Phosphorylation sites in the integrin beta3 cytoplasmic domain in intact platelets." J Biol Chem **274**(4): 1914-9.

Leroyer, A. S., H. Isobe, G. Leseche, Y. Castier, M. Wassef, Z. Mallat, B. R. Binder, A. Tedgui and C. M. Boulanger (2007). "Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques." J Am Coll Cardiol **49**(7): 772-7.

Li, C., Y. Hu, M. Mayr and Q. Xu (1999). "Cyclic strain stress-induced mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 expression in vascular smooth muscle cells is regulated by Ras/Rac-MAPK pathways." J Biol Chem **274**(36): 25273-80.

Li, D. Y., B. Brooke, E. C. Davis, R. P. Mecham, L. K. Sorensen, B. B. Boak, E. Eichwald and M. T. Keating (1998). "Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis." Nature **393**(6682): 276-80.

Li, W., Q. Chen, I. Mills and B. E. Sumpio (2003). "Involvement of S6 kinase and p38 mitogen activated protein kinase pathways in strain-induced alignment and proliferation of bovine aortic smooth muscle cells." J Cell Physiol **195**(2): 202-9.

Liddington, R. and L. Bankston (1998). "The integrin I domain: crystals, metals and related artefacts." Structure **6**(7): 937-8.

Liddington, R. C. and M. H. Ginsberg (2002). "Integrin activation takes shape." J Cell Biol **158**(5): 833-9.

Lien, S. C., S. Usami, S. Chien and J. J. Chiu (2006). "Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway is involved in transforming growth factor-beta1-induced phenotypic modulation of 10T1/2 cells to smooth muscle cells." Cell Signal **18**(8): 1270-8.

Lim, S. T., X. L. Chen, Y. Lim, D. A. Hanson, T. T. Vo, K. Howerton, N. Larocque, S. J. Fisher, D. D. Schlaepfer and D. Ilic (2008). "Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation." Mol Cell **29**(1): 9-22.

Lin, J., H. B. Davis, Q. Dai, Y. M. Chou, T. Craig, C. Hinojosa-Laborde and M. L. Lindsey (2008). "Effects of early and late chronic pressure overload on extracellular matrix remodeling." Hypertens Res **31**(6): 1225-31.

Lin, T. H., A. E. Aplin, Y. Shen, Q. Chen, M. Schaller, L. Romer, I. Aukhil and R. L. Juliano (1997). "Integrin-mediated activation of MAP kinase is independent of FAK: evidence for dual integrin signaling pathways in fibroblasts." J Cell Biol **136**(6): 1385-95.

Lip, G. Y. and F. L. Li-Saw-Hee (1998). "Does hypertension confer a hypercoagulable state?" J Hypertens **16**(7): 913-6.

Lipfert, L., B. Haimovich, M. D. Schaller, B. S. Cobb, J. T. Parsons and J. S. Brugge (1992). "Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein tyrosine kinase pp125FAK in platelets." J Cell Biol **119**(4): 905-12.

Liu, Z. P., Z. Wang, H. Yanagisawa and E. N. Olson (2005). "Phenotypic modulation of smooth muscle cells through interaction of Foxo4 and myocardin." Dev Cell **9**(2): 261-70.

Loukianov, E., T. Loukianova and M. Periasamy (1997). "Myosin heavy chain isoforms in smooth muscle." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **117**(1): 13-8.

Ma, Y. Q., J. Qin, C. Wu and E. F. Plow (2008). "Kindlin-2 (Mig-2): a co-activator of beta3 integrins." J Cell Biol **181**(3): 439-46.

Mainiero, F., C. Murgia, K. K. Wary, A. M. Curatola, A. Pepe, M. Blumemberg, J. K. Westwick, C. J. Der and F. G. Giancotti (1997). "The coupling of alpha6beta4 integrin to Ras-MAP kinase pathways mediated by Shc controls keratinocyte proliferation." Embo J **16**(9): 2365-75.

Mann, K. G., S. Butenas and K. Brummel (2003). "The dynamics of thrombin formation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(1): 17-25.

Maragoudakis, M. E. and N. E. Tsopanoglou (2000). "On the mechanism(s) of thrombin induced angiogenesis." Adv Exp Med Biol **476**: 47-55.

Martin, K., S. Weiss, P. Metharom, J. Schmeckpeper, B. Hynes, J. O'Sullivan and N. Caplice (2009). "Thrombin stimulates smooth muscle cell differentiation from peripheral blood mononuclear cells via protease-activated receptor-1, RhoA, and myocardin." Circ Res **105**(3): 214-8.

Martinez-Lemus, L. A., M. A. Hill, S. S. Bolz, U. Pohl and G. A. Meininger (2004). "Acute mechanoadaptation of vascular smooth muscle cells in response to continuous arteriolar vasoconstriction: implications for functional remodeling." Faseb J **18**(6): 708-10.

Martinez-Lemus, L. A., Z. Sun, A. Trache, J. P. Trzciakowski and G. A. Meininger (2005). "Integrins and regulation of the microcirculation: from arterioles to molecular studies using atomic force microscopy." Microcirculation **12**(1): 99-112.

Martinez-Lemus, L. A., X. Wu, E. Wilson, M. A. Hill, G. E. Davis, M. J. Davis and G. A. Meininger (2003). "Integrins as unique receptors for vascular control." J Vasc Res **40**(3): 211-33.

Mayr, M., Y. Hu, H. Hainaut and Q. Xu (2002). "Mechanical stress-induced DNA damage and rac-p38MAPK signal pathways mediate p53-dependent apoptosis in vascular smooth muscle cells." FASEB J **16**(11): 1423-5.

Mayr, M., C. Li, Y. Zou, U. Huemer, Y. Hu and Q. Xu (2000). "Biomechanical stress-induced apoptosis in vein grafts involves p38 mitogen-activated protein kinases." FASEB J **14**(2): 261-70.

Mayr, M. and Q. Xu (2001). "Smooth muscle cell apoptosis in arteriosclerosis." Exp Gerontol **36**(7): 969-87.

McNamara, C. A., I. J. Sarembock, L. W. Gimple, J. W. Fenton, 2nd, S. R. Coughlin and G. K. Owens (1993). "Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor." J Clin Invest **91**(1): 94-8.

Miano, J. M., P. Cserjesi, K. L. Ligon, M. Periasamy and E. N. Olson (1994). "Smooth muscle myosin heavy chain exclusively marks the smooth muscle lineage during mouse embryogenesis." Circ Res **75**(5): 803-12.

Miranti, C. K., L. Leng, P. Maschberger, J. S. Brugge and S. J. Shattil (1998). "Identification of a novel integrin signaling pathway involving the kinase Syk and the guanine nucleotide exchange factor Vav1." Curr Biol **8**(24): 1289-99.

Mitra, S. K., D. A. Hanson and D. D. Schlaepfer (2005). "Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(1): 56-68.

Mitra, S. K. and D. D. Schlaepfer (2006). "Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells." Curr Opin Cell Biol **18**(5): 516-23.

Monroe, D. M., M. Hoffman and H. R. Roberts (2002). "Platelets and thrombin generation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(9): 1381-9.

Montanez, E., S. Ussar, M. Schifferer, M. Bosl, R. Zent, M. Moser and R. Fassler (2008). "Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins." Genes Dev **22**(10): 1325-30.

Morgan, M. R., M. J. Humphries and M. D. Bass (2007). "Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(12): 957-69.

Moser, M., K. R. Legate, R. Zent and R. Fassler (2009). "The tail of integrins, talin, and kindlins." Science **324**(5929): 895-9.

Mulvany, M. J. (2002). "Small artery remodeling and significance in the development of hypertension." News Physiol Sci **17**: 105-9.

Naik, M. U. and U. P. Naik (2006). "Junctional adhesion molecule-A-induced endothelial cell migration on vitronectin is integrin alpha v beta 3 specific." J Cell Sci **119**(Pt 3): 490-9.

Newby, A. C. (2006). "Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates." Cardiovasc Res **69**(3): 614-24.

Newcomb, P. M. and I. M. Herman (1993). "Pericyte growth and contractile phenotype: modulation by endothelial-synthesized matrix and comparison with aortic smooth muscle." J Cell Physiol **155**(2): 385-93.

Nguyen, K. T., S. R. Frye, S. G. Eskin, C. Patterson, M. S. Runge and L. V. McIntire (2001). "Cyclic strain increases protease-activated receptor-1 expression in vascular smooth muscle cells." Hypertension **38**(5): 1038-43.

Niessen, P., S. Clement, L. Fontao, C. Chaponnier, B. Teunissen, S. Rensen, G. van Eys and G. Gabbiani (2004). "Biochemical evidence for interaction between smoothelin and filamentous actin." Exp Cell Res **292**(1): 170-8.

Nieswandt, B., D. Varga-Szabo and M. Elvers (2009). "Integrins in platelet activation." J Thromb Haemost **7 Suppl 1**: 206-9.

Okada, M., S. Nada, Y. Yamanashi, T. Yamamoto and H. Nakagawa (1991). "CSK: a protein-tyrosine kinase involved in regulation of src family kinases." J Biol Chem **266**(36): 24249-52.

Okada, M. and H. Nakagawa (1989). "A protein tyrosine kinase involved in regulation of pp60c-src function." J Biol Chem **264**(35): 20886-93.

Oltvai, Z. N., C. L. Milliman and S. J. Korsmeyer (1993). "Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death." Cell **74**(4): 609-19.

Ovanesov, M. V., N. M. Ananyeva, M. A. Panteleev, F. I. Ataullakhanov and E. L. Saenko (2005). "Initiation and propagation of coagulation from tissue factor-bearing cell monolayers to plasma: initiator cells do not regulate spatial growth rate." J Thromb Haemost **3**(2): 321-31.

Owens, G. K. (1995). "Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells." Physiol Rev **75**(3): 487-517.

Owens, G. K. (1996). "Role of mechanical strain in regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells." Circ Res **79**(5): 1054-5.

Parsons, J. T. and S. J. Parsons (1997). "Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways." Curr Opin Cell Biol **9**(2): 187-92.

Pathak, A., R. Zhao, D. M. Monroe, H. R. Roberts, B. C. Sheridan, C. H. Selzman and G. A. Stouffer (2006). "Thrombin generation in vascular tissue." J Thromb Haemost **4**(1): 60-7.

Patschinsky, T., T. Hunter, F. S. Esch, J. A. Cooper and B. M. Sefton (1982). "Analysis of the sequence of amino acids surrounding sites of tyrosine phosphorylation." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(4): 973-7.

Patterson, C., G. A. Stouffer, N. Madamanchi and M. S. Runge (2001). "New tricks for old dogs: nonthrombotic effects of thrombin in vessel wall biology." Circ Res **88**(10): 987-97.

Perlman, H., X. Zhang, M. W. Chen, K. Walsh and R. Buttyan (1999). "An elevated bax/bcl-2 ratio corresponds with the onset of prostate epithelial cell apoptosis." Cell Death Differ **6**(1): 48-54.

Persad, S., S. Attwell, V. Gray, N. Mawji, J. T. Deng, D. Leung, J. Yan, J. Sanghera, M. P. Walsh and S. Dedhar (2001). "Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343." J Biol Chem **276**(29): 27462-9.

Petrich, B. G., P. Fogelstrand, A. W. Partridge, N. Yousefi, A. J. Ablooglu, S. J. Shattil and M. H. Ginsberg (2007). "The antithrombotic potential of selective blockade of talin-dependent integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIb-IIIa) activation." J Clin Invest **117**(8): 2250-9.

Plow, E. F., T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus and J. W. Smith (2000). "Ligand binding to integrins." J Biol Chem **275**(29): 21785-8.

Popowicz, G. M., M. Schleicher, A. A. Noegel and T. A. Holak (2006). "Filamins: promiscuous organizers of the cytoskeleton." Trends Biochem Sci **31**(7): 411-9.

Pytela, R., M. D. Pierschbacher, M. H. Ginsberg, E. F. Plow and E. Ruoslahti (1986). "Platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa: member of a family of Arg-Gly-Asp--specific adhesion receptors." Science **231**(4745): 1559-62.

Qi, Y. X., M. J. Qu, Z. Q. Yan, D. Zhao, X. H. Jiang, B. R. Shen and Z. L. Jiang (2010). "Cyclic strain modulates migration and proliferation of vascular smooth muscle cells via Rho-GDIalpha, Rac1, and p38 pathway." J Cell Biochem **109**(5): 906-14.

Qian, Y., X. Zhong, D. C. Flynn, J. Z. Zheng, M. Qiao, C. Wu, S. Dedhar, X. Shi and B. H. Jiang (2005). "ILK mediates actin filament rearrangements and cell migration and invasion through PI3K/Akt/Rac1 signaling." Oncogene **24**(19): 3154-65.

Qiu, H., Y. Zhu, Z. Sun, J. P. Trzeciakowski, M. Gansner, C. Depre, R. R. Resuello, F. F. Natividad, W. C. Hunter, G. M. Genin, E. L. Elson, D. E. Vatner, G. A. Meininger and S. F. Vatner (2010). "Short communication: vascular smooth muscle cell stiffness as a mechanism for increased aortic stiffness with aging." Circ Res **107**(5): 615-9.

Qu, M. J., B. Liu, H. Q. Wang, Z. Q. Yan, B. R. Shen and Z. L. Jiang (2007). "Frequency-dependent phenotype modulation of vascular smooth muscle cells under cyclic mechanical strain." J Vasc Res **44**(5): 345-53.

Rane, M. J., P. Y. Coxon, D. W. Powell, R. Webster, J. B. Klein, W. Pierce, P. Ping and K. R. McLeish (2001). "p38 Kinase-dependent MAPKAPK-2 activation functions as 3-phosphoinositide-dependent kinase-2 for Akt in human neutrophils." J Biol Chem **276**(5): 3517-23.

Rao, G. N., P. Delafontaine and M. S. Runge (1995). "Thrombin stimulates phosphorylation of insulin-like growth factor-1 receptor, insulin receptor substrate-1, and phospholipase C-gamma 1 in rat aortic smooth muscle cells." J Biol Chem **270**(46): 27871-5.

Rao, G. N. and M. S. Runge (1996). "Cyclic AMP inhibition of thrombin-induced growth in vascular smooth muscle cells correlates with decreased JNK1 activity and c-Jun expression." J Biol Chem **271**(34): 20805-10.

Raymond, K., M. Kreft, J. Y. Song, H. Janssen and A. Sonnenberg (2007). "Dual Role of alpha6beta4 integrin in epidermal tumor growth: tumor-suppressive versus tumor-promoting function." Mol Biol Cell **18**(11): 4210-21.

Regan, C. P., P. J. Adam, C. S. Madsen and G. K. Owens (2000). "Molecular mechanisms of decreased smooth muscle differentiation marker expression after vascular injury." J Clin Invest **106**(9): 1139-47.

Regnault, V., C. Perret-Guillaume, A. Kearney-Schwartz, J. P. Max, C. Labat, H. Louis, D. Wahl, B. Pannier, T. Lecompte, G. Weryha, P. Challande, M. E. Safar, A. Benetos and P. Lacolley (2011). "Tissue factor pathway inhibitor: a new link among arterial stiffness, pulse pressure, and coagulation in postmenopausal women." Arterioscler Thromb Vasc Biol **31**(5): 1226-32.

Resendiz, J. C., M. H. Kroll and R. Lassila (2007). "Protease-activated receptor-induced Akt activation--regulation and possible function." J Thromb Haemost **5**(12): 2484-93.

Reusch, H. P., G. Chan, H. E. Ives and R. A. Nemenoff (1997). "Activation of JNK/SAPK and ERK by mechanical strain in vascular smooth muscle cells depends on extracellular matrix composition." Biochem Biophys Res Commun **237**(2): 239-44.

Reusch, P., H. Wagdy, R. Reusch, E. Wilson and H. E. Ives (1996). "Mechanical strain increases smooth muscle and decreases nonmuscle myosin expression in rat vascular smooth muscle cells." Circ Res **79**(5): 1046-53.

Ricupero, D. A., C. F. Poliks, D. C. Rishikof, K. A. Cuttle, P. P. Kuang and R. H. Goldstein (2001). "Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent stabilization of alpha1(I) collagen mRNA in human lung fibroblasts." Am J Physiol Cell Physiol **281**(1): C99-C105.

Roca-Cusachs, P., N. C. Gauthier, A. Del Rio and M. P. Sheetz (2009). "Clustering of alpha(5)beta(1) integrins determines adhesion strength whereas alpha(v)beta(3) and talin enable mechanotransduction." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(38): 16245-50.

Rodgers, G. M., C. S. Greenberg and M. A. Shuman (1983). "Characterization of the effects of cultured vascular cells on the activation of blood coagulation." Blood **61**(6): 1155-62.

Romer, L. H., K. G. Birukov and J. G. Garcia (2006). "Focal adhesions: paradigm for a signaling nexus." Circ Res **98**(5): 606-16.

Rosales, O. R., C. M. Isales, P. Q. Barrett, C. Brophy and B. E. Sumpio (1997). "Exposure of endothelial cells to cyclic strain induces elevations of cytosolic Ca2+ concentration through mobilization of intracellular and extracellular pools." Biochem J **326 (Pt 2)**: 385-92.

Rottner, K., A. Hall and J. V. Small (1999). "Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics." Curr Biol **9**(12): 640-8.

Runyan, C. E., H. W. Schnaper and A. C. Poncelet (2004). "The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway enhances Smad3-stimulated mesangial cell collagen I expression in response to transforming growth factor-beta1." J Biol Chem **279**(4): 2632-9.

Sajid, M. and G. A. Stouffer (2002). "The role of alpha(v)beta3 integrins in vascular healing." Thromb Haemost **87**(2): 187-93.

Sajid, M., R. Zhao, A. Pathak, S. S. Smyth and G. A. Stouffer (2003). "Alphavbeta3-integrin antagonists inhibit thrombin-induced proliferation and focal adhesion formation in smooth muscle cells." Am J Physiol Cell Physiol **285**(5): C1330-8.

Sappino, A. P., I. Masouye, J. H. Saurat and G. Gabbiani (1990). "Smooth muscle differentiation in scleroderma fibroblastic cells." Am J Pathol **137**(3): 585-91.

Savage, B., E. Bottini and Z. M. Ruggeri (1995). "Interaction of integrin alpha IIb beta 3 with multiple fibrinogen domains during platelet adhesion." J Biol Chem **270**(48): 28812-7.

Schaller, M. D. (2001). "Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase." Biochim Biophys Acta **1540**(1): 1-21.

Schaller, M. D., C. A. Otey, J. D. Hildebrand and J. T. Parsons (1995). "Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains." J Cell Biol **130**(5): 1181-7.

Scharffetter-Kochanek, K., H. Lu, K. Norman, N. van Nood, F. Munoz, S. Grabbe, M. McArthur, I. Lorenzo, S. Kaplan, K. Ley, C. W. Smith, C. A. Montgomery, S. Rich and A. L. Beaudet (1998). "Spontaneous skin ulceration and defective T cell function in CD18 null mice." J Exp Med **188**(1): 119-31.

Schlaepfer, D. D. and T. Hunter (1998). "Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs?" Trends Cell Biol **8**(4): 151-7.

Schlaepfer, D. D., S. K. Mitra and D. Ilic (2004). "Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase." Biochim Biophys Acta **1692**(2-3): 77-102.

Sedding, D. G., J. Hermsen, U. Seay, O. Eickelberg, W. Kummer, C. Schwencke, R. H. Strasser, H. Tillmanns and R. C. Braun-Dullaeus (2005). "Caveolin-1 facilitates mechanosensitive protein kinase B (Akt) signaling in vitro and in vivo." Circ Res **96**(6): 635-42.

Sedding, D. G., U. Seay, L. Fink, M. Heil, W. Kummer, H. Tillmanns and R. C. Braun-Dullaeus (2003). "Mechanosensitive p27Kip1 regulation and cell cycle entry in vascular smooth muscle cells." Circulation **108**(5): 616-22.

Shattil, S. J. (1999). "Signaling through platelet integrin alpha IIb beta 3: inside-out, outside-in, and sideways." Thromb Haemost **82**(2): 318-25.

Shaw, A. and Q. Xu (2003). "Biomechanical stress-induced signaling in smooth muscle cells: an update." Curr Vasc Pharmacol **1**(1): 41-58.

Shaw, S. K., K. L. Cepek, E. A. Murphy, G. J. Russell, M. B. Brenner and C. M. Parker (1994). "Molecular cloning of the human mucosal lymphocyte integrin alpha E subunit. Unusual structure and restricted RNA distribution." J Biol Chem **269**(8): 6016-25.

Shiojima, I. and K. Walsh (2002). "Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis." Circ Res **90**(12): 1243-50.

Shroff, H., C. G. Galbraith, J. A. Galbraith, H. White, J. Gillette, S. Olenych, M. W. Davidson and E. Betzig (2007). "Dual-color superresolution imaging of genetically expressed probes within individual adhesion complexes." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(51): 20308-13.

Simon, K. O., E. M. Nutt, D. G. Abraham, G. A. Rodan and L. T. Duong (1997). "The alphavbeta3 integrin regulates alpha5beta1-mediated cell migration toward fibronectin." J Biol Chem **272**(46): 29380-9.

Sjoblom, B., A. Salmazo and K. Djinovic-Carugo (2008). "Alpha-actinin structure and regulation." Cell Mol Life Sci **65**(17): 2688-701.

Slepian, M. J., S. P. Massia, B. Dehdashti, A. Fritz and L. Whitesell (1998). "Beta3-integrins rather than beta1-integrins dominate integrin-matrix interactions involved in postinjury smooth muscle cell migration." Circulation **97**(18): 1818-27.

Smith, M. L., D. Gourdon, W. C. Little, K. E. Kubow, R. A. Eguiluz, S. Luna-Morris and V. Vogel (2007). "Force-induced unfolding of fibronectin in the extracellular matrix of living cells." PLoS Biol **5**(10): e268.

Sobue, K. and J. R. Sellers (1991). "Caldesmon, a novel regulatory protein in smooth muscle and nonmuscle actomyosin systems." J Biol Chem **266**(19): 12115-8.

Somanath, P. R., E. S. Kandel, N. Hay and T. V. Byzova (2007). "Akt1 signaling regulates integrin activation, matrix recognition, and fibronectin assembly." J Biol Chem **282**(31): 22964-76.

Somanath, P. R., O. V. Razorenova, J. Chen and T. V. Byzova (2006). "Akt1 in endothelial cell and angiogenesis." Cell Cycle **5**(5): 512-8.

Standley, P. R., T. J. Obards and C. L. Martina (1999). "Cyclic stretch regulates autocrine IGF-I in vascular smooth muscle cells: implications in vascular hyperplasia." Am J Physiol **276**(4 Pt 1): E697-705.

Stephens, L. E., A. E. Sutherland, I. V. Klimanskaya, A. Andrieux, J. Meneses, R. A. Pedersen and C. H. Damsky (1995). "Deletion of beta 1 integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality." Genes Dev **9**(15): 1883-95.

Stouffer, G. A. and S. S. Smyth (2003). "Effects of thrombin on interactions between beta3-integrins and extracellular matrix in platelets and vascular cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(11): 1971-8.

Su, B. Y., K. M. Shontz, N. A. Flavahan and P. T. Nowicki (2006). "The effect of phenotype on mechanical stretch-induced vascular smooth muscle cell apoptosis." J Vasc Res **43**(3): 229-37.

Su, X., J. Mi, J. Yan, P. Flevaris, Y. Lu, H. Liu, Z. Ruan, X. Wang, N. Kieffer, S. Chen, X. Du and X. Xi (2008). "RGT, a synthetic peptide corresponding to the integrin beta 3 cytoplasmic C-terminal sequence, selectively inhibits outside-in signaling in human platelets by disrupting the interaction of integrin alpha IIb beta 3 with Src kinase." Blood **112**(3): 592-602.

Subbaiah, P. V., S. S. Bajwa, C. M. Smith and D. J. Hanahan (1976). "Interactions of the components of the prothrombinase complex." Biochim Biophys Acta **444**(1): 131-46.

Sudhir, K., E. Wilson, K. Chatterjee and H. E. Ives (1993). "Mechanical strain and collagen potentiate mitogenic activity of angiotensin II in rat vascular smooth muscle cells." J Clin Invest **92**(6): 3003-7.

Sueishi, K., K. Ichikawa, K. Nakagawa, K. Kato, Y. A. Elsayed and M. Namoto (1995). "Procoagulant properties of atherosclerotic aortas." Ann N Y Acad Sci **748**: 185-92; discussion 192-3.

Tadokoro, S., S. J. Shattil, K. Eto, V. Tai, R. C. Liddington, J. M. de Pereda, M. H. Ginsberg and D. A. Calderwood (2003). "Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation." Science **302**(5642): 103-6.

Takada, Y., M. J. Elices, C. Crouse and M. E. Hemler (1989). "The primary structure of the alpha 4 subunit of VLA-4: homology to other integrins and a possible cell-cell adhesion function." Embo J **8**(5): 1361-8.

Takagi, J. and T. A. Springer (2002). "Integrin activation and structural rearrangement." Immunol Rev **186**: 141-63.

Takahashi, T., K. Suzuki, H. Ihara, H. Mogami, T. Kazui and T. Urano (2005). "Plasminogen activator inhibitor type 1 promotes fibrosarcoma cell migration by modifying cellular attachment to vitronectin via alpha(v)beta(5) integrin." Semin Thromb Hemost **31**(3): 356-63.

Taubman, M. B. (1993). "Tissue factor regulation in vascular smooth muscle: a summary of studies performed using in vivo and in vitro models." Am J Cardiol **72**(8): 55C-60C.

Toker, A. and A. C. Newton (2000). "Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site." J Biol Chem **275**(12): 8271-4.

Tokunou, T., T. Ichiki, K. Takeda, Y. Funakoshi, N. Iino, H. Shimokawa, K. Egashira and A. Takeshita (2001). "Thrombin induces interleukin-6 expression through the cAMP response element in vascular smooth muscle cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(11): 1759-63.

Topol, E. J., T. V. Byzova and E. F. Plow (1999). "Platelet GPIIb-IIIa blockers." Lancet **353**(9148): 227-31.

Tranqui, L. and M. R. Block (1995). "Intracellular processing of talin occurs within focal adhesions." Exp Cell Res **217**(1): 149-56.

Tucker, K. L., T. Sage, J. M. Stevens, P. A. Jordan, S. Jones, N. E. Barrett, R. St-Arnaud, J. Frampton, S. Dedhar and J. M. Gibbins (2008). "A dual role for integrin-linked kinase in platelets: regulating integrin function and alpha-granule secretion." Blood **112**(12): 4523-31.

Ussar, S., M. Moser, M. Widmaier, E. Rognoni, C. Harrer, O. Genzel-Boroviczeny and R. Fassler (2008). "Loss of Kindlin-1 causes skin atrophy and lethal neonatal intestinal epithelial dysfunction." PLoS Genet **4**(12): e1000289.

van der Loop, F. T., G. Schaart, E. D. Timmer, F. C. Ramaekers and G. J. van Eys (1996). "Smoothelin, a novel cytoskeletal protein specific for smooth muscle cells." J Cell Biol **134**(2): 401-11.

Vanhoutte, P. M., C. M. Boulanger and J. V. Mombouli (1995). "Endothelium-derived relaxing factors and converting enzyme inhibition." Am J Cardiol **76**(15): 3E-12E.

Vidwan, P., A. Pathak, S. Sheth, J. Huang, D. M. Monroe and G. A. Stouffer (2010). "Activation of protease-activated receptors 3 and 4 accelerates tissue factor-induced thrombin generation on the surface of vascular smooth muscle cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(12): 2587-96.

Vinogradova, O., A. Velyvis, A. Velyviene, B. Hu, T. Haas, E. Plow and J. Qin (2002). "A structural mechanism of integrin alpha(IIb)beta(3) "inside-out" activation as regulated by its cytoplasmic face." Cell **110**(5): 587-97.

Vlahopoulos, S. and V. C. Zoumpourlis (2004). "JNK: a key modulator of intracellular signaling." Biochemistry (Mosc) **69**(8): 844-54.

Vogel, V. (2006). "Mechanotransduction involving multimodular proteins: converting force into biochemical signals." Annu Rev Biophys Biomol Struct **35**: 459-88.

von Offenberg Sweeney, N., P. M. Cummins, Y. A. Birney, E. M. Redmond and P. A. Cahill (2004). "Cyclic strain-induced endothelial MMP-2: role in vascular smooth muscle cell migration." Biochem Biophys Res Commun **320**(2): 325-33.

Vu, T. K., D. T. Hung, V. I. Wheaton and S. R. Coughlin (1991). "Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation." Cell **64**(6): 1057-68.

Wary, K. K., F. Mainiero, S. J. Isakoff, E. E. Marcantonio and F. G. Giancotti (1996). "The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression." Cell **87**(4): 733-43.

Wary, K. K., A. Mariotti, C. Zurzolo and F. G. Giancotti (1998). "A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth." Cell **94**(5): 625-34.

Wernig, F., M. Mayr and Q. Xu (2003). "Mechanical stretch-induced apoptosis in smooth muscle cells is mediated by beta1-integrin signaling pathways." Hypertension **41**(4): 903-11.

Wilson, E., Q. Mai, K. Sudhir, R. H. Weiss and H. E. Ives (1993). "Mechanical strain induces growth of vascular smooth muscle cells via autocrine action of PDGF." J Cell Biol **123**(3): 741-7.

Wilson, E., K. Sudhir and H. E. Ives (1995). "Mechanical strain of rat vascular smooth muscle cells is sensed by specific extracellular matrix/integrin interactions." J Clin Invest **96**(5): 2364-72.

Wilson, R. W., C. M. Ballantyne, C. W. Smith, C. Montgomery, A. Bradley, W. E. O'Brien and A. L. Beaudet (1993). "Gene targeting yields a CD18-mutant mouse for study of inflammation." J Immunol **151**(3): 1571-8.

Woessner, J. F., Jr. (1991). "Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling." Faseb J **5**(8): 2145-54.

Woessner, J. F., Jr. and Z. Gunja-Smith (1991). "Role of metalloproteinases in human osteoarthritis." J Rheumatol Suppl **27**: 99-101.

Woodcock-Mitchell, J., J. J. Mitchell, R. B. Low, M. Kieny, P. Sengel, L. Rubbia, O. Skalli, B. Jackson and G. Gabbiani (1988). "Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed in embryonic rat cardiac and skeletal muscles." Differentiation **39**(3): 161-6.

Wozniak, M. A. and C. S. Chen (2009). "Mechanotransduction in development: a growing role for contractility." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(1): 34-43.

Wu, X., G. E. Davis, G. A. Meininger, E. Wilson and M. J. Davis (2001). "Regulation of the L-type calcium channel by alpha 5beta 1 integrin requires signaling between focal adhesion proteins." J Biol Chem **276**(32): 30285-92.

Xi, X., R. J. Bodnar, Z. Li, S. C. Lam and X. Du (2003). "Critical roles for the COOH-terminal NITY and RGT sequences of the integrin beta3 cytoplasmic domain in inside-out and outside-in signaling." J Cell Biol **162**(2): 329-39.

Xiong, J. P., T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman and M. A. Arnaout (2002). "Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand." Science **296**(5565): 151-5.

Yamada, K. M. (1991). "Adhesive recognition sequences." J Biol Chem **266**(20): 12809-12.

Yamada, K. M. and S. Miyamoto (1995). "Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control." Curr Opin Cell Biol **7**(5): 681-9.

Yan, B., D. A. Calderwood, B. Yaspan and M. H. Ginsberg (2001). "Calpain cleavage promotes talin binding to the beta 3 integrin cytoplasmic domain." J Biol Chem **276**(30): 28164-70.

Yang, Z. Z., O. Tschopp, A. Baudry, B. Dummler, D. Hynx and B. A. Hemmings (2004). "Physiological functions of protein kinase B/Akt." Biochem Soc Trans **32**(Pt 2): 350-4.

Zaidel-Bar, R., S. Itzkovitz, A. Ma'ayan, R. Iyengar and B. Geiger (2007). "Functional atlas of the integrin adhesome." Nat Cell Biol **9**(8): 858-67.

Zhou, D., D. J. Herrick, J. Rosenbloom and B. Chaqour (2005). "Cyr61 mediates the expression of VEGF, alphav-integrin, and alpha-actin genes through cytoskeletally based mechanotransduction mechanisms in bladder smooth muscle cells." J Appl Physiol **98**(6): 2344-54.

Zhu, J., C. V. Carman, M. Kim, M. Shimaoka, T. A. Springer and B. H. Luo (2007). "Requirement of alpha and beta subunit transmembrane helix separation for integrin outside-in signaling." Blood **110**(7): 2475-83.

Ziegler, W. H., A. R. Gingras, D. R. Critchley and J. Emsley (2008). "Integrin connections to the cytoskeleton through talin and vinculin." Biochem Soc Trans **36**(Pt 2): 235-9.

Zucker, S., C. Conner, B. I. DiMassmo, H. Ende, M. Drews, M. Seiki and W. F. Bahou (1995). "Thrombin induces the activation of progelatinase A in vascular endothelial cells. Physiologic regulation of angiogenesis." J Biol Chem **270**(40): 23730-8.

X. Annexe

Liste des anticorps utilisés pour Western blot

Tableau 7 : Listes des anticorps utilisés en Western blot

.

Anticorps	Fournisseur (réf.)	Source	Dilution
Anti-myosine	BT-562	lapin	1/100
Anti-α-actine	A5228	souris	1/4000
Anti-caldesmone	Sc-15374	lapin	1/500
Anti-smootheline	Sc-28562	lapin	1/500
Anti-α-tubuline	T-5168	souris	1/2000
Anti-intégrine α1	Sc-10728	lapin	1/500
Anti-intégrine α5	AB1928	lapin	1/1000
Anti-intégrine αv	AB1930	lapin	1/1000
Anti-intégrine β1	AB1952	lapin	1/1000
Anti-intégrine β3	AB1932	lapin	1/1000
Anti-FAK	9272	lapin	1/1000
Anti-phospho-FAK (Tyr576/577)	3281S	lapin	1/1000
Anti-AKT	9272	lapin	1/1000
Anti-phospho-AKT(Thr308)	4056L	lapin	1/1000
Anti-p42/44MAPK	9102	lapin	1/1000
Anti-phospho-p42/p44MAPK(Thr202/Tyr204)	4377S	lapin	1/1000
Anti- p38MAPK	9212	lapin	1/1000

Anti- phospho-P38MAPK(Thr180/Tyr182)	9215	lapin	1/1000
Anti-ILK	04-1149	lapin	1/10,000
Anti-phospho-ILK(Thr173)	Sc-130196	lapin	1/500
Anti-Src	Ab16885	souris	1/40
Anti-phospho-Src(PY418)	44660G	lapin	1/1000
Anti-taline	T3287	souris	1/200
Anti-caspase3	9662	lapin	1/1000
Anti-Bax	Sc-493	lapin	1/500
Anti-Bcl2	Sc-7382	souris	1/500
anti-mouse IgG-HRP conjugate	GE (réf.372046)	chèvre	1/2000
anti-rabbit IgG-HRP conjugate	GE (réf.371624)	chèvre	1/2000

Tableau 8 : Amorces utilisée en PCR en temps réel.

Gènes ciblés	Amorces (S : sens ; AS : Anti Sens)
GAPDH	AS :5’ TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA 3’; S :5’ AGA TCC ACA ACG GAT ACA TT 3’
MHC	AS :5’ CTT TGT TCA CAC GGC TGA GA 3’; S :5’ GAT GTG GTG CAG AAA GCT CA 3’
SMA	AS :5’ GAA GGA ATA GCC ACG CTC AG 3’; S :5’ TGT GCT GGA CTC TGG AGA TG 3’
Smootheline	AS : 5’ GCC AAA GCC TCA GGG AAG AA 3’; S : 5’ TCA AGC AGA TGT TGC TGG AC 3’
Sous-unité αv des intégrines	AS : 5’ GCG GAT GAC TTC AGG GAA TA 3’; S : 5’ AAC TGC TCA GTG CTT GCA GA 3’
Sous-unité α1 des intégrines	AS : 5’ GGT AGG AGC GAG ACA TTC AC 3’; S :5’ AGA GGC ACA ATC CAG GAC TG 3’
Sous-unité α5 des intégrines	AS : 5’ GGT CAT CTA GCC CAT CTC CA 3’; S :5’ ATG GCT CAG ACA TCC ACT CC 3’
Sous-unité β1 des intégrines	AS : 5’ GTG AAG CCC AGA GGT TT 3’; S :5’ GGA CAG GAG AAA ATG GAC GA 3’
Sous-unité β3 des intégrines	AS : 5’ AGA CAA TGC CTG CCA GCC T 3’; S :5’ CCA CTG ATG CCA AGA CCC ATA 3’

XI. Liste des figures

Figure 1 : Structure de la paroi artérielle. 7
Figure 2 : Contraintes mécaniques sur la paroi artérielle. 8
Figure 3 : Différenciation et croissance des CML induit par l'étirement. 10
Figure 4 : Structure des actines G et F. 12
Figure 5 : Structure de la myosine. 14
Figure 6 : Mécanisme général de l'apoptose induite par les contraintes mécaniques. 16
Figure 7 : Ratio Bax/Bcl2. 17
Figure 8 : Implication de l'intégrine β3 dans l'apoptose induite par les Ox-LDL. 18
Figure 9 : Réponse des CML à la pression transmurale. 19
Figure 10 : Implication de l'élastine dans la rigidité artérielle. 20
Figure 11 : Réorganisation du cytosquelette *via* les intégrines. 22
Figure 12 : Régulation de l'activité des MMPs. 23
Figure 13 : Cascade de la coagulation. 24
Figure 14 : Rupture de plaque et la formation des emboles. 26
Figure 15 : Diversité de la signalisation de thrombine et ses effets physiologiques dans les cellules vasculaires. 27
Figure 16 : Effets de la thrombine sur les CML par PAR1 en état physiologique. 28
Figure 17 : Classification des intégrines. 29
Figure 18 : Structures repliée et étendue de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. 31
Figure 19 : Réarrangements structuraux dans l'activation des intégrines. 32
Figure 20 : Modèle général de l'adhésion cellule-MEC. 37
Figure 21 : Interaction du cytosquelette d'actine avec l'adhésion focale. 38
Figure 22 : Changement de conformation de la FN. 39
Figure 23 : Structure de la taline. 40
Figure 24 : Activation des intégrines par la taline. 41
Figure 25 : Structure de la kindline. 42
Figure 26 : Coopération entre la taline et la kindline lors de l'activation des intégrines. 43
Figure 27 : Activation de la vinculine et des molécules d'adhésion focale. 44
Figure 28 : Activation de la vinculine par la taline dans la signalisation « outside-in ». 44
Figure 29 : FAK et ses protéines conjuguées. 45
Figure 30 : Activation de FAK. 46
Figure 31 : Signalisation de FAK. 47
Figure 32 : Structure et régulation de Src. 48
Figure 33 : Voie Src-FAK dans les fibroblastes. 49
Figure 34 : Interaction de Src avec les sous-unités β des intégrines. 49

Figure 35 : Voie générale des MAPK et les réponses cellulaires. 50
Figure 36 : Modèle hypothétique de régulation de la voie intégrine-ERK. 52
Figure 37 : Structure de la famille AKT/PKB. 54
Figure 38 : Mécanisme d'activation d'AKT. 55
Figure 39 : Signalisation d'AKT dans les CE. 55
Figure 40 : Implication d'ILK dans l'activation des intégrines. 57
Figure 41 : Structure de la VN. 64
Figure 42 : Fibronectine et son interaction avec les intégrines. 65
Figure 43 : Structure de la prothrombine (FII). 66
Figure 44 : Schéma de la génération de thrombine. 67
Figure 45 : Implication de la thrombine dans la cascade de coagulation. 70
Figure 46 : Multifonctions de la thrombine. 71
Figure 47 : Modèle du Flexcell. 78
Figure 48 : Efficacité d'inhibition des siRNA utilisé 80
Figure 49 : Protocole pour une étude en thrombinographie pour les CML du rat en suspension. 81
Figure 50 : Paramètres du thrombinogramme 82
Figure 51 : Génération de thrombine par les CML de rat et humaine. 83
Figure 52 : Protocole de mesure de l'activité procoagulante des phospholipides. 84
Figure 53 : Schéma de montage du transfert des protéines du gel sur la membrane. 86
Figure 54 : Exemple de la mesure de double marquage Annexin V-PI en cytométrie de flux. 88
Figure 55 : Effet de l'étirement cyclique sur l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. 91
Figure 56 : Effet de l'étirement cyclique sur l'expression des sous unités α_1, α_5 et β_1 des intégrines. 92
Figure 57 : Effet de l'étirement cyclique sur l'expression des ARNs des sous-unités αv et β3 des intégrines par le qPCR. 93
Figure 58 : Effet de l'étirement cyclique sur l'expression protéique des sous-unités α_v et β_3 des intégrines. 94
Figure 59 : Effet de l'étirement cyclique sur l'expression des ARN. 95
Figure 60 : Effet de l'étirement cyclique sur l'expression protéique. 96
Figure 61 : Expression de l'α-SMA (en vert) dans les CML de rat. 97
Figure 62 : Analyse par Q-PCR de l'expression des marqueurs de différenciation. 98
Figure 63 : Analyse de l'expression par Western blot. 99
Figure 64 : Mesure de l'apoptose des CML. 99
Figure 65 : Effet de l'étirement sur l'apoptose des CML. 100

Figure 66 : Clivage de la caspase-3 en réponse à l'étirement. 101
Figure 67 : Expression relative de Bax/ Bcl2 en réponse à l'étirement. 102
Figure 68 : Phosphorylation de p38 en T180/T182 en réponse à l'étirement. 103
Figure 69 : Effet de l'étirement sur la phosphorylation d'ERK1/2 en Y202/Y204. 104
Figure 70 : Effet de l'étirement cyclique sur la phosphorylation de Src en Y418. 105
Figure 71 : Effet de l'étirement cyclique sur la phosphorylation de FAK en Y576/577. 106
Figure 72 : Effet de l'étirement cyclique sur la phosphorylation d'AKT en Thr 308. 107
Figure 73 : Effet de l'étirement cyclique sur le clivage de la taline..... 108
Figure 74 : Effet de l'étirement cyclique sur la phosphorylation de l'ILK en Thr 173. 109
Figure 75 : Effet de l'étirement sur l'adhésion des CML de rat à la prothrombine. 110
Figure 76 : Effet de l'étirement cyclique sur le PPA. 111
Figure 77 : Effet de l'étirement cyclique sur l'ETP : (A) Thrombinogrammes ; (B) ETP. ... 112
Figure 78 : Effets des peptides RGD et cRGDPV sur la génération de thrombine par les CML. 114
Figure 79 : Effets de siARN ciblé d'αv sur la génération de thrombine par les CML..... 115
Figure 80 : Effet du peptide antagonist cRGDPV, du siARN α_v et α_5 sur l'expression de la sous-unité α_v en réponse à l'étirement cyclique. 117
Figure 81 : Effet du peptide antagonist cRGDPV, du siARN α_v et α_5 sur l'adhésion des CML à la prothrombine en réponse à l'étirement cyclique. 118
Figure 82 : Effet des différents peptides et siARN$_S$ sur l'ETP aux CML en réponse à l'étirement cyclique. 120
Figure 83 : Effet du peptide antagonist cRGDPV, du siARN αv et α5 sur la phosphorylation de Src en Y418. 122
Figure 84 : Effet du peptide antagonist cRGDPV, du siARN α_v et α_5 sur la phosphorylation de FAK en Y576/577. 123
Figure 85 : Effet du peptide antagonist cRGDPV, du siARN α_v et α_5 sur la phosphorylation d'AKT en Thr308. 125
Figure 86 : Effet du peptide antagonist cRGDPV, du siARN α_v et α_5 sur le clivage de la taline. 126
Figure 87 : Effet du peptide antagonist cRGDPV, du siARN α_v et α_5 sur la phosphorylation d'ILK en Thr173. 128
Figure 88 : Effet de siARN ILK sur l'expression de l'αv. 129
Figure 89 : Effet de siARN ILK sur la phosphorylation de Src en Y418. 130
Figure 90 : Effet de siARN ILK sur la phosphorylation de FAK en Y576/577. 131
Figure 91 : Effet de siARN ILK sur la phosphorylation d'AKT en Thr308. 132

Figure 92 : Effet de siARN ILK sur le clivage de la taline. 133
Figure 93 : Effet de siARN taline sur l'expression de l'α_v. 134
Figure 94 : Effet de siARN taline sur la phosphorylation de Src en Y418. 135
Figure 95 : Effet de siARN taline sur la phosphorylation de FAK en Y576/577. 136
Figure 96 : Effet de siARN taline sur la phosphorylation d'AKT en Thr308. 137
Figure 97 : Effet de siARN taline sur la phosphorylation d'ILK en Thr173. 138
Figure 98 : Représentation schématique du « flip-flop » membranaire. 142
Figure 99 : Dimer de la taline et son activation. 145
Figure 100 : Effet d'inhibition du peptide RGT myristolé sur la génération de thrombine *via* la voie intégrine β_3-Src. 147
Figure 101 : Implication de la voie de signalisation d'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans l'augementation de la génération de thrombine induite par l'étirement cyclique. 148
Figure 102 : Initiation et le development des lésions d'athérosclérose. 150

XII. Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification et fonctions des intégrines. 35
Tableau 2 : Protéines impliquées dans la dynamique du cytosquelette d'actine 59
Tableau 3 : Protéines de la signalisation vers le cytosquelette d'actine 60
Tableau 4 : Association des intégrines à des molécules non matricielles 61
Tableau 5 : Ligands pour la sous-unité β_3 des intégrines impliquées dans l'hémostase et la pathologie vasculaire. 68
Tableau 6 : Pourcentage d'inhibition en ARN et protéine des siRNA 80
Tableau 7 : Listes des anticorps utilisés en Western blot 182
Tableau 8 : Amorces utilisée en PCR en temps réel. 184

XIII. Articles et communications

Dossier - Aldostérone, cœur et vaisseaux

mt cardio 2008 ; 4 (3) : 188-93

Aldostérone, dysfonction endothéliale et maladies cardiovasculaires

Patrick Lacolley[1,3], Xianqing Mao[1,3], Rose Said[2,3], Simon N. Thornton[1,3], Véronique Regnault[2,3]

[1] INSERM, U684, Nancy, France
[2] INSERM, U734, Nancy, France
[3] Université Henri-Poincaré, Nancy, France
<patrick.lacolley@nancy.inserm.fr>

Résumé. Les séquences physiopathologiques expliquant l'action bénéfique des traitements anti-aldostérone ne sont pas connues. La présence des récepteurs aux minéralocorticoïdes à la fois dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses suggère fortement une action locale de l'aldostérone dans le système vasculaire. L'administration d'antagonistes des récepteurs aux minéralocorticoïdes est capable de prévenir la fibrose cardiaque indépendamment du degré d'hypertrophie ventriculaire gauche et des changements de pression artérielle. L'aldostérone augmente les marqueurs du stress oxydant et cet effet est réversible en réponse aux antagonistes des récepteurs. Une augmentation de la libération de NO a été démontrée lors des traitements anti-aldostérone. Le rôle du NO sur la fonction artérielle, l'inflammation et la coagulation est probablement essentiel dans l'action du traitement anti-aldostérone en pathologie cardiovasculaire.

Mots clés : aldostérone, fonction endothéliale, rigidité artérielle, hypertension, insuffisance cardiaque, stress oxydant, génération de thrombine

Abstract. Aldosterone, endothelium dysfunction and cardiovascular diseases Although many actions induced by aldosterone treatment have been published there is no precise detail as to the sequence, and possible mechanism, of these events. The presence of mineralocorticoid receptors in smooth muscle cells and in endothelial cells provides strong evidence for a local action of aldosterone in large and small vessels. The aldosterone receptor antagonists eplerenone and spironolactone have been shown to prevent cardiac fibrosis independently of left ventricular hypertrophy and blood pressure reduction. Aldosterone has been shown to increase reactive oxygen species and mineralocorticoid receptor blockade decreases oxidative stress in the vascular system. Related to this, an increase in NO release from the endothelium has been demonstrated with aldosterone treatment. The actual role of NO on arterial function, inflammation and coagulation in the action of anti-aldosterone treatments remains to be determined clearly.

Key words: aldosterone, endothelial function, arterial stiffness, hypertension, heart failure, oxidative stress, thrombin generation

L'aldostérone est l'effecteur final du système rénine-angiotensine-aldostérone. L'organe cible classiquement décrit pour cette hormone minéralocorticoïde est le tubule contourné distal du rein où elle interagit avec un récepteur spécifique, le récepteur aux minéralocorticoïdes (MR). Elle participe ainsi à l'homéostasie hydrosodée et à la régulation de la pression artérielle. Un nombre croissant d'études tant fondamentales que cliniques suggère que l'aldostérone pourrait exercer des effets pathologiques par des mécanismes extrarénaux. L'aldostérone est un facteur clé intervenant dans différentes maladies comme l'hypertension artérielle, la dysfonction ventriculaire gauche après infarctus du myocarde et l'insuffisance cardiaque. L'implication de l'aldostérone dans les maladies cardiovasculaires et rénales a pris un nouvel essor depuis la découverte de ses effets pro-inflammatoires et fibrosants et depuis la reconnaissance de sites extrarénaux pour sa synthèse [1]. Des travaux ont suggéré que l'aldostérone pourrait avoir des implications directes et spécifiques dans la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque et que des antagonistes des récepteurs aux minéralocorticoïdes pouvaient être bénéfiques dans le traitement de cette maladie.

Physiopathologie de l'aldostérone

Deux essais cliniques randomisés (Randomized ALdactone Evaluation

mtc

Tirés à part : P. Lacolley

doi : 10.1684/mtc.2008.0147

Study – RALES [2] et Eplerenone Post-acute myocardial infarction Heart failure Efficacy and SUrvival Study – EPHESUS [3]) ont montré que des antagonistes de l'aldostérone diminuaient la mortalité et le nombre de jours d'hospitalisation des patients atteints d'insuffisance cardiaque sévère de toutes causes ou d'insuffisance cardiaque post-infarctus du myocarde. La dysfonction ventriculaire résulte de changements fonctionnels et structuraux touchant à la fois les myocytes et la matrice extracellulaire. Dans l'insuffisance cardiaque, les marqueurs de la synthèse du collagène (peptide amino-terminal du procollagène III et peptide carboxy-terminal du procollagène I) et de sa dégradation comme le télopeptide carboxy-terminal du procollagène I et certaines métalloprotéases ont une valeur prédictive dans la survenue des événements cardiovasculaires [4]. Le traitement par des antagonistes de l'aldostérone est en outre capable de diminuer les taux circulants de ces marqueurs, contribuant ainsi au bénéfice clinique de ces molécules.

Un des effets les mieux décrits de l'aldostérone est l'induction d'une fibrose cardiaque responsable d'une dysfonction ventriculaire et d'un effet pro-arythmique. Des données expérimentales suggèrent que le développement de la fibrose est indépendant des facteurs hémodynamiques [5]. Les mécanismes d'action de l'aldostérone ne sont pas connus mais le stress oxydant serait largement impliqué dans ses effets. Parmi les mécanismes d'action, l'angiotensine II pourrait être un facteur clé puisque la densité en récepteurs AT1 cardiaques et vasculaires est augmentée chez des rats traités par l'aldostérone. Une production exagérée d'aldostérone au niveau des parois vasculaires et cardiaques pourrait être également observée en situation pathologique [6-8]. Dans l'insuffisance cardiaque par exemple, la production d'aldostérone dans le cœur est augmentée, et il y a une relation entre cette augmentation et le niveau de la dysfonction ventriculaire [9].

Le stress oxydant a été largement impliqué dans l'inflammation et dans la fibrose induite par l'aldostérone chez le rat [10]. La fibrose est accompagnée de la production de radicaux libres et d'une réponse inflammatoire. Il a été observé la présence d'un phénotype inflammatoire péricoronaire dans des cœurs de rats soumis à un régime hypersodé et traités par l'aldostérone [11]. La rigidité accrue des gros troncs artériels et la survenue de l'hypertension artérielle sont favorisées par la présence de l'allèle C du gène de l'aldostérone synthase CYP11B2 [12] et un régime riche en NaCl [13]. Au niveau expérimental, les inhibiteurs de l'aldostérone diminuent la densité du collagène de la média chez le rat spontanément hypertendu (SHR) et le rat normotendu âgé [14, 15]. L'administration d'aldostérone et un régime hypersalé chez le rat augmentent la rigidité artérielle et le contenu en fibronectine indépendamment de toute modification de la pression artérielle. Les effets de l'aldostérone sont prévenus de manière dose-dépendante par l'administration d'un antagoniste de l'aldostérone [16]. Il reste à déterminer si ces modifications artérielles en réponse à l'aldostérone représentent une étape précoce dans l'hypertension artérielle et dans la fibrose cardiaque.

Effets vasculaires

Les effets vasculaires de l'aldostérone *(figure 1)* s'exercent au niveau de l'endothélium, des cellules musculaires

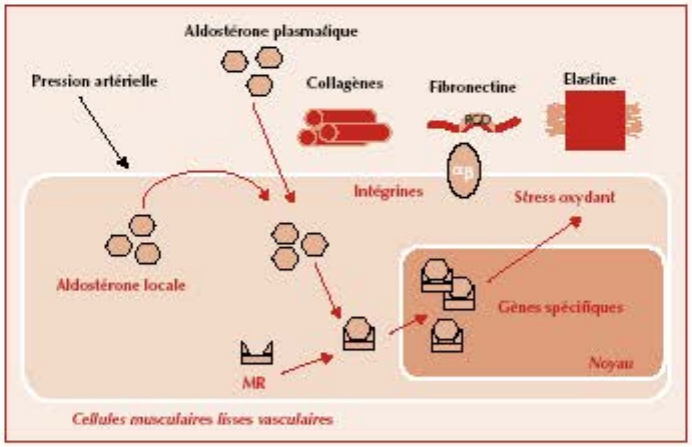


Figure 1. Les effets vasculaires de l'aldostérone.

lisses de la média et de l'adventice. La responsabilité du stress oxydant dans les anomalies vasculaires induites par l'aldostérone est fortement suggérée par le fait que la spironolactone ou des anti-oxydants sont capables de prévenir les altérations des artères coronaires et des vaisseaux mésentériques dans un modèle de rats traités par l'angiotensine II [17]. Ce résultat suggère un mécanisme d'action indirect de l'aldostérone *via* l'angiotensine II. Plusieurs études ont également montré un effet direct de l'aldostérone sur la fonction endothéliale. L'administration d'aldostérone chez le rat Sprague-Dawley affecte la relaxation endothélium-dépendante et augmente le stress oxydant systémique [18]. Cet effet est inhibé par la spironolactone ou un antagoniste du récepteur de l'endothéline [19]. La spironolactone améliore la fonction endothéliale dans l'étude RALES, ce qui est en faveur d'un rôle de l'aldostérone dans la dysfonction endothéliale associée à l'insuffisance cardiaque [2]. De manière similaire, l'administration d'éplérénone, autre antagoniste de l'aldostérone, diminue la production d'anions superoxydes dans des anneaux aortiques dans le modèle du rat insuffisant cardiaque par ligature coronaire [20].

Le stress oxydant *via* une modulation des activités NADPH oxydases et de la voie de la NO synthase pourrait également participer à la rigidification de l'endothélium par l'aldostérone. Il a été démontré que l'augmentation de la rigidité artérielle avec l'âge et le couplage ventriculo-aortique sont favorisés par la présence de l'allèle C du gène de l'aldostérone synthéase CYP11B2 [12]. De même, un antagoniste de l'aldostérone diminue la fibrose cardiaque et améliore la distensibilité artérielle dans le modèle du rat insuffisant cardiaque par ligature coronaire [21].

La présence des récepteurs aux minéralocorticoïdes dans les cellules endothéliales et musculaires lisses suggère fortement une action locale de l'aldostérone dans le système vasculaire [6, 22]. Les mécanismes potentiels d'action impliquent l'activation de l'endothéline, l'angiotensine II, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène, le TGF-α1 ainsi que l'inhibition de capture du NO et de la noradrénaline [23, 24]. Une augmentation du relarguage de NO par l'endothélium a été montrée en réponse à l'aldostérone [25]. Une augmentation de l'activité de la NO synthase qui induit une augmentation de NO a été observée après traitement aigu par l'aldostérone *in vitro* sur des anneaux aortiques. De fortes concentrations de NO sont associées à des anomalies vasculaires et à des phénomènes inflammatoires. L'aldostérone augmente ainsi les espèces radicalaires de l'oxygène et cet effet est réversible en réponse aux antagonistes des récepteurs (ROS) [26, 27].

Rigidité artérielle

Sur la rigidité artérielle, l'aldostérone agit par ses effets rapides et prolongés (effets non génomiques et génomiques) sur le tonus vasomoteur pour diminuer la distensibilité artérielle et le tonus myogénique. Ces fonctions sont capitales pour maintenir un débit sanguin approprié dans les différentes circulations, en particulier, rénale, cérébrale et coronaire. Au niveau des gros troncs, la diminution de la distensibilité artérielle concerne principalement une augmentation de la surface vasculaire alors que les petites artères obéissent à des systèmes plus dynamiques liés aux changements du tonus musculaire [28]. Ainsi, dans le modèle d'hypertension artérielle par excès de minéralocorticoïdes et de sel, il a été montré une augmentation du tonus musculaire *in vitro* après inhibition de la NO synthase, ce qui traduit bien le rôle majeur du NO dans les effets de l'aldostérone.

Le raccourcissement des télomères (marqueurs de la réplication des cellules somatiques) est un processus fortement lié au stress oxydant [29]. Une concentration élevée d'aldostérone plasmatique est associée avec une attrition des télomères chez des sujets normotendus et hypertendus non traités suggérant l'hypothèse que l'aldostérone *via* l'induction d'un stress oxydant accélère le vieillissement biologique [30]. Des relations inverses ont pu être observées chez des patients hypertendus sans que les mécanismes ne soient précisés [31]. Le degré d'athérosclérose et la réponse endothéliale inflammatoire jouent probablement un grand rôle. La longueur des télomères est en effet négativement corrélée à la progression des lésions d'athérosclérose dans l'hypertension artérielle [32]. Un autre mécanisme d'action de l'aldostérone sur l'endothélium, indépendant de la pression artérielle, implique l'activation de la cyclo-oxygénase (COX)-2. Une altération de la fonction des artères mésentériques de rats Wystar-Kyoto ou de rats SHR liée à une surproduction de prostacycline et de thromboxane A2 a été observée en réponse à un traitement chronique par de l'aldostérone [33]. Ces résultats suggèrent une nouvelle approche par les inhibiteurs de COX-2 pour le traitement de l'hyperaldostéronisme.

Dysfonction endothéliale et coagulation

La dysfonction endothéliale est caractérisée par une altération des fonctions vasodilatatrices et une augmentation des propriétés de vasoconstriction de l'endothélium vasculaire, un état pro-inflammatoire et des événements prothrombotiques. Outre son rôle d'interface sang-paroi et de contrôle du tonus musculaire, l'endothélium contrôle la synthèse et l'assemblage des principaux systèmes anticoagulants et régule ainsi la génération de thrombine. L'implication de l'aldostérone dans la régulation de la génération de thrombine par l'endothélium a été récemment suggérée par une surexpression du gène codant pour

le récepteur endothélial pour la protéine C (EPCR) en réponse à l'aldostérone [34]. La liaison de la protéine C à son récepteur favorise sa conversion en protéine C activée par le complexe thrombine-thrombomoduline. La protéine C activée est l'élément central du système régulateur dynamique de la thrombine et exerce son activité anticoagulante en clivant les facteurs V et VIII activés. La surexpression de l'EPCR par des cellules endothéliales s'accompagne d'un allongement des temps de coagulation [34]. Cet effet apparaît comme paradoxal par rapport aux événements prothrombotiques associés à une dysfonction endothéliale. Il a également été établi que l'EPCR peut lier le facteur VII et le facteur VII activé [35]. Cette liaison provoque une diminution de la génération de thrombine par la voie du facteur tissulaire (effet anticoagulant) et de l'activation de la protéine C à la surface endothéliale (effet procoagulant). Il est difficile de reconstituer virtuellement, *in silico* [36], le fonctionnement d'un système aussi complexe que celui de la coagulation, et de prédire la résultante d'effets opposés sur la base de plusieurs paramètres appréhendés individuellement.

Les limites des concepts et outils actuels pour explorer la coagulation *in vitro* sont liées au caractère fragmentaire des tests classiques de biologie clinique. Le travail enzymatique de la thrombine, enzyme clé du système de la coagulation, est réalisé à plus de 95 % après la gélification du sang, due à la polymérisation de la fibrine, transition d'état physique qui correspond aux temps de coagulation. L'inhibition de la génération de thrombine par les systèmes physiologiques, et en particulier le système dynamique de la protéine C activée, est pour l'essentiel postérieure à ce phénomène, et donc mal prise en compte par les tests actuels.

La génération de thrombine *in vitro* a été utilisée il y a un demi-siècle pour étudier la coagulation défectueuse, en particulier chez les hémophiles [37-39]. Elle a été totalement supplantée ensuite par les temps de coagulation, dits *tests en un temps*. Différents groupes ont récemment contribué à faire renaître cette approche, notamment grâce à des évolutions technologiques comme l'utilisation de la fluorescence et/ou méthodologiques, en particulier la définition du milieu réactionnel avec stimulation appropriée, l'analyse des données et la quantification à l'aide d'un calibrant [40, 41].

La thrombinographie peut être considérée comme une approche de protéomique fonctionnelle du système hémostatique. Elle se propose d'approcher quantitativement la réactivité du système : c'est le suivi complet, par fluorescence *in situ*, de la concentration en thrombine active (génération et extinction) dans un spécimen de sang – en présence de plaquettes – en réponse à un stimulus approprié et calibré. Elle permet d'établir un phénotype intermédiaire biologique intégrant les mécanismes moléculaires élémentaires ainsi que leurs interactions complexes et

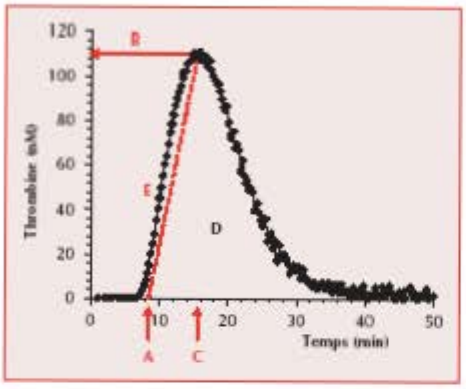


Figure 2. Cinétique de l'activité de la thrombine dans un plasma riche en plaquettes, en réponse à une stimulation par de faibles concentrations en facteur tissulaire.

les influences environnementales. De plus, elle prend en compte tous les inhibiteurs de la coagulation actifs dans le sang circulant [42]. La cinétique de la réaction comporte trois phases *(figure 2)* : a) une phase d'initiation aboutissant à la formation d'une faible quantité de thrombine, b) une phase de génération rapide de thrombine (complexe prothrombinase pleinement actif), c) une phase de terminaison, par les inhibiteurs physiologiques, principalement l'antithrombine. Le potentiel thrombinique (aire sous la courbe) renseigne donc sur la quantité de travail que la thrombine est capable d'accomplir pendant sa vie dans le sang qui coagule, à son voisinage. Il est exprimé en nM.min *(figure 2)*, d) d'autres paramètres peuvent également être déduits de la cinétique de l'activité thrombinique ou thrombinogramme : (A) la phase d'initiation, exprimée en min ; (B) la concentration maximale en thrombine, exprimée en nM ; (C) le temps pour atteindre la concentration maximale en thrombine, exprimée en min ; et (E) la pente maximale de génération de thrombine, exprimée en nM/min.

Les conditions expérimentales ne prennent pas en compte la participation endothéliale dans l'inhibition de la thrombine. L'addition de protéine C activée ou de thrombomoduline permet d'étudier l'influence de protéine C activée exogène ou endogène sur l'activité thrombinique. La concentration en protéine C activée produite *in vivo* n'est pas connue et elle est très vraisemblablement variable d'un territoire à l'autre et d'un individu à l'autre. Par conséquent, la concentration en protéine C activée ou en thrombomoduline induisant une réduction de 50 % de l'ETP peut être considérée comme un bon indicateur de la sensibilité globale à ce système inhibiteur.

Aldostérone et système immunitaire

Relativement peu d'études existent concernant le rôle de l'aldostérone sur les cellules du système immunitaire. Or, toute fibrose vasculaire s'accompagne d'une infiltration importante des cellules du système immunitaire, et notamment des monocytes qui se transforment alors en macrophages. Il a été montré que des macrophages péritonéaux murins et des cellules de la lignée humaine monocytaire THP-1 traités à l'aldostérone augmente leur production de radicaux libres et de LDL oxydées ainsi que l'activité de l'enzyme de conversion ACE [43], ces effets étant inhibés par l'éplérénone. Ces résultats soulèvent l'hypothèse de l'activation du système immunitaire déclenche une production exagérée d'aldostérone par les cellules de la paroi vasculaire.

Conclusion

Ces travaux suggèrent que l'aldostérone pourrait avoir des implications directes et spécifiques dans la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque et que des antagonistes des récepteurs aux minéralocorticoïdes seraient bénéfiques dans le traitement de la rigidité artérielle et des états pro-thrombotiques. Les étapes suivantes consisteront à montrer que l'action des antagonistes aux minéralocorticoïdes sur la réponse inflammatoire et la dysfonction endothéliale constitue des mécanismes essentiels de l'amélioration du risque.

Références

1. Heymes C, Garnier A, Fuchs S, *et al*. Aldosterone-synthase overexpression in heart : a tool to explore aldosterone's effects. *Mol Cell Endocrinol* 2004 ; 217 : 213-9.

2. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, *et al*. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 1999 ; 341 : 709-17.

3. Pitt B, Remme W, Zannad F, *et al*. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003 ; 348 : 1309-21.

4. Zannad F, Alla F, Dousset B, Perez A, Pitt B. Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure : insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). Rales Investigators. *Circulation* 2000 ; 102 : 2700-6.

5. Delcayre C, Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. The role of aldosterone. *J Mol Cell Cardiol* 2002 ; 34 : 1577-84.

6. Hatakeyama H, Miyamori I, Fujita T, Takeda Y, Takeda R, Yamamoto H. Vascular aldosterone. Biosynthesis and a link to angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 24316-20.

7. Silvestre JS, Heymes C, Oubenaissa A, *et al*. Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction : effect of angiotensin II receptor blockade and role in cardiac fibrosis. *Circulation* 1999 ; 99 : 2694-701.

8. Silvestre JS, Robert V, Heymes CA, *et al*. Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. Physiological regulation. *J Biol Chem* 1998 ; 273 : 4883-91.

9. Mizuno Y, Yoshimura M, Yasue H, *et al*. Aldosterone production is activated in failing ventricle in humans. *Circulation* 2001 ; 103 : 72-7.

10. Sun Y, Zhang J, Lu L, Chen SS, Quinn MT, Weber KT. Aldosterone-induced inflammation in the rat heart : role of oxidative stress. *Am J Pathol* 2002 ; 161 : 1773-81.

11. Rocha R, Rudolph AE, Frierdich GE, *et al*. Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002 ; 283 : H1802-H1810.

12. Safar ME, Cattan V, Lacolley P, *et al*. Aldosterone synthase gene polymorphism, stroke volume and age-related changes in aortic pulse wave velocity in subjects with hypertension. *J Hypertens* 2005 ; 23 : 1159-66.

13. Temmar M, Labat C, Benkhedda S, *et al*. Prevalence and determinants of hypertension in the Algerian Sahara. *J Hypertens* 2007 ; 25 : 2218-26.

14. Benetos A, Lacolley P, Safar ME. Prevention of aortic fibrosis by spironolactone in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997 ; 17 : 1152-6.

15. Lacolley P, Safar ME, Lucet B, Ledudal K, Labat C, Benetos A. Prevention of aortic and cardiac fibrosis by spironolactone in old normotensive rats. *J Am Coll Cardiol* 2001 ; 37 : 662-7.

16. Lacolley P, Labat C, Pujol A, Delcayre C, Benetos A, Safar M. Increased carotid wall elastic modulus and fibronectin in aldosterone-salt-treated rats : effects of eplerenone. *Circulation* 2002 ; 106 : 2848-53.

17. Virdis A, Neves MF, Amiri F, Viel E, Touyz RM, Schiffrin EL. Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress. *Hypertension* 2002 ; 40 : 504-10.

18. Pu Q, Neves MF, Virdis A, Touyz RM, Schiffrin EL. Endothelin antagonism on aldosterone-induced oxidative stress and vascular remodeling. *Hypertension* 2003 ; 42 : 49-55.

19. Park JB, Schiffrin ELET. (A) receptor antagonist prevents blood pressure elevation and vascular remodeling in aldosterone-infused rats. *Hypertension* 2001 ; 37 : 1444-9.

20. Schafer A, Fraccarollo D, Hildemann SK, Tas P, Ertl G, Bauersachs J. Addition of the selective aldosterone receptor antagonist eplerenone to ACE inhibition in heart failure : effect on endothelial dysfunction. *Cardiovasc Res* 2003 ; 58 : 655-62.

21. Nehme JA, Lacolley P, Labat C, *et al*. Spironolactone improves carotid artery fibrosis and distensibility in rat post-ischaemic heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2005 ; 39 : 511-9.

22. Lombes M, Oblin ME, Gasc JM, Baulieu EE, Farman N, Bonvalet JP. Immunohistochemical and biochemical evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor. *Circ Res* 1992 ; 71 : 503-10.

23. Epstein M. Aldosterone and the hypertensive kidney : its emerging role as a mediator of progressive renal dysfunction : a paradigm shift. *J Hypertens* 2001 ; 19 : 829-42.

24. Stowasser M. New perspectives on the role of aldosterone excess in cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001 ; 28 : 783-91.

25. Uhrenholt TR, Schjerning J, Rasmussen LE, *et al*. Rapid non-genomic effects of aldosterone on rodent vascular function. *Acta Physiol Scand* 2004 ; 181 : 415-9.

26. Nishiyama A, Yao L, Nagai Y, *et al*. Possible contributions of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase to renal injury in aldosterone/salt-induced hypertensive rats. *Hypertension* 2004 ; 43 : 841-8.

27. Sartorio CL, Fraccarollo D, Galuppo P, *et al*. Mineralocorticoid receptor blockade improves vasomotor dysfunction and vascular oxidative stress early after myocardial infarction. *Hypertension* 2007 ; 50 : 919-25.

28. Duprez DA. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in vascular remodeling and inflammation : a clinical review. *J Hypertens* 2006 ; 24 : 983-91.

29. Aviv A. Telomeres, sex, reactive oxygen species, and human cardiovascular aging. *J Mol Med* 2002 ; 80 : 689-95.

30. Benetos A, Gardner JP, Kimura M, *et al*. Aldosterone and telomere length in white blood cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005 ; 60 : 1593-6.

31. Vasan RS, Demissie S, Kimura M, *et al*. Association of leukocyte telomere length with circulating biomarkers of the renin-angiotensin-aldosterone system : the Framingham Heart Study. *Circulation* 2008 ; 117 : 1138-44.

32. Benetos A, Gardner JP, Zureik M, *et al*. Short telomeres are associated with increased carotid atherosclerosis in hypertensive subjects. *Hypertension* 2004 ; 43 : 182-5.

33. Xavier FE, Aras-Lopez R, Arroyo-Villa I, *et al*. Aldosterone induces endothelial dysfunction in resistance arteries from normotensive and hypertensive rats by increasing thromboxane A(2) and prostacyclin. *Br J Pharmacol* 2008 ; 154 : 1225-35.

34. Ducros E, Berthaut A, Mirshahi SS, *et al*. Aldosterone modifies hemostasis via upregulation of the protein-C receptor in human vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 2008 ; 373 : 192-6.

35. Lopez-Sagaseta J, Montes R, Puy C, Diez N, Fukudome K, Hermida J. Binding of factor VIIa to the endothelial cell protein C receptor reduces its coagulant activity. *J Thromb Haemost* 2007 ; 5 : 1817-24.

36. Hockin MF, Jones KC, Everse SJ, Mann KG. A model for the stoichiometric regulation of blood coagulation. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 18322-33.

37. Brinkhous KM. A study of the clotting defect in hemophilia. *Am J Med Sci* 1939 ; 198 : 509-16.

38. Macfarlane RG, Biggs R. A thrombin generation test ; the application in haemophilia and thrombocytopenia. *J Clin Pathol* 1953 ; 6 : 3-8.

39. Pitney WR, Dacie JV. A simple method of studying the generation of thrombin in recalcified plasma ; application in the investigation of haemophilia. *J Clin Pathol* 1953 ; 6 : 9-14.

40. Brummel-Ziedins KE, Pouliot RL, Mann KG. Thrombin generation : phenotypic quantitation. *J Thromb Haemost* 2004 ; 2 : 281-8.

41. Hemker HC, Beguin S. Phenotyping the clotting system. *Thromb Haemost* 2000 ; 84 : 747-51.

42. Regnault V, Hemker HC, Wahl D, Lecompte T. Phenotyping the haemostatic system by thrombography--potential for the estimation of thrombotic risk. *Thromb Res* 2004 ; 114 : 539-45.

43. Keidar S, Hayek T, Kaplan M, *et al*. Effect of eplerenone, a selective aldosterone blocker, on blood pressure, serum and macrophage oxidative stress, and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003 ; 41 : 955-63.

Hypertension, hypercoagulability and the metabolic syndrome: a cluster of risk factors for cardiovascular disease

Xianqing Mao[1,2], Karima Ait-Aissa[1,2], Jeremy Lagrange[1,2], Gina Youcef[1,2], Huguette Louis[1,2].

[1]INSERM, U961, Vandoeuvre-les-Nancy, France
[2]Nancy Université, Nancy, France

Text: 7761 words including references and figure legends
Abstract: 101 words
Table: 1
Figures: 2

Corresponding author: Huguette Louis, Inserm U961, Faculté de Médecine, 9 avenue de la Forêt de Haye, 54500 Vandoeuvre-les-Nancy, France. Tel 33 3 83683631, Fax 33 383683639; mail: huguette.louis@nancy.inserm.fr

Abstract

Cardiovascular disease (CVD) is one of the main causes of mortality in the world representing around 30% of all deaths. It constitutes also an important factor in morbidity and incapacity. There are several related CVD risk factors such as hypertension, metabolic symdrome (MetS) and hypercoagulability. The exact mechanisms that underlie the relation between those factors and CVD are not sufficiently known yet; pathogenic explanations are lacking also for the mechanisms relating metabolic factors to insulin resistance (IR) and the association with the development of atherosclerosis and thrombosis. The possible links between hypertension, hemostasis alterations and MetS are examined in this report.

Introduction

There is increasing evidence for an association between atherothrombosis and the MetS, a cluster of risk factors for cardiovascular disease [1]. One of the most widely used definitions of the MetS is based on the presence of at least three of the 5 following conditions[2]: abdominal obesity (waist circumference: men, > 40 inches; women, >35 inches), hypertriglyceridaemia (>150 mg/dl), low levels of HDL (high density lipoprotein) cholesterol (c-HDL) (<40 mg/dl), arterial hypertension (>130/85 mm Hg), and hyperglycaemia (>100 mg/dl). Besides these conditions, the MetS is frequently accompanied by a prothrombotic state. This includes elevated plasma levels of PAI-1, thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, von Willebrand factor, coagulation factors VIII, VII, XIII, and fibrinogen, tissue factor (TF), increased release of endothelial cell microparticles, and decreased protein C levels. Furthermore, patients with the MetS exhibit endothelial dysfunction (mainly decreased production of nitric oxide and prostacyclin) and heightened platelet reactivity [3]. Hypertension has been shown to be one of the most prominent features of the MetS present in up to 85% of patients. The establishment of hypertension as a component of the MetS has enabled better insight into the condition and allowed for its early detection and treatment. This review focuses specifically on the link between hypertension, hemostasis and MetS.

Hypertension and the metabolic syndrome

Akintunde *et al*. [4] reported that MetS is present in at least one third of newly diagnosed, non-diabetic, hypertensive subjects. A higher prevalence of the MetS has been described in uncontrolled hypertensives as compared to subjects with blood pressure (BP) under control [5]. In contrast, strict control of BP reduces substantially the risk of coronary events in patients with MetS [6]. In a study of Taiwanese Type 2 diabetic patients, hypertension was

shown to be the most important component of MetS in association with ischemic heart disease compared to other risk factors, such as dyslipidaemia, obesity and microalbuminuria [7]. Furthermore, MetS is increasingly recognized as an important cardiovascular risk factor in hypertension, the presence of MetS seems to aggravate the severity of hypertension and to reduce the capacity of people to respond to specific treatments [8]. Hypertriglyceridaemia and low levels of high density lipoprotein (HDL) cholesterol are likely to be associated with this poor response to antihypertensive treatment in hypertensive patients with MetS [9].

Transgenic skinny mice and obese KKAy mice are both hyperleptinaemic and hypertensive due to chronic elevations in leptin resulting in enhanced sympathetic activity, which contributes to hypertension [10]. However, not all individuals with MetS have hypertension. Genetically obese leptin-deficient ob/ob mice ($Lep^{ob/ob}$) are described as hypotensive [11]. However, results of Silvani *et al*. [12]suggest that, in the absence of leptin, obesity may entail hypertensive derangements of BP, which are substantially modulated by cardiovascular effects of the sleep-wake cycle. Moreover, leptin receptor-deficient db/db mice ($LepR^{db/db}$) are reported to be both hypotensive and hypertensive as measured by telemetry in each of the two studies [13, 14].

Despite a close association between MetS components and high BP, understanding of individual contributions of some of the MetS components to the increment in BP is still complex. As one of the main causes of the MetS visceral obesity induces development of hypertension *via* production of various adipocytokines, such as leptin, TNF-α, IL-6 (Inter Leukin 6), angiotensinogen, and non-esterified fatty acids (NEFA) [15]. IR as another important pathophysiological feature of the MetS is related to an increased anti-natriuretic effect contributing to the development of hypertension in the MetS [16]. In IR individuals, high serum insulin levels are associated with increased levels of circulating endothelin-1 (ET-1) [17]. In another separate experiment, insulin infusion induced an increase in arterial ET-1 content, hypertension and subsequent plasma ET-1 elevation in rats [18]. Further studies showed that ET-1 receptor antagonism effectively reduced BP in animal models of IR and hypertension [19]. Furukawa *et al*. [20] reported that increased oxidative stress in accumulated fat is an early instigator of MetS. In MetS rats fed a high-fat and refined-carbohydrate diet, hypertension has been associated with endothelial dysfunction and oxidative stress by depressing Nitric Oxide Sythase (NOS) protein expression [21]. Moreover, a variety of studies have reported activation of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS) in obesity related hypertension [22]. Accumulating data indicate that Angiotensin II (AngII), which was known initially as a key factor involved in increasing central PP and

aortic stiffness [23], inhibits the action of insulin via AngII type 1 (AT1) receptors in vascular muscle by interfering with insulin signaling through PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase) and PKB (Protein Kinase B) signaling pathways [24]. AngII receptor blockers (ARBs) with the ability to selectively modulate activity of peroxisome proliferator-activated receptor-γ (PPAR-γ), can increase adiponectin, decrease body weight and improve insulin sensitivity in patients with hypertension and the MetS [25, 26]. Furthermore, interesting evidence supports the existence of a local and specific adipocyte RAAS [27] which has the capacity to impact the systemic RAAS and thus disturb BP. Indeed, adipose tissue expresses all the constituents of the RAAS needed for the production of AngII, including angiotensinogen (AGT) [28] which contributes to approximately 30% of the systemic AGT levels in rodents, angiotensin-converting-enzyme (ACE) [29], a renin-like activity [30] and the AngII type 1 and 2 receptors (AT1R and AT2R) [31]. These components exert local effects by regulating adipose tissue growth and systemic effects by inducing production of high levels of circulating aldosterone which promotes development of impaired insulin metabolic signaling and endothelial function, which in turn contributes to hypertension (Figure 1) and associated cardiovascular and renal structural and functional abnormalities [32]. Thus, briefly, visceral obesity, IR, oxidative stress, endothelial dysfunction, activated RAAS and increased inflammatory mediators might be the main factors in the development of hypertension in the MetS.

Hemostasis and Metabolic syndrome

It is well established that adipose tissue plays the role of an endocrine organ which releases factors known as adipokines. Studies have suggested that adipokines such as leptin, adiponectin, or ghrelin might contribute directly to the coexistence of IR and endothelial dysfunction [33] as described above. Adiponectin diminishes also platelet aggregation, epinephrine-, ADP- (Adenosine Di-Phosphate) or collagen-induced, and dose-dependently decreases soluble CD40L (Cluster of Differentiation 40 Ligand) release of a pro-inflammatory mediator of atherothrombosis [34, 35]. Serum leptin concentrations are correlated with the homeostatic index of IR which reflects the degree of IR [36]. Adiponectin, which is inversely correlated with abdominal fat, has very favorable cardiovascular effects [34, 37]. Tumour necrosis factor (TNF-α)-induced Nuclear factor κ B (NF-κB) p65 subunit, a major regulator of TF expression in endothelial cells or monocytes [38, 39], is inhibited by adiponectin, which enhances tissue factor pathway inhibitor (TFPI) expression and activity [40]. Ghrelin, the gut hormone, predominantly produced by the stomach is related to adipokine with respect to its food intake and energy metabolism functions. Ghrelin, through

its anti-oxidative and anti-inflammatory effects, could protect against hepatotoxic agents such as carbon tetrachloride and restore activated partial thromboplastin time or fibrinogen plasma levels [41].

The prothrombotic state found in MetS is linked to hypercoagulability [42, 43]. The TF-VIIa complex catalyzes the conversion of factor X to Xa which, along with factor Va, leads to the conversion of prothrombin to thrombin. Amplification loops of the coagulation cascade comprise activation of essential cofactors V and VIII by thrombin. Increased plasma levels of any of those factors leads to a hypercoagulable state. Chronic inflammation induced by obesity is associated with increased TF [39] through the NF-κB pathway [44]. In the presence of MetS increased levels of factor VII and von Willebrand factor [45], which carries factor VIII [46] are found. Very low-density lipoproteins (VLDL) that are increased in MetS support activation of factor VII by the Xa/Va complex [47]. On the other hand HDL, which are decreased in MetS, enhance the protein C pathway, the principal inducible anticoagulant pathway [48].

Hypofibrinolysis, shown by increased clot lysis times [43], is one of the best-documented parts of MetS-induced abnormalities. The physiological role of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) is to inhibit plasminogen activators such as tissue plasminogen-activator (t-PA) and to control the rate of fibrin degradation produced after thrombin generation. Plasma PAI-1 concentration is increased in subjects with MetS [49, 50]. Increased cardiovascular risk [51] and free fatty acids (FFAs) catalyze the induction of PAI-1 gene expression and PAI-1 protein expression [52]. Chronic inflammation, abdominal obesity, IR, all increase PAI-1 production [49, 53] and result in attenuated plasminogen conversion leading to a hypofibrinolytic state [54, 55].

The same factors that modifies endothelial function or clotting in MetS have been shown to impair also platelet function. Dyslipidaemia contributes to increased platelet activation [56], triglycerides increase platelet aggregability and the incidence of venous thromboembolism; these effects are reversed by HDL cholesterol [57]. Under physiological conditions, insulin decreases platelets responses to ADP and thrombin [58, 59]. Insulin resistant subjects have been linked to reduced platelet sensitivity to insulin related to loss of insulin-mediated suppression of ADP-induced P2y12 signaling [60]. Elevated FFA concentrations and hypertriglyceridaemia exert a proaggregating effect in vitro [61]. FFA levels are correlated with CD36 (Cluster of differentiation 36) mRNA expression [62] and the CD36 ligand facilitates the supply of FFAs for platelet thromboxane production which stimulates collagen-induced platelet aggregation [63].

Microparticles (MPs) must now be added to the MetS equation. MPs are fragments released from stimulated or apoptotic cells after plasma membrane remodeling. MPs are increased in MetS and could bind cells via specific receptors and induce cellular activation with the liberation of TF, cytokines [64] and increased endothelial dysfunction [65]. TF could be exposed at MP surfaces and is a major factor for MP thrombogenicity [66]. It has been reported that MPs are associated with CD36 which is found to be increased in obese and diabetic patients [67] and could participate in impaired platelet function. MP release is associated with inflammation and by transporting molecules such as TF or CD36 could participate in the increased coagulation and thrombogenicity found in MetS.

Animal models

There are many, different, naturally occurring and gene-targeted mutations in rodents that lead to obesity and other metabolic defects associated with human MetS. Care should be taken when choosing an animal model for MetS studies, taking into account the diet used, as well as the degree to which they develop obesity, hyperlipidaemia, IR and hypertension. Although there is no perfect animal model of the human disease, each of the animal models described have specific attributes that make them useful for studying both the mechanisms of development and the link between hypertension, hemostasis and MetS.

Rat Models

Obese Zucker rats are the best known and most widely used animal model of genetic obesity. These animals present a mutation (fa) in the leptin receptor [68]. The *fa/fa* Zucker rats become noticeably obese between the third and the fifth week of the life. Obese Zucker rats present increased plasma glucose levels with an initial IR, followed by an insulin-deficient state associated with a body-weight plateau. This strain presents dysplipidemia and hyperinsulinaemia which is detectable at 3 weeks of age and persists throughout the animal's life. These disorders, which are all major specifications of the metabolic syndrome, should have contributed to arterial hypertension, as observed in humans. The increase in arterial BP in these animals may be explained, at least in part, by endothelial dysfunction observed in some studies on older obese Zucker rats [69]. However, it was shown that, during development, sympathovagal modulation could play a major role in the lack of increase in arterial stiffness in obese Zucker rats, despite their IR, obesity, diabetes and dysplipidemia [70]. Indeed, alteration in sympathovagal balance could lead to a reduction in heart rate that in turn, could decrease arterial stiffness in obese Zucker rats.

Spontaneous hypertensive-stroke prone fatty rats were derived by replacing the *fa* locus of chromosome 5 of SHR-SP from Zucker fatty (*fa/fa*) rats [71]. SHR-SP fatty are unique in that they develop severe hypertension and present a good model of the IR syndrome [72]. SHR-SP fatty rats are characterised by the spontaneous development of fibrotic cardiac atria and ventricles, reduced heart rate and ventricular diastolic dysfunction, obesity, hyperleptinaemia and several metabolic disorders [73]. The SBP of these rats was significantly decreased compared with their lean controls, SHRSP/Izm rats. Then, the reduction of SBP in SHR- SP fatty rats may be related to the mutation of the leptin receptor gene. Plasma leptin levels are increased in this strain compared with their lean hypertensive controls [71]. Elsewhere it has been documented that leptin resistance induces hyperinsulinaemia and IR in humans and animals [74]. The SHR-SP fatty rats may develop IR because of failure to respond to leptin due to a mutation of the leptin receptor gene.

SHR-SP, are known for their severity of lesions and high rate of stroke onset. The main lesions in SHR-SP were fibrinoid necrosis and fibricellular proliferative lesions. These lesions were accompanied by endothelial injury and macrophage accumulation [75] suggesting that blood coagulation would be activated in SHR-SP because of the deteriorated endothelial anti-coagulant function and the expression of TF by activated endothelial cells and/or macrophages. However, hemorrhagic lesions rather than thrombotic lesions were easily found in the affected organs of SHR-SP. In addition, low levels of Thrombin-Antithrombin III complex (TAT) and fibrin/fibrinogen degeneration products (FDP) are found in SHR-SP compared with their normotensive, Wistar Kyoto rat controls, indicating that thrombin production was maintained at a low level in the plasma [76]. Thus, the SHR-SP rats fall into a hypocoagulable state which is quite different from the results of studies on haemostatic parameters in human hypertensives.

Obese spontaneously hypertensive rats, usually named Koletsky, have monogenetic obesity superimposed on a hypertensive genetic background [77]. This strain was derived by mating a spontaneously hypertensive (SHR) female rats of the Wistar Kyoto strain with normotensive Sprague-Dawley males [78]. This model presents obesity, hypertension, hyperinsulinaemia, hyperlipidaemia and nephropathy superimposed on the background of SHR [78, 79]

Spontaneously hypertensive and hyperlipidaemic rats (SHHR) are a combination of the hypertension and hyperlipideamia model which is the result of mating of SHR and spontaneously hyperlipideamic rats (HLR) [80]. SHHR rats exhibit hypertension which may be related to elevated sympathetic nervous system tone that has been proposed as the cause of hypertension in SHR [81]. Otherwise, lesions in the endothelium and lipid deposition under

the endothelium are observed in the aorta of 24 month old female SHHR, despite a normal diet. In parallel, increases in plasma levels of fibrinogen, TAT and α2-PI (α2-Plasmin Inhibitor) are observed in this strain [42] and suggest an hypercoagulative state.

Mouse models

Leptin-deficient mice ($Lep^{ob/ob}$) which cannot produce leptin due to an inactivating mutation in the leptin gene, arose from a spontaneous mutation at the Jackson Laboratory [82]. The genetic background is an extremely important consideration for the use of $Lep^{ob/ob}$ mice in studying the MetS. These mice are visually obese by 4 weeks of age, and their growth curves do not plateau even at 12 months of age. Leptin deficiency results in hyperphagia, reduced energy expenditure and extreme obesity. In addition, this strain presents mild hyperglycaemia that is apparent transiently from 8 to 12 weeks of age. At this point, pancreatic β-cell compensation occurs and increased insulin levels bring glucose homeostasis under control [83]. In addition, these mice express increased HDL levels with a catabolic pathway which is down-regulated in this strain and suggest that HDL apolipoprotein turnover may be regulated by obesity and leptin signalling [84, 85]. In salt-sensitive hypertension, these obese mice express renal injury due to their obesity that induces renal oxidative stress [86]. Studies on BP in $Lep^{ob/ob}$ mice have yielded contrasting results, evidence of hypotension [87], no significant differences in BP[88] or hypertension limited to the light period [89] compared with their lean controls. However, because of their obesity, $Lep^{ob/ob}$ mice have shown hypertensive derangements of BP that appear to be modulated by cardiovascular effects of the sleep-wake cycle[12]. Otherwise, studies on vascular injury have shown that leptin-deficient and leptin receptor–deficient mice thromboses less than their controls. Leptin administration increased occlusion in these two mutant mice [90]

Leptin receptor-deficient mice ($LepR^{db/db}$) do not have leptin receptors. As with $Lep^{ob/ob}$ mice, the obese and insulin-resistant phenotype of $LepR^{db/db}$ mice depends upon their genetic background. The metabolic profiles of $LepR^{db/db}$ and $Lep^{ob/ob}$ mice are nearly identical. Both models are obese, hyperinsulinaemic, hyperglycaemic (depending on the age and strain), have elevated total cholesterol levels [83] and less thrombosis following onset of vascular injury. The primary difference between the two models is that the $LepR^{db/db}$ mice have dramatic elevations in circulating leptin concentrations that are proportional to their degree of adiposity, whereas the $Lep^{ob/ob}$ mice do not have circulating leptin [90, 91]. Bodary . *et al*. [13] have reported reduced arterial pressure in $LepR^{db/db}$ compared with wild-type mice with leptin.

However, studies have demonstrated that *db/db* mice are hypertensive with a disrupted BP, heart rate, and locomotor activity circadian rhythms [14].

$Ldlr^{-/-}$ $Lep^{ob/ob}$ / $Apob48^{-/-}Lep^{ob/ob}$ mice were derived by crossing of $Lep^{ob/ob}$ with $Ldlr^{-/-}$ and $Lep^{ob/ob}$ with $Apob48^{-/-}$ respectively [92]. These two mice models present phenotypes of the MetS combining obesity, hyperglycaemia, hyperinsulinaemia, hyperlipidaemia, and hypertension. The two lines have different lipid profiles and thus can be used for different purposes. Interestingly, $Apob48^{-/-}Lep^{ob/ob}$ mice are diabetic by 9-10 weeks whereas $Ldlr^{-/-}$ $Lep^{ob/ob}$ mice are not. This may be because of their respective genotypes.

The New Zealand obese (NZO) mouse model exhibits a polygenic obesity associated with hyperinsulinaemia and hyperglycaemia. It has been shown that this strain presents additional features of the MetS, elevated BP, serum cholesterol and serum triglyceride levels [93]. In addition, studies have shown that these mice exhibit endothelial dysfunction attributed to eNOS uncoupling and increased reactive oxygen species (ROS) production [94]. Indeed, this strain presents traits of the human MetS and is therefore an ideal model for the study of the pathophysiology of a MetS, and for the identification of the responsible genes.

Links between hypertension and hypercoagulability in the metabolic syndrome

Hypertension is one of the factors which cause the most damage in the vascular wall and its main complications (stroke and myocardial infarction) are paradoxically thrombotic rather than haemorrhagic. Early in 1995, Miller *et al*. [95] had already demonstrated that hypertensive patients exhibited a relatively hypercoagulative state because of enhanced TF expression. TF plays a significant role in both thrombus formation and in the progression of atherosclerosis in patients with MetS [96]. Recent studies have shown that up-regulation of monocyte TF activity is significantly associated with carotid intima-media thickness in MetS patients, characterized by higher BP and procoagulant activity compared with control subjects [38]. The vascular wall as a natural anticoagulant blood container requires the maintenance of a certain level of various procoagulant or anticoagulant components. The balance between TF and TFPI acts as an important regulator of blood coagulation activity. Regnault *et al*. [97] reported that in postmenopausal women, in which an increase in arterial stiffness is associated with both changes in vascular wall status and the presence of a hypercoagulative state, free TFPI increased as the vascular wall function deteriorated and pulse pressure (PP) increased. Furthermore, their findings are supported by an increase of TFPI synthesized by VSMCs (Vascular Smooth Muscle Cells) in response to cyclic stress *in vitro*.

A number of studies have shown that rheological, haemostatic, endothelial and platelet abnormalities play a key role in the thrombotic complications of hypertension. Ajayi *et al*. [98] reported that fatty Zucker diabetic rats exhibited a more severe hypertension than their lean controls; moreover, as compared with the female rats, the male group presented a greater prothrombotic activity and a worse impairment of endothelial reactivity. In spontaneously hypertensive and hyperlipidaemic rats (SHHR), hypertension and its related-hyperlipidaemia caused vascular damage that lead to a hypercoagulative state, due to increased plasma levels of fibrinogen [42, 99]. The hypercoagulative state in hypertension may further contribute to the increased risk and severity of target organ damage [100]. Anand *et al*. [101] showed that individuals with the MetS suffer an excess of CVD explained by an excess of atherosclerosis and impaired fibrinolysis. Nevertheless, the relation between hypertension and hypercoagulability is still controversial. For example, Abumiya *et al*. [76] reported that the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHR-SP) gets into a hypocoagulable state rather than a hypercoagulative state, and that the reduction of factor Xa activity in SHR-SP may be related to the elevation of C1 inhibitor activity. Thus, the links between increased artery pressure and hypercoagulability still remain to be investigated.

The precise mechanisms that drive the hypercoagulable state associated with hypertension may be still uncertain, but the RAAS seems to be a good possibility. A significant relation between plasma renin activity (PRA) and plasma aldosterone with markers of activated coagulation and decreased fibrinolytic activity was demonstrated in patients with essential hypertension [100]. AngII accelerates arterial thrombosis in renovascular hypertensive rats *via* its AT1 receptor, probably due to fibrinolysis inhibition [102]. The formation of the t-PA and PAI-1 complex reduces fibrinolytic activity through inhibition of plasminogen activation. Moreover, the levels of PAI-1 and t-PA were positively related to systolic and diastolic blood pressures (SBP and DBP) in a large cohort (>2500 person) of essentially healthy middle-aged men and woman [50]. Since both of t-PA and PAI-1 are synthesized in the vascular endothelium, endothelium dysfunction induces an imbalance in fibrinolysis [103]. Hypertensive patients with MetS have higher levels of free PAI-1 and t-PA antigen, which will increase the risk of CVD [100]. AngII has been shown to oppose the effect of NO, stimulate the production of adhesion factors, PAI-1 and decrease the level of t-PA, promoting thus the risk of thrombosis. Moreover, AngII and aldosterone interact synergistically to increase PAI-1 production in humans, and only dual AT1 and aldosterone receptor antagonism can prevent the effect of activation of the RAAS on circulating PAI-1 antigen [104]. In therapy-resistant hypertensive patients, the AT1 receptor blocker (AT1RB)

eprosartan, inhibited fibrinolytic function as reflected by decreased PAI-1 antigen, PAI-1 activity and t-PA antigen [105]. Additionally, agonistic AT1 receptor auto-antibodies (AT1-AA) and AngII can cause monocytes to produce TF, and both of them induced significantly higher expression of TF in monocytes from hypertensive patients compared to control subjects [106].

Conclusion

Hypertension and hypercoagulability are strongly correlated in most cases of MetS probably due to an activated RAAS system coupled with a vascular damage, endothelial dysfunction, an excess of procoagulant factors and relative fibrinolysis inhibition (Figure 2).

We have described the case in human with the problem of interconnectability between the cardiovascular events and obesity diabetes as well as the thrombotic condition. But it is difficult to find an ideal animal model (as we have shown) that covers all the conditions.

It would appear then that research will continue for some time using these animal models to investigate aspects of the global problem. Future treatments will have to take into account this complexity trying to unravel in humans why so many symptoms are associated with obesity diabetes and cardiovascular pathology. Not to forget to mention that the current association of these systems with the state of coagulation is also a risk factor in cardiovascular disease.

Acknowledgements

We thank Prof. Simon N Thornton, INSERM U961, for editing and correcting English.

References

[1] I. Palomo, R. Moore-Carrasco, M. Alarcon, A. Rojas, F. Espana, V. Andres and H. Gonzalez-Navarro, Pathophysiology of the proatherothrombotic state in the metabolic syndrome, *Front Biosci (Schol Ed)*, 2 (2010), 194-208.

[2] NCEP, Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report, *Circulation*, 106 (2002), 3143-421.

[3] M. Franchini, G. Targher, M. Montagnana and G. Lippi, The metabolic syndrome and the risk of arterial and venous thrombosis, *Thromb Res*, 122 (2008), 727-35.

[4] A. A. Akintunde, O. E. Ayodele, P. O. Akinwusi and G. O. Opadijo, Metabolic syndrome: comparison of occurrence using three definitions in hypertensive patients, *Clin Med Res*, 9 (2010), 26-31.

[5] E. Bog-Hansen, U. Lindblad, B. Gullberg, A. Melander and L. Rastam, Metabolic disorders associated with uncontrolled hypertension, *Diabetes Obes Metab*, 5 (2003), 379-87.

[6] N. D. Wong, J. R. Pio, S. S. Franklin, G. J. L'Italien, T. V. Kamath and G. R. Williams, Preventing coronary events by optimal control of blood pressure and lipids in patients with the metabolic syndrome, *Am J Cardiol*, 91 (2003), 1421-6.

[7] C. H. Tseng, C. K. Chong, C. P. Tseng, W. Y. Shau and T. Y. Tai, Hypertension is the most important component of metabolic syndrome in the association with ischemic heart disease in Taiwanese type 2 diabetic patients, *Circ J*, 72 (2008), 1419-24.

[8] R. Rossi, A. Nuzzo, G. Origliani and M. G. Modena, Metabolic syndrome affects cardiovascular risk profile and response to treatment in hypertensive postmenopausal women, *Hypertension*, 52 (2008), 865-72.

[9] W. Zidek, L. Naditch-Brule, S. Perlini, C. Farsang and S. E. Kjeldsen, Blood pressure control and components of the metabolic syndrome: the GOOD survey, *Cardiovasc Diabetol*, 8 (2009), 51.

[10] M. Aizawa-Abe, Y. Ogawa, H. Masuzaki, K. Ebihara, N. Satoh, H. Iwai, N. Matsuoka, T. Hayashi, K. Hosoda, G. Inoue, Y. Yoshimasa and K. Nakao, Pathophysiological role of leptin in obesity-related hypertension, *J Clin Invest*, 105 (2000), 1243-52.

[11] A. L. Mark, R. A. Shaffer, M. L. Correia, D. A. Morgan, C. D. Sigmund and W. G. Haynes, Contrasting blood pressure effects of obesity in leptin-deficient ob/ob mice and agouti yellow obese mice, *J Hypertens*, 17 (1999), 1949-53.

[12] A. Silvani, S. Bastianini, C. Berteotti, C. Franzini, P. Lenzi, V. Lo Martire and G. Zoccoli, Sleep modulates hypertension in leptin-deficient obese mice, *Hypertension*, 53 (2009), 251-5.

[13] P. F. Bodary, Y. Shen, M. Ohman, K. L. Bahrou, F. B. Vargas, S. S. Cudney, K. J. Wickenheiser, M. G. Myers, Jr. and D. T. Eitzman, Leptin regulates neointima formation after arterial injury through mechanisms independent of blood pressure and the leptin receptor/STAT3 signaling pathways involved in energy balance, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27 (2007), 70-6.

[14] W. Su, Z. Guo, D. C. Randall, L. Cassis, D. R. Brown and M. C. Gong, Hypertension and disrupted blood pressure circadian rhythm in type 2 diabetic db/db mice, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295 (2008), H1634-41.

[15] H. Katagiri, T. Yamada and Y. Oka, Adiposity and cardiovascular disorders: disturbance of the regulatory system consisting of humoral and neuronal signals, *Circ Res*, 101 (2007), 27-39.

[16] L. A. Sechi, Mechanisms of insulin resistance in rat models of hypertension and their relationships with salt sensitivity, *J Hypertens*, 17 (1999), 1229-37.

[17] P. A. Sarafidis and G. L. Bakris, Review: Insulin and endothelin: an interplay contributing to hypertension development?, *J Clin Endocrinol Metab*, 92 (2007), 379-85.

[18] C. C. Juan, Y. W. Shen, Y. Chien, Y. J. Lin, S. F. Chang and L. T. Ho, Insulin infusion induces endothelin-1-dependent hypertension in rats, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 287 (2004), E948-54.

[19] S. DeLoach, Y. Huan, C. Daskalakis and B. Falkner, Endothelin-1 response to glucose and insulin among African Americans, *J Am Soc Hypertens*, 4 (2010), 227-35.

[20] S. Furukawa, T. Fujita, M. Shimabukuro, M. Iwaki, Y. Yamada, Y. Nakajima, O. Nakayama, M. Makishima, M. Matsuda and I. Shimomura, Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome, *J Clin Invest*, 114 (2004), 1752-61.

[21] C. K. Roberts, R. J. Barnard, R. K. Sindhu, M. Jurczak, A. Ehdaie and N. D. Vaziri, A high-fat, refined-carbohydrate diet induces endothelial dysfunction and oxidant/antioxidant imbalance and depresses NOS protein expression, *J Appl Physiol*, 98 (2005), 203-10.

[22] J. E. Hall, Pathophysiology of obesity hypertension, *Curr Hypertens Rep*, 2 (2000), 139-47.

[23] P. Lacolley, M. E. Safar, V. Regnault and E. D. Frohlich, Angiotensin II, mechanotransduction, and pulsatile arterial hemodynamics in hypertension, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297 (2009), H1567-75.
[24] J. R. Sowers, Insulin resistance and hypertension, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286 (2004), H1597-602.
[25] M. Pravenec and T. W. Kurtz, Molecular genetics of experimental hypertension and the metabolic syndrome: from gene pathways to new therapies, *Hypertension*, 49 (2007), 941-52.
[26] S. Makita, A. Abiko, Y. Naganuma, Y. Moriai and M. Nakamura, Effects of telmisartan on adiponectin levels and body weight in hypertensive patients with glucose intolerance, *Metabolism*, 57 (2008), 1473-8.
[27] S. Engeli, R. Negrel and A. M. Sharma, Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system, *Hypertension*, 35 (2000), 1270-7.
[28] L. A. Cassis, J. Saye and M. J. Peach, Location and regulation of rat angiotensinogen messenger RNA, *Hypertension*, 11 (1988), 591-6.
[29] P. Schling, H. Mallow, A. Trindl and G. Loffler, Evidence for a local renin angiotensin system in primary cultured human preadipocytes, *Int J Obes Relat Metab Disord*, 23 (1999), 336-41.
[30] U. Shenoy and L. Cassis, Characterization of renin activity in brown adipose tissue, *Am J Physiol*, 272 (1997), C989-99.
[31] L. A. Cassis, M. J. Fettinger, A. L. Roe, U. R. Shenoy and G. Howard, Characterization and regulation of angiotensin II receptors in rat adipose tissue. Angiotensin receptors in adipose tissue, *Adv Exp Med Biol*, 396 (1996), 39-47.
[32] A. Whaley-Connell, M. S. Johnson and J. R. Sowers, Aldosterone: role in the cardiometabolic syndrome and resistant hypertension, *Prog Cardiovasc Dis*, 52 (2010), 401-9.
[33] A. E. Schutte, H. W. Huisman, R. Schutte, J. M. van Rooyen, L. Malan, C. M. Fourie and N. T. Malan, Adipokines and cardiometabolic function: How are they interlinked?, *Regul Pept*, 164 (2010), 133-8.
[34] H. Kato, H. Kashiwagi, M. Shiraga, S. Tadokoro, T. Kamae, H. Ujiie, S. Honda, S. Miyata, Y. Ijiri, J. Yamamoto, N. Maeda, T. Funahashi, Y. Kurata, I. Shimomura, Y. Tomiyama and Y. Kanakura, Adiponectin acts as an endogenous antithrombotic factor, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26 (2006), 224-30.
[35] P. Restituto, I. Colina, J. J. Varo and N. Varo, Adiponectin diminishes platelet aggregation and sCD40L release. Potential role in the metabolic syndrome, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298 (2011), E1072-7.

[36] R. Lichnovska, S. Gwozdziewiczova, R. Chlup and J. Hrebicek, Serum leptin in the development of insulin resistance and other disorders in the metabolic syndrome, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 149 (2005), 119-26.

[37] S. Stork, M. L. Bots, P. Angerer, C. von Schacky, D. E. Grobbee, C. E. Angermann and J. Seufert, Low levels of adiponectin predict worsening of arterial morphology and function, *Atherosclerosis*, 194 (2007), e147-53.

[38] A. Nakagomi, M. Sasaki, Y. Ishikawa, T. Shibui, M. Kosugi, Y. Endoh, M. Morikawa, Y. Kusama, H. Atarashi and K. Mizuno, Upregulation of monocyte tissue factor activity is significantly associated with carotid intima-media thickness in patients with metabolic syndrome, *J Atheroscler Thromb*, 18 (2011), 475-86.

[39] F. Samad, M. Pandey and D. J. Loskutoff, Regulation of tissue factor gene expression in obesity, *Blood*, 98 (2001), 3353-8.

[40] Y. J. Chen, L. Q. Zhang, G. P. Wang, H. Zeng, B. Lu, X. L. Shen, Z. P. Jiang and F. P. Chen, Adiponectin inhibits tissue factor expression and enhances tissue factor pathway inhibitor expression in human endothelial cells, *Thromb Haemost*, 100 (2008), 291-300.

[41] O. F. Arici and N. Cetin, Protective role of ghrelin against carbon tetrachloride (CCl)-induced coagulation disturbances in rats, *Regul Pept*, 166 (2011), 139-42.

[42] H. Amagasa, M. Okazaki, S. Iwai, T. Kumai, S. Kobayashi and K. Oguchi, Enhancement of the coagulation system in spontaneously hypertensive and hyperlipidemic rats, *J Atheroscler Thromb*, 12 (2005), 191-8.

[43] A. M. Carter, C. M. Cymbalista, T. D. Spector and P. J. Grant, Heritability of clot formation, morphology, and lysis: the EuroCLOT study, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27 (2007), 2783-9.

[44] G. E. Sonnenberg, G. R. Krakower and A. H. Kissebah, A novel pathway to the manifestations of metabolic syndrome, *Obes Res*, 12 (2004), 180-6.

[45] H. S. Lim, G. Y. Lip and A. D. Blann, Plasma von Willebrand factor and the development of the metabolic syndrome in patients with hypertension, *J Clin Endocrinol Metab*, 89 (2004), 5377-81.

[46] A. J. Lansbury, P. J. Grant and A. J. Catto, Atherothrombotic risk factors in subjects with a family history of stroke, *Cerebrovasc Dis*, 14 (2002), 153-60.

[47] P. J. Grant, Diabetes mellitus as a prothrombotic condition, *J Intern Med*, 262 (2007), 157-72.

[48] C. Mineo, H. Deguchi, J. H. Griffin and P. W. Shaul, Endothelial and antithrombotic actions of HDL, *Circ Res*, 98 (2006), 1352-64.

[49] A. Pandolfi, D. Cetrullo, R. Polishuck, M. M. Alberta, A. Calafiore, G. Pellegrini, E. Vitacolonna, F. Capani and A. Consoli, Plasminogen activator inhibitor type 1 is increased in the arterial wall of type II diabetic subjects, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21 (2001), 1378-82.

[50] K. A. Poli, G. H. Tofler, M. G. Larson, J. C. Evans, P. A. Sutherland, I. Lipinska, M. A. Mittleman, J. E. Muller, R. B. D'Agostino, P. W. Wilson and D. Levy, Association of blood pressure with fibrinolytic potential in the Framingham offspring population, *Circulation*, 101 (2000), 264-9.

[51] T. Hoekstra, J. M. Geleijnse, E. G. Schouten and C. Kluft, Plasminogen activator inhibitor-type 1: its plasma determinants and relation with cardiovascular risk, *Thromb Haemost*, 91 (2004), 861-72.

[52] C. Banfi, L. Mussoni, P. Rise, M. G. Cattaneo, L. Vicentini, F. Battaini, C. Galli and E. Tremoli, Very low density lipoprotein-mediated signal transduction and plasminogen activator inhibitor type 1 in cultured HepG2 cells, *Circ Res*, 85 (1999), 208-17.

[53] F. Samad, M. Pandey, P. A. Bell and D. J. Loskutoff, Insulin continues to induce plasminogen activator inhibitor 1 gene expression in insulin-resistant mice and adipocytes, *Mol Med*, 6 (2000), 680-92.

[54] M. C. Alessi and I. Juhan-Vague, PAI-1 and the metabolic syndrome: links, causes, and consequences, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26 (2006), 2200-7.

[55] A. Suehiro, I. Wakabayashi, K. Uchida, T. Yamashita and J. Yamamoto, Impaired spontaneous thrombolytic activity measured by global thrombosis test in males with metabolic syndrome, *Thromb Res*, (2011),

[56] M. Kjalke, A. Silveira, A. Hamsten, U. Hedner and M. Ezban, Plasma lipoproteins enhance tissue factor-independent factor VII activation, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20 (2000), 1835-41.

[57] C. J. Doggen, R. N. Lemaitre, N. L. Smith, S. R. Heckbert and B. M. Psaty, HMG CoA reductase inhibitors and the risk of venous thrombosis among postmenopausal women, *J Thromb Haemost*, 2 (2004), 700-1.

[58] A. D. Baron, Vascular reactivity, *Am J Cardiol*, 84 (1999), 25J-27J.

[59] H. O. Steinberg, G. Brechtel, A. Johnson, N. Fineberg and A. D. Baron, Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release, *J Clin Invest*, 94 (1994), 1172-9.

[60] I. A. Ferreira, A. I. Mocking, M. A. Feijge, G. Gorter, T. W. van Haeften, J. W. Heemskerk and J. W. Akkerman, Platelet inhibition by insulin is absent in type 2 diabetes mellitus, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26 (2006), 417-22.

[61] N. A. Englyst, J. M. Taube, T. J. Aitman, T. P. Baglin and C. D. Byrne, A novel role for CD36 in VLDL-enhanced platelet activation, *Diabetes*, 52 (2003), 1248-55.

[62] K. Gertow, K. H. Pietilainen, H. Yki-Jarvinen, J. Kaprio, A. Rissanen, P. Eriksson, A. Hamsten and R. M. Fisher, Expression of fatty-acid-handling proteins in human adipose tissue in relation to obesity and insulin resistance, *Diabetologia*, 47 (2004), 1118-25.

[63] G. E. Jarvis, B. T. Atkinson, D. C. Snell and S. P. Watson, Distinct roles of GPVI and integrin alpha(2)beta(1) in platelet shape change and aggregation induced by different collagens, *Br J Pharmacol*, 137 (2002), 107-17.

[64] M. Mesri and D. C. Altieri, Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway, *J Biol Chem*, 274 (1999), 23111-8.

[65] A. Agouni, A. H. Lagrue-Lak-Hal, P. H. Ducluzeau, H. A. Mostefai, C. Draunet-Busson, G. Leftheriotis, C. Heymes, M. C. Martinez and R. Andriantsitohaina, Endothelial dysfunction caused by circulating microparticles from patients with metabolic syndrome, *Am J Pathol*, 173 (2008), 1210-9.

[66] O. Morel, F. Toti, B. Hugel, B. Bakouboula, L. Camoin-Jau, F. Dignat-George and J. M. Freyssinet, Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation?, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26 (2006), 2594-604.

[67] M. J. Alkhatatbeh, N. M. Mhaidat, A. K. Enjeti, L. F. Lincz and R. F. Thorne, The putative diabetic plasma marker, soluble CD36, is non-cleaved, non-soluble and entirely associated with microparticles, *J Thromb Haemost*, 9 (2011), 844-51.

[68] M. S. Phillips, Q. Liu, H. A. Hammond, V. Dugan, P. J. Hey, C. J. Caskey and J. F. Hess, Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat, *Nat Genet*, 13 (1996), 18-9.

[69] R. Subramanian and K. M. MacLeod, Age-dependent changes in blood pressure and arterial reactivity in obese Zucker rats, *Eur J Pharmacol*, 477 (2003), 143-52.

[70] E. Cosson, P. Valensi, D. Laude, D. Mesangeau and H. Dabire, Arterial stiffness and the autonomic nervous system during the development of Zucker diabetic fatty rats, *Diabetes Metab*, 35 (2009), 364-70.

[71] J. Hiraoka-Yamamoto, Y. Nara, N. Yasui, Y. Onobayashi, S. Tsuchikura and K. Ikeda, Establishment of a new animal model of metabolic syndrome: SHRSP fatty (fa/fa) rats, *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 31 (2004), 107-9.

[72] M. Collison, A. M. Glazier, D. Graham, J. J. Morton, M. H. Dominiczak, T. J. Aitman, J. M. Connell, G. W. Gould and A. F. Dominiczak, Cd36 and molecular mechanisms of insulin resistance in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat, *Diabetes*, 49 (2000), 2222-6.
[73] Y. Tada, S. Kagota, M. Matsumoto, Y. Naito, H. Shibata, N. Nejime, T. Tsujino, M. Koshiba, T. Masuyama and K. Shinozuka, Characterization of cardiac size and function in SHRSP.Z-Lepr(fa)/IzmDmcr rats, a new animal model of metabolic syndrome, *Biol Pharm Bull*, 33 (2010), 1971-6.
[74] Y. Anini and P. L. Brubaker, Role of leptin in the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion, *Diabetes*, 52 (2003), 252-9.
[75] T. Abumiya, J. Masuda, J. Kawai, T. Suzuki and J. Ogata, Heterogeneity in the appearance and distribution of macrophage subsets and their possible involvement in hypertensive vascular lesions in rats, *Lab Invest*, 75 (1996), 125-36.
[76] T. Abumiya, T. Sakata, K. Enjyoji, H. Kato, J. Kawai, T. Suzuki, J. Masuda, T. Sasaguri and J. Ogata, Does hypertension confer a hypercoagulable state in stroke-prone spontaneously hypertensive rats?, *J Hypertens*, 18 (2000), 901-9.
[77] T. Ishizuka, P. Ernsberger, S. Liu, D. Bedol, T. M. Lehman, R. J. Koletsky and J. E. Friedman, Phenotypic consequences of a nonsense mutation in the leptin receptor gene (fak) in obese spontaneously hypertensive Koletsky rats (SHROB), *J Nutr*, 128 (1998), 2299-306.
[78] S. Koletsky, Pathologic findings and laboratory data in a new strain of obese hypertensive rats, *Am J Pathol*, 80 (1975), 129-42.
[79] P. Ernsberger, R. J. Koletsky, D. D. Kline, D. M. Bedol and J. E. Friedman, The SHROB model of syndrome X: effects of excess dietary sucrose, *Ann N Y Acad Sci*, 892 (1999), 315-8.
[80] T. Kumai, S. Oonuma, Y. Kitaoka, M. Tadokoro and S. Kobayashi, Biochemical and morphological characterization of spontaneously hypertensive hyperlipidaemic rats, *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 30 (2003), 537-44.
[81] K. Okamoto, S. Nosaka, Y. Yamori and M. Matsumoto, Participation of neural factor in the pathogenesis of hypertension in the spontaneously hypertensive rat, *Jpn Heart J*, 8 (1967), 168-80.
[82] Y. Zhang, R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold and J. M. Friedman, Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue, *Nature*, 372 (1994), 425-32.
[83] A. J. Kennedy, K. L. Ellacott, V. L. King and A. H. Hasty, Mouse models of the metabolic syndrome, *Dis Model Mech*, 3 (2010), 156-66.
[84] H. Hyogo, S. Roy and D. E. Cohen, Restoration of gallstone susceptibility by leptin in C57BL/6J ob/ob mice, *J Lipid Res*, 44 (2003), 1232-40.

[85] D. L. Silver, X. C. Jiang and A. R. Tall, Increased high density lipoprotein (HDL), defective hepatic catabolism of ApoA-I and ApoA-II, and decreased ApoA-I mRNA in ob/ob mice. Possible role of leptin in stimulation of HDL turnover, *J Biol Chem*, 274 (1999), 4140-6.
[86] J. E. Quigley, A. A. Elmarakby, S. F. Knight, M. M. Manhiani, D. W. Stepp, J. J. Olearzcyk and J. D. Imig, Obesity induced renal oxidative stress contributes to renal injury in salt-sensitive hypertension, *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 36 (2009), 724-8.
[87] C. Christoffersen, E. Bollano, M. L. Lindegaard, E. D. Bartels, J. P. Goetze, C. B. Andersen and L. B. Nielsen, Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice, *Endocrinology*, 144 (2003), 3483-90.
[88] F. Dong, X. Zhang, X. Yang, L. B. Esberg, H. Yang, Z. Zhang, B. Culver and J. Ren, Impaired cardiac contractile function in ventricular myocytes from leptin-deficient ob/ob obese mice, *J Endocrinol*, 188 (2006), 25-36.
[89] S. J. Swoap, Altered leptin signaling is sufficient, but not required, for hypotension associated with caloric restriction, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281 (2001), H2473-9.
[90] P. F. Bodary, R. J. Westrick, K. J. Wickenheiser, Y. Shen and D. T. Eitzman, Effect of leptin on arterial thrombosis following vascular injury in mice, *JAMA*, 287 (2002), 1706-9.
[91] P. F. Bodary, S. Gu, Y. Shen, A. H. Hasty, J. M. Buckler and D. T. Eitzman, Recombinant leptin promotes atherosclerosis and thrombosis in apolipoprotein E-deficient mice, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25 (2005), e119-22.
[92] D. J. Lloyd, J. McCormick, J. Helmering, K. W. Kim, M. Wang, P. Fordstrom, S. A. Kaufman, R. A. Lindberg and M. M. Veniant, Generation and characterization of two novel mouse models exhibiting the phenotypes of the metabolic syndrome: Apob48-/-Lepob/ob mice devoid of ApoE or Ldlr, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294 (2008), E496-505.
[93] J. R. Ortlepp, R. Kluge, K. Giesen, L. Plum, P. Radke, P. Hanrath and H. G. Joost, A metabolic syndrome of hypertension, hyperinsulinaemia and hypercholesterolaemia in the New Zealand obese mouse, *Eur J Clin Invest*, 30 (2000), 195-202.
[94] C. Marchesi, T. Ebrahimian, O. Angulo, P. Paradis and E. L. Schiffrin, Endothelial nitric oxide synthase uncoupling and perivascular adipose oxidative stress and inflammation contribute to vascular dysfunction in a rodent model of metabolic syndrome, *Hypertension*, 54 (2009), 1384-92.
[95] M. A. Miller, C. R. Spillert, R. Ponnudurai, S. Bonthu and E. J. Lazaro, Are hypertensives hypercoagulable?, *J Natl Med Assoc*, 87 (1995), 71-2.

[96] M. Diamant, R. Nieuwland, R. F. Pablo, A. Sturk, J. W. Smit and J. K. Radder, Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus, *Circulation*, 106 (2002), 2442-7.

[97] V. Regnault, C. Perret-Guillaume, A. Kearney-Schwartz, J. P. Max, C. Labat, H. Louis, D. Wahl, B. Pannier, T. Lecompte, G. Weryha, P. Challande, M. E. Safar, A. Benetos and P. Lacolley, Tissue factor pathway inhibitor: a new link among arterial stiffness, pulse pressure, and coagulation in postmenopausal women, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31 (2011), 1226-32.

[98] A. A. Ajayi, H. Hercule, J. Cory, B. E. Hayes and A. O. Oyekan, Gender difference in vascular and platelet reactivity to thromboxane A(2)-mimetic U46619 and to endothelial dependent vasodilation in Zucker fatty (hypertensive, hyperinsulinemic) diabetic rats, *Diabetes Res Clin Pract*, 59 (2003), 11-24.

[99] H. Gomibuchi, M. Okazaki, S. Iwai, T. Kumai, S. Kobayashi and K. Oguchi, Development of hyperfibrinogenemia in spontaneously hypertensive and hyperlipidemic rats: a potentially useful animal model as a complication of hypertension and hyperlipidemia, *Exp Anim*, 56 (2007), 1-10.

[100] L. A. Sechi, M. Novello, G. Colussi, A. Di Fabio, A. Chiuch, E. Nadalini, A. Casanova-Borca, A. Uzzau and C. Catena, Relationship of plasma renin with a prothrombotic state in hypertension: relevance for organ damage, *Am J Hypertens*, 21 (2008), 1347-53.

[101] S. S. Anand, Q. Yi, H. Gerstein, E. Lonn, R. Jacobs, V. Vuksan, K. Teo, B. Davis, P. Montague and S. Yusuf, Relationship of metabolic syndrome and fibrinolytic dysfunction to cardiovascular disease, *Circulation*, 108 (2003), 420-5.

[102] M. Kaminska, A. Mogielnicki, A. Stankiewicz, K. Kramkowski, T. Domaniewski, W. Buczko and E. Chabielska, Angiotensin II via AT1 receptor accelerates arterial thrombosis in renovascular hypertensive rats, *J Physiol Pharmacol*, 56 (2005), 571-85.

[103] C. S. Coffey, F. W. Asselbergs, P. R. Hebert, H. L. Hillege, Q. Li, J. H. Moore and W. H. van Gilst, The Association of the Metabolic Syndrome with PAI-1 and t-PA Levels, *Cardiol Res Pract*, 2011 (2011), 541467.

[104] P. Sawathiparnich, L. J. Murphey, S. Kumar, D. E. Vaughan and N. J. Brown, Effect of combined AT1 receptor and aldosterone receptor antagonism on plasminogen activator inhibitor-1, *J Clin Endocrinol Metab*, 88 (2003), 3867-73.

[105] A. W. Dielis, M. Smid, H. M. Spronk, A. J. Houben, K. Hamulyak, A. A. Kroon, H. Ten Cate and P. W. de Leeuw, Changes in fibrinolytic activity after angiotensin II receptor blockade in therapy-resistant hypertensive patients, *J Thromb Haemost*, 5 (2007), 1509-15.

[106] Y. Dorffel, G. Wallukat, N. Bochnig, V. Homuth, M. Herberg, W. Dorffel, A. Pruss, R. Chaoui and J. Scholze, Agonistic AT(1) receptor autoantibodies and monocyte stimulation in hypertensive patients, *Am J Hypertens*, 16 (2003), 827-33.
[107] T. W. Kurtz, R. C. Morris and H. A. Pershadsingh, The Zucker fatty rat as a genetic model of obesity and hypertension, *Hypertension*, 13 (1989), 896-901.
[108] W. Paul, L. R. Queen, C. P. Page and A. Ferro, Increased platelet aggregation in vivo in the Zucker Diabetic Fatty rat: differences from the streptozotocin diabetic rat, *Br J Pharmacol*, 150 (2007), 105-11.
[109] A. K. Sista, M. K. O'Connell, T. Hinohara, S. S. Oommen, B. E. Fenster, A. J. Glassford, E. A. Schwartz, C. A. Taylor, G. M. Reaven and P. S. Tsao, Increased aortic stiffness in the insulin-resistant Zucker fa/fa rat, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289 (2005), H845-51.
[110] S. Koletsky, Animal model: obese hypertensive rat, *Am J Pathol*, 81 (1975), 463-6.

Figures Legends

Figure 1: Proposed Relation between Metabolic Syndrome and obesity-related-hypertension.
Ang: Angiotensin; ACE: Angiotensin converting enzyme; ATR: Angiotensin receptor; AGT angiotensinogen; TNF-α: Tumor necrotic factor-alpha

Figure 2: Involvement of hypertension, hypercoagulability and metabolic syndrome in cardiovascular disease.
CVD: cardiovascular disease; RAAS: Renin angiotensin aldosterone system;

Table 1: Main abnormalities that characterise the different rat and mouse strains that could be used as an animal model of MetS and its interactions with hypertension and/or coagulation

Model	Description	Hyperlipidemia	IR	Hypertension	Hypercoagulability	Model for studying	References
Rat							
Obese Zucker	Leptin receptor-/-	Yes	Yes	Yes	Prothrombotic state	MetS and interactions with hypertension	[69, 70, 107-109]
SHR-SP	Spontaneous hypertension	No	Yes	Yes	Hemorrhagic lesions, hypocoagulative state	Hypertension and interaction with coagulation	[72, 75, 76]
SHR-SP fatty	Spontaneous Hypertension Leptin receptor-/-	Yes	Yes	Yes	ND	Obesity, hyperlipidemia and interaction with hypertension	[71-73]
Obese SHR	Spontaneous Hypertension	Yes	Yes	Yes	ND	Hypertension and interaction with MetS	[79, 110]
SHHR	Spontaneous Hypertension hyperlipideamic	Yes	Yes	Yes	Hyperfibrinogenemia, hypercoagulation	Hypertension, hyperlipidemia and theirs interactions with coagulation	[42, 80, 99]

Mice							
Lepob/ob	Leptin-deficient mice	Yes	Yes	Yes	Less thrombosis,	Hypertension, coagulation, and their interaction with MetS	[82, 83, 87, 89]
LepRdb/db	Leptin receptor-deficient mice	Yes	Yes	Yes	Less thrombotic following onset of vascular injury hypertensive	Hypertension, coagulation, and their interaction with MetS	[13, 14, 83, 90]
$Ldlr^{-/-}$ $Lep^{ob/ob}$ $Apob48^{-/-}$ $Lep^{ob/ob}$ mice	Leptin and Leptin receptor deficient mice	Yes	Yes	Yes	ND	MetS and its interactions with hypertension	[92]
New Zealand obese mice	Leptin receptor-mutant mice	Yes	Yes	Yes	ND	MetS, hyperlipidemia and their interactions with hypertension	[93, 94]

Figure 1

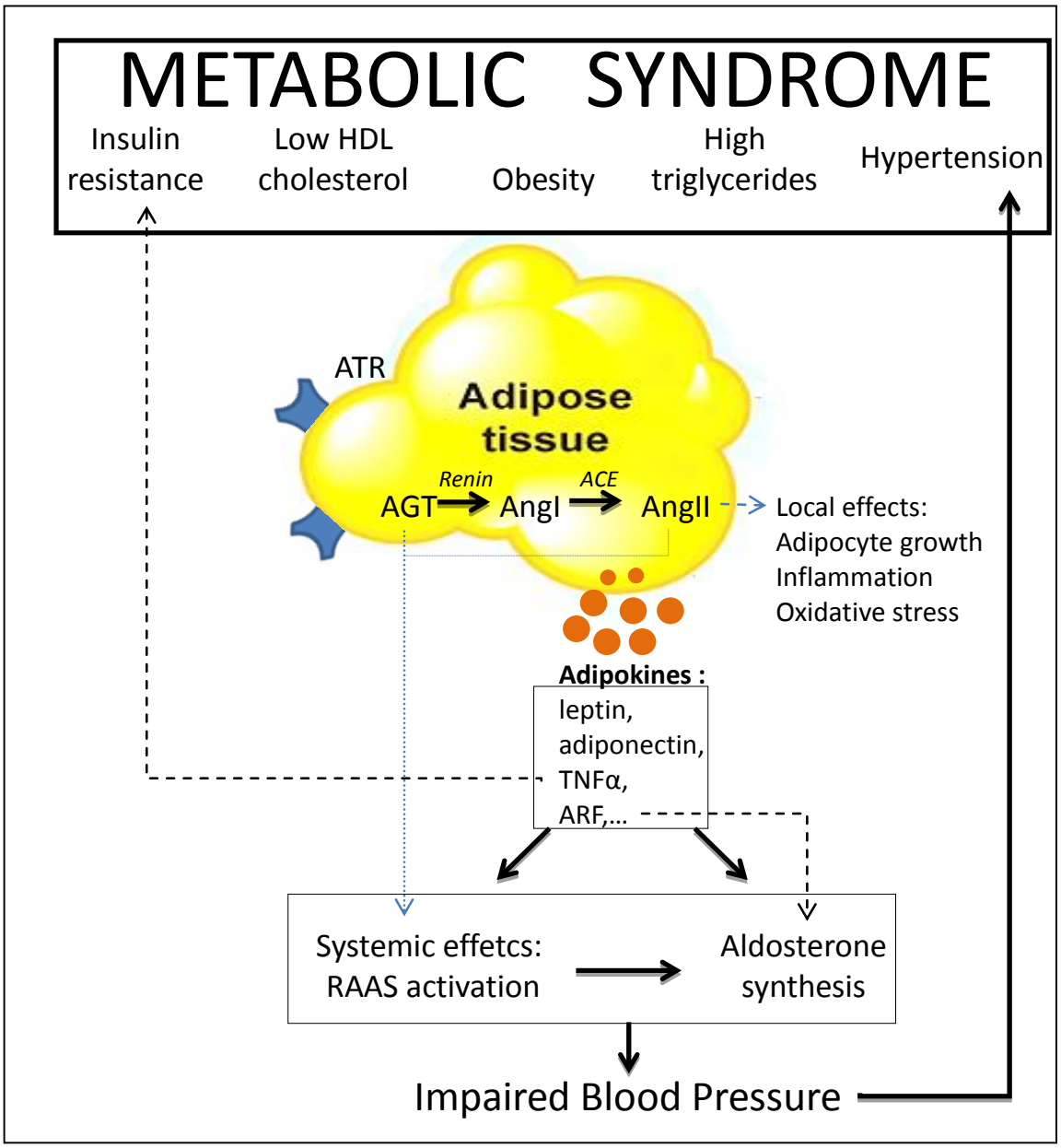
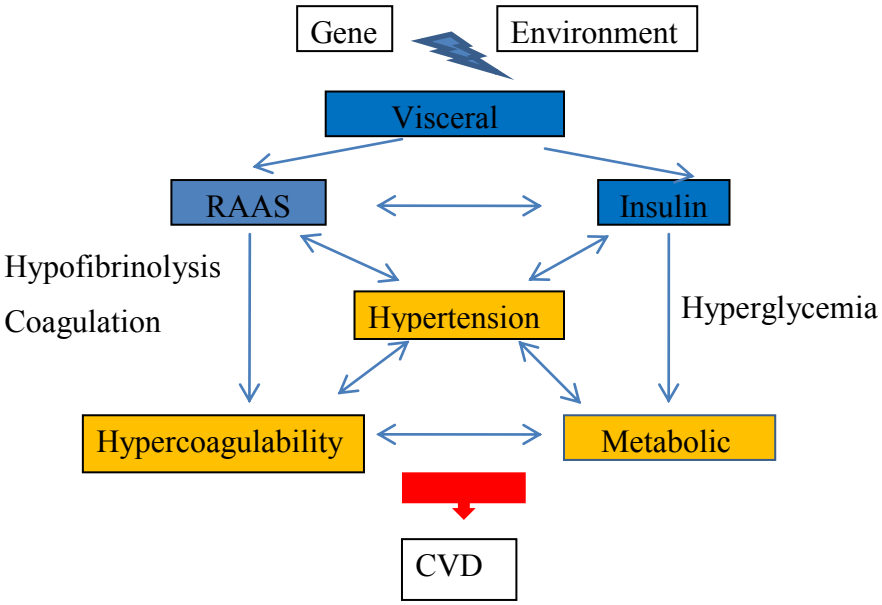

METABOLIC SYNDROME
Insulin resistance
Low HDL cholesterol
Obesity
High triglycerides
Hypertension
ATR
Adipose tissue
Renin
ACE
AGT
AngI
AngII
Local effects:
Adipocyte growth
Inflammation
Oxidative stress
Adipokines :
leptin,
adiponectin,
TNFα,
ARF,...
Systemic effetcs:
RAAS activation
Aldosterone synthesis
Impaired Blood Pressure

Figure 2


Gene
Environment
Visceral
RAAS
Insulin
Hypofibrinolysis
Coagulation
Hypertension
Hyperglycemia
Hypercoagulability
Metabolic
CVD

Cyclic stretch-induced thrombin generation by rat vascular smooth muscle cells is mediated by the integrin $\alpha_V\beta_3$ signalling pathway

Xianqing Mao[1,2*], Rose Said[1,2*], Huguette Louis[1,2], Jean-Pierre Max[1,2], Denis Wahl[1,2], Zhenlin Li[3], Veronique Regnault[1,2], Patrick Lacolley[1,2]

[1]INSERM, U961, Vandoeuvre-les-Nancy, France
[2]Nancy Université, Nancy, France
[3]UPMC Université Paris 06, Paris, France

* contributed equally to this work

Short title: Vascular thrombin generation by cyclic stretch

Text: 5846 words including references and figure legends
Abstract: 200 words
Figures: 6

Corresponding author: Patrick Lacolley, Inserm U961, Faculté de Médecine, 9 avenue de la forêt de Haye, 54500 Vandoeuvre-les-Nancy, France. Tel 33 3 83683621, Fax 33 3 83683639; mail: Patrick.Lacolley@nancy.inserm.fr

ABSTRACT

Objective–To examine whether cyclic mechanical stretch increases thrombin generation at the surface of rat vascular smooth muscle cells (VSMCs) and to identify the mechanotransduction pathways involved.

Methods and results–We used a model of cultured rat aortic VSMCs submitted to cyclic stretch (Flexcell, 10% at 1 Hz). Cyclic stretch during 60 and 360 minutes induced a differentiated contractile VSMC phenotype without apoptosis and up-regulated integrin $\alpha_v\beta_3$ expression 1.3 fold. Cyclic stretch stimulated binding of prothrombin to VSMCs and increased the subsequent thrombin generation by 67% and 30% respectively. It also produced time-dependent phosphorylation of Src, FAK and Akt as well as increased ILK phosphorylation at 15 minutes. Talin cleavage was increased between 5 and 60 minutes. The $\alpha_v\beta_3$ antagonist cRGDPV and α_v-siRNA blocked these responses. A talin-siRNA decreased stretch-induced α_v expression and the phosphorylation of Src, FAK, Akt and ILK. ILK-siRNA had no effect on α_v expression but inhibited phosphorylation of Akt and talin at 360 minutes.

Conclusions–These results demonstrate that cyclic stretch stimulates the generation of thrombin on rat VSMCs via activation of integrin $\alpha_v\beta_3$ pathways. They further suggest that intravascular generation of thrombin may be regulated by integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonists in patients with high pulse pressure.

Key words: integrin, signal transduction, vascular smooth muscle cell, thrombin generation, mechanical stretch

INTRODUCTION

The coagulation process is determined by the presence of coagulation factors, an appropriate procoagulant phospholipid surface and receptors. The most commonly known cell surface on which thrombin generation occurs is the platelet membrane. Thrombin generation on the surface of vascular smooth muscle cells (VSMCs) was first demonstrated on apoptotic cells[1] and then on non-apoptotic cells in the absence of platelets and platelet-derived microparticles.[2,3] More recently, Campbell et al. have shown that cultured VSMCs, in contrast to endothelial cells, supported robust thrombin generation leading to the formation of a stable dense fibrin network.[4] Finally, the initiation and propagation phases of tissue factor-induced thrombin generation on the surface of VSMCs is accelerated by low α-thrombin concentrations via protease-activated receptors 3 and 4.[5] The contribution of vascular intramural thrombin generation refers to modulation of proliferation and migration of VSMC[6] as well as the extent of prothrombotic responses in vascular injury and atherosclerotic plaques.[7]

Cyclic mechanical forces regulate many VSMC functions and enhance thrombin activity via protease-activated receptor 1.[8] We have recently shown that mechanical stretch (10%, 1 Hz) for up to 48 hours increases the production and secretion of tissue factor pathway inhibitor by VSMCs *in vitro*, a process which requires pulsatility.[9] Thus, we suppose that mechanical cyclic stretch might modulate the expression of coagulation proteins by VSMCs and subsequently the thrombin generation at their surface. Integrin $\alpha_v\beta_3$ is expressed at high density on VSMCs *in vivo* and mediates attachment to vitronectin and to other proteins that display accessible Arg-Gly-Asp motifs.[10] Integrin $\alpha_v\beta_3$ has been implicated in the mechanosensitive proliferative response of VSMCs via activation of PI3-K/Akt[11] and in the prevention of mechanical stretch-induced apoptosis of VSMCs.[12] Integrin $\alpha_v\beta_3$ may also function as a receptor for prothrombin in VSMCs.[13] However, the coupling between $\alpha_v\beta_3$ for localizing prothrombin at the surface of VSMCs and thrombin generation at rest and under cyclic stretch has not been elucidated.

Our objective was to examine whether cyclic mechanical stretch increases the ability of primary cultured VSMCs to support thrombin generation and the mechanism involved in this response. We have quantified cell differentiation under acute cyclic stretch and measured the generation of thrombin at the surface of primary rat VSMC cultures. The involvement of $\alpha_v\beta_3$ and its signaling was assessed by using the $\alpha_v\beta_3$ antagonist peptide cRGDPV and siRNAs against α_v subunit and its target molecules talin and integrin linked kinase (ILK).

The results demonstrate, for the first time, that cyclic stretch stimulates adhesion of VSMCs to prothrombin and thrombin generation *via* $\alpha_v\beta_3$. Moreover, we have identified Src, Akt and talin as specific factors involved in cyclic stretch-induced $\alpha_v\beta_3$ signaling. These findings suggest that pulsatile stretch *in vivo* is a determinant of intramural vascular thrombin generation.

Methods

Cell culture and cyclic stretch

VSMCs derived from thoracic aorta of 6-week old Wistar rats were used at passage 4-8. Studies were conducted on VSMCs grown to sub-confluence in DMEM/F12 supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) followed by serum withdrawal (the FBS is decreased from 10 to 0.5%) for 2 days to achieve quiescence.

For stretch experiments, VSMCs were seeded at 3×10^5 cells/well onto 6-well collagen-coated silicone elastomer-bottomed plates (BioFlex). Cells were subjected to cyclic stretch (equiaxial stretch of 10% at a frequency of 1 Hz) in a FX-4000T Flexercell Strain Unit (Flexcell). Cells cultured without stretch were used as the control group.

To test the effects of specific inhibition of $\alpha_v\beta_3$ mechanotransduction, the cells were incubated, before experiments, with a cyclic RGD peptide, Cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val) or the inactive control RAD peptide Cyclo(-Arg-Ala-Asp-D-Phe-Val) (Bachem, Bubendorf, Switzerland), at the concentrations and times indicated.

Silencing RNA (siRNA) specific for α_v, α_5, talin 1, ILK or negative control were synthesised by GeneCust Europe (Luxembourg). Cells seeded at 8×10^5 cells/well were transfected for 24 hours with these siRNA in DMEM/F12 containing 10% FBS using magnet assisted transfection according to the manufacturer's protocol (IBA GmbH, Göttingen, Germany). The medium was then removed and replaced by DMEM/F12 containing 0.5% FBS for 48 hours before stretch.

Isolation of RNA and gene expression

Total RNA was isolated from the VSMCs with the RNeasy Mini kit (Qiagen). First-strand cDNA was synthesised according to the manufacturer's instructions (Fermentas). Quantitative real-time PCR analysis was then performed with SYBR green PCR technology (Bio-Rad) using the following conditions: 10 seconds at 95°C; 45 seconds at 62°C; 60 seconds at 72°C, repeated for 40 cycles.

For each target gene, results from at least three independent RT-PCR analyses were expressed relative to the glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression. Primer sequences are listed in the Supplemental Material (Supplemental Table).

Western blot analysis

Cell extracts were obtained by lysing VSMCs in complete Lysis-M buffer (Roche Diagnostics Corporation, Basel, Switzerland). Detergent-soluble fractions were retained, and protein concentrations in samples were determined using a Bradford protein assay (Bio-Rad). Lysates containing 20 μg of protein were electrophoresed on polyacrylamide gels, transferred to Hybond-C nitrocellulose membranes and blotted with the following antibodies: α-smooth muscle actin (αSMA), talin, ILK and α-tubulin (Sigma; 1:4000, 1:200, 1:10,000 and 1:2000 respectively); smooth muscle myosin heavy chain (SM-MHC; Biomedical Technologies; 1:100); integrin α_1, phospho-ILK(Thr173), Bcl2 and CHOP-Bcl2-associated X protein (Bax) (Santa Cruz; 1:500); integrins α_5, α_v, β_1 and β_3 (Chemicon; 1:1000); ERK1/2 and phospho-ERK1/2(Thr202/Tyr204), FAK and phospho-FAK(Tyr576/577), Akt and phospho-Akt(Thr308) (Cell Signal; 1:1000); Src (Abcam; 1:40); phospho-Src(Tyr418) (Invitrogen; 1:1000). Reactions were visualised by the ECL Western Blot Detection Kit (Bio-Rad) after incubation with peroxidase conjugates (GE Healthcare; 1:2000).

Immunofluorescence and confocal analysis

Cells were fixed with paraformaldehyde (4% w/v in Tris buffer saline-TBS) for 10 minutes, permeabilised with Triton X-100 (0.5% v/v in TBS) for 15 minutes and then incubated for 1 hour at room temperature with an anti-αSMA antibody (1A4-Sigma) prepared in TBS containing 1% BSA and 0.5% Tween 20. After three washes with TBS, the Alexa-Fluor488-labelled secondary antibody was incubated with the cells for 1 hour at room temperature. Cells were then observed by fluorescence confocal microscopy (LEICA DMIRE2 HC Fluo TCS 1-B, Germany) using the 488 nm spectral line.

Annexin V/propidium iodide double staining assay

Apoptosis was examined by a double staining method using the fluorescein-isothiocyanate (FITC)-labelled annexin V/propidiumiodide (PI) apoptosis detection kit (Sigma) according to the manufacturer's instructions. Briefly, trypsinized VSMCs were washed in phosphate-buffered saline (PBS) twice, and stained with FITC-conjugated annexin V and PI dyes. The

externalization of phosphatidylserine (PS) and the permeability to PI were evaluated by fluorescence-activated cell sorting (FACS) on a Gallios flow-cytometer (Beckman Coulter). Data from 10,000 events per sample were collected. Cells in early stages of apoptosis were positively stained with annexin V whereas cells in late apoptosis were positively stained with both annexin V and PI.

Vascular smooth muscle cell function

VSMCs were washed with PBS and harvested by gentle trypsinization (0.25% trypsin with 0.01% EDTA; Sigma). Cells were collected in DMEM/F12 containing 10% FBS, immediately centrifuged at 500 g for 10 minutes and then washed with HBS for functional assays.

Cell adhesion assay. Adhesion of VSMCs to prothrombin was measured as previously described.14 Briefly, 96-well microtiter plates (BD Falcon) were precoated with bovine prothrombin (Synapse B.V., Maastricht, The Netherlands) for 1 hour at 37°C (4 μg/well in 50 mM NaHCO3, 150 mM NaCl, pH 8.0). Each well was washed twice with PBS and post-coated with 1% BSA in PBS for 30 minutes at room temperature. Cells were adjusted to 5×105 cells/mL in DMEM/F12 and allowed to adhere for 30 minutes at 37°C. Wells were rinsed 3 times with PBS and adherent cells were fixed with cold methanol for 10 minutes and stained with 0.1% Syto-green for 20 minutes at room temperature. Absorbance was measured at 525 nm using an Emax microplate reader (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Fluorogenic measurement of thrombin activity. Calibrated automated thrombography was performed at 37°C in a microtiter plate fluorometer (Fluoroskan Ascent, ThermoLabsystems, Helinski, Finland) using a dedicated software program (Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands),15 and was adapted for rat VSMC cell surfaces. Venous blood from healthy donors was drawn into 0.106 M sodium citrate (9:1 vol/vol). Normal pooled platelet-free plasma (PFP) was prepared by sequential centrifugation (190g for 10 minutes, 1750g for 10 minutes and 13000g for 30 minutes), aliquoted and frozen at –80°C. Thrombin generation curves were recorded with PFP and VSMCs at 1.25×105/mL (final concentration). Coagulation was triggered by re-calcification in the presence of 0.25 pM recombinant human tissue factor (Dade Behring, Marburg, Germany). Total generated thrombin activity (endogenous thrombin potential, ETP) was assessed as the area under the curve.

Phospholipid Procoagulant Activity measurement. The chromogenic assay measuring the phospholipid-related procoagulant activity (PPA) in VSMC suspensions was performed as previously described for platelets.16 Fifty μL of VSMC suspension, adjusted to 3×106

cells/mL in 50 mM Tris, 175 mM NaCl, pH 7.9, were added to wells containing 50 µL of factor Xa (1.2 nM), factor Va (2.4 nM), CaCl2 (15 mM) and 50 µL of bovine prothrombin (6 µM) and S2238 substrate (0.6 mM). After 5 minutes in the dark at room temperature, the absorbance change was read at 405 nm at 37°C. The phospholipid concentration was estimated from the initial rate of thrombin formation by reference to a standard curve constructed with a mixture of phosphatidyl-serine, -ethanolamine and -choline (20:20:60 mole%), and expressed as PS equivalents.

Statistical analysis

Results are given as means ± SEM. Statistical comparisons between 2 groups were made using the Student's t-test for unpaired or paired data as appropriate. A trend ANOVA was performed to analyse dose-response curves with peptides. Significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Integrin αvβ3 is implicated in thrombin generation at the surface of VSMCs without stretch

The aim of the first set of experiments was to determine whether thrombin generation at the surface of rat VSMCs can be studied using human PFP since availability of plasma in small animals is limited. Using human PFP, Figure 1 shows a lower generation of thrombin on rat VSMCs than on human ones (615±31 versus 972±41 nM.min respectively, n=5; P=0.001) but with a similar global profile and equivalent levels of procoagulant surfaces (879±108 versus 861±110 nM PS equivalents respectively, n=5; P=0.91). Thus it was possible to measure the thrombin generation curve parameters and to calculate the ETP value assessed as the area under the curve in such a heterologous system.

The second step was to examine the involvement of integrin αvβ3 in thrombin generation at the surface of VSMCs by focusing on the effect of the linear peptide (RGD) and the αvβ3 antagonist peptide cRGDPV, or using a siRNA against the αv subunit. RGD peptides were incubated with cells for 30 minutes at 37°C. Figure 2A shows a concentration-dependent decrease in ETP in the presence of cRGDPV or RGD peptides compared with the control peptide (cRADPV). No modification in PPA accompanied this decrease (Figure 2B). Using αv-siRNA which inhibited the αv protein level by 40% (Figure 2C), the lag time and time to thrombin peak were prolonged, thrombin peak and velocity index were decreased while the inhibition part of the curve was not affected (Figure 2D). We found that ETP was reduced by

20% with no change in PPA (Figure 2E). Thus, integrin αvβ3 is involved in thrombin formation on rat VSMCs without stretch.

Effects of cyclic stretch on VSMC differentiation and expression of integrins

Firstly, we analysed the expression of αSMA by confocal microscopy. No difference was found in the distribution of αSMA after 60 or 360 minutes of stretch (Figure 3A). Figure 3B shows flow cytometric measurements after double staining of VSMCs with annexin V and PI to assess apoptosis. No decrease in cell viability evaluated by PI staining or increase in exposure of PS assessed by annexin V staining was found in VSMCs after 60 or 360 minutes of stretch suggesting the absence of stretch-induced apoptosis. In addition, no increase in the ratio of Bax/Bcl2 protein levels was found, indicating the absence of activation of the mitochondrial apoptotic pathway (Supplemental Figure I).

Expressions of αSMA and SM-MHC served as markers for VSMC differentiation. We observed an increase in αSMA RNA expression at 30 minutes of cyclic stretch whereas the protein expression was unchanged (Figure 3C-E). Cyclic stretch also produced an increase in SM-MHC RNA expression at 30 and 60 minutes with an increase in the protein expression at 360 minutes. The data indicated that application of cyclic stretch caused increased VSMC differentiation towards a contractile phenotype. We further examined the expression profile of the major VSMC integrins. There was a time-dependent increase in the transcript and protein levels of αv and β_3 subunits in response to cyclic stretch. This response was not observed for the expression of α_1, α_5 and β_1 subunits (Figure 3C-E)

Effects of cyclic stretch on cell adhesion and thrombin generation

As shown in Figure 4A, increasing time of cyclic stretch produced a significant elevation from 5 minutes of adhesion of VSMCs to prothrombin. At 360 minutes, we found that cyclic stretch increased by 60% the adhesion of cells to prothrombin. Cyclic stretch increased the level of PPA in a time-dependent manner (Figure 4B). A typical example of the effect of cyclic stretch on thrombin generation curves is shown in Figure 4C: time-to-peak was shortened and thrombin peak and velocity index were increased while the inhibition part of the curve was not affected by cyclic stretch. Figure 4D shows an increase in ETP in the late phase of the stretch time-range, between 60 and 360 minutes; at 360 minutes, we found that cyclic stretch had increased by 30% the thrombin generating capacity. There was no increase in ETP before 30 minutes of stretch although PS increased as early as 5 minutes. This result

suggests that thrombin generation requires both PS exposure and cell receptors for coagulation factors.

Inhibition of $\alpha_v\beta_3$ down-regulated stretch-induced thrombin generation by VSMCs

To test the involvement of integrin $\alpha_v\beta_3$ in transducing the response to mechanical stretch, we examined the effects of the integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonist peptide (cRGDPV) and α_v-siRNA on α_v subunit expression, cell adhesion and thrombin generation. As control experiments, we used a siRNA against integrin α_5 subunit (Supplemental Figure IIA). Peptides were added to the medium 10 minutes before stretch at the concentration of 50 mM. We chose the time of maximal effect (360 minutes) to study the effects of RGD peptides and siRNA on adhesion and thrombin generation.

Addition of cRGDPV to the medium blocked the increase in αv protein levels at 60 and 360 minutes (Figure 5A-B). The increase in adhesion and ETP were also abrogated at 360 minutes (Figures 5C and 5D). Down-regulation of integrin α_v with α_v-siRNA significantly reduced the effects of stretch on αv protein expression at 60 and 360 minutes (Figure 5A-B). Adhesion to prothrombin and thrombin generation at 360 minutes were also inhibited by αv-siRNA (Figures 5C and 5D). Inhibition of α5 subunit expression did not block these effects of stretch.

Stretch modulation of integrin signaling pathways

A first set of experiments was designed to evaluate the kinetic activation of the integrin αvβ3 pathway in response to stretch (Figure 6A and supplemental Figure III). Cyclic stretch produced time-dependent phosphorylation of Src, FAK and Akt. All these kinases were significantly activated at 360 minutes. Cyclic stretch produced a rapid increased phosphorylation of ERK1/2 at 5 minutes followed by an inhibition until 360 minutes of cyclic stretch. Cyclic stretch induced increased phosphorylation of ILK at 15 minutes with a bell-shaped trend. The level of talin cleavage assessed by the proteolytic 190-200 kDa talin fragment corresponding to the C-terminal rod domain of the protein was significantly increased within the early phase from 5 to 60 minutes.

Effects of the integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonist peptide (cRGDPV) and α_v-siRNA

We then tested whether the cRGDPV peptide and αv-siRNA inhibited the integrin αvβ3 signaling pathway (Figure 6B-F and supplemental Figures IVA and IVC). Without cyclic stretch, only p-Akt was significantly reduced by the α_v-siRNA. In response to cyclic stretch, cRGDPV decreased the phosphorylation of all signaling pathways studied and also the

cleavage of talin at 60 and/or 360 minutes compared with the control cRADPV peptide. Likewise, αv-siRNA showed an inhibitory effect on the phosphorylation of Src, FAK, Akt, ILK as well as on the cleavage of talin at 60 and/or 360 minutes of cyclic stretch. Control experiments with a α5-siRNA showed no significant effect on these responses except an inhibitory effect on the phosphorylation of FAK and ILK at 60 and/or 360 minutes (Figure 6B-F and supplemental Figure IVB).

Effect of talin-siRNA and ILK-siRNA

Talin-siRNA (supplemental Figure IIB) reduced the expression of integrin αv both in basal conditions and after 60 and 360 minutes of stretch (supplemental Figure VA) associated with reduced phosphorylation of Src, FAK, Akt and ILK at 60 and/or 360 minutes (Figure 6B-E and supplemental Figure IVD). ILK-siRNA (supplemental Figure IIC) had no effect on αv expression (supplemental Figure VB), while it inhibited the phosphorylation of Akt and talin at 360 minutes of cyclic stretch (Figures 6D and 6F and supplemental Figure IVE).

DISCUSSION

This is the first study describing the effect of stretch on a particular function of VSMCs, i.e. their ability to support thrombin generation. The major findings from this study are that 1) integrin αvβ3 is involved in thrombin generation at the surface of rat VSMCs; 2) cyclic stretch upregulates the expression of integrin αvβ3, VSMC binding of prothrombin and the subsequent thrombin generation; and 3) the mechanisms involved include activation of the integrin $\alpha_v\beta_3$ pathways. Such phenomena may contribute to thrombotic and cellular effects of thrombin within the vascular wall in response to high pulse pressure in hypertension and age-related diseases.

Our model of cyclic stretch applied to rat VSMCs has been previously used to analyse their dynamic response to mechanical forces.[8,17] In these experiments, the effects of cyclic stretch were generally studied from 15 minutes to 48 hours, the frequency of stretch was mostly constant at 1 Hz and the elongation varied from 7 to 15 %. These studies have shown that cyclic stretch is a determinant of adhesion, migration and proliferation of VSMCs. The capacity of these cells to support thrombin generation has been studied in rat or human cultured VSMCs without stretch. These studies showed that the generation of thrombin is increased in quiescent cells compared with proliferating cells[1,3] and that this process did not require the occurrence of apoptosis.[3] We found that cyclic stretch over a 6-hour period did not

perturb cell organisation (assessed by αSMA staining in confocal microscopy) and did not increase apoptosis (PI and annexin V staining in flow cytometry), as previously shown.18,19 In addition, mRNA and protein expression analysis suggested an increased expression of smooth muscle differentiation markers (αSMA and SM-MHC) in agreement with previous studies.[12,20-22] Therefore, our model focused on thrombin formation in VSMCs in response to cyclic stretch during early stretch-induced differentiation, in the absence of apoptosis. In previous studies, the thrombin peak is the main parameter used to examine thrombin formation on VSMCs. In our study, we calculated the area under the curve (ETP) which is a more integrative parameter of thrombin generation and inhibition. Using this approach, we demonstrated that the assay is highly reproducible under experimental conditions that used trypsinized cells from stretched membranes. In these conditions, we found an increase in the thrombin-generating capacity of stretched VSMCs, which is not related to cell apoptosis.

We found that the surface expression of phosphatidylserine preceding increased thrombin generation can be detected a few minutes after the exposure of VSMCs to stretch compared with non-stimulated cells. These results support the concept that membrane binding proteins are necessary for VSMC-dependent thrombin generation.[23] We therefore elucidated the role of integrins in mechanical stretch-induced thrombin generation, in particular the involvement of integrin αvβ3 whose expression is selectively known to be increased by acute cyclic stretch.[19,24] Among the integrins we tested in VSMCs activated by cyclic stretch, only the expression of integrin αvβ3 significantly increased with a similar kinetic pattern to that of thrombin generation. Since integrin αvβ3 is a receptor for prothrombin at the VSMC surface, the generation of thrombin in absence of stretch and its enhancement by cyclic stretch is most likely mediated by this integrin.

In existing models of thrombin generation, prothrombin binding to integrin receptors provides a pool of prothrombin for activation by the factor Xa/Va complex. This concept has been proposed and validated for platelets[13, 14] but never demonstrated for VSMCs. Our results support this hypothesis since the competitive inhibition of prothrombin binding to integrin αvβ3 by RGD peptides resulted in a dose-dependent decrease in ETP values in unstretched cells and abrogated the effect of cyclic stretch. We were not able to detect activation or clustering of integrin αvβ3 since available antibodies against the activated form of integrin αvβ3 did not recognize the rat molecule using flow cytometry. Alternatively, we found that the enhanced expression of integrin αvβ3 induced by cyclic stretch was suppressed by RGD

peptides, suggesting a stimulation of integrin αvβ3 activation as a consequence of bi-directional outside-in and inside-out signaling. Moreover, we also demonstrated that invalidation of this integrin by a αv-siRNA resulted in a marked inhibition of prothrombin binding as well as thrombin generation in unstretched and stretched cells. Taken together, these findings demonstrate the involvement of integrin αvβ3 in controlling thrombin generation by VSMCs.

Using Western blot analysis, we showed that the phosphorylation of five integrin αvβ3 signaling molecules (Src, FAK, Akt, ERK and ILK) were significantly increased in stretched cells. These results demonstrate a possible activation of integrin αvβ3 by mechanical forces. The cleavage of the cytoskeletal protein talin remains the best molecular event for indirect evidence of integrin $\alpha_v\beta_3$ activation.[25,26] This integrin activation was translated into an increase in binding of prothrombin, which is known as an activation-dependent ligand for integrin αvβ3.[10,13] The rapid engagement of integrin αvβ3 was also supported by the kinetics of talin cleavage and the phosphorylation of ILK which occurred from 5 minutes and culminated at 15 minutes of stretch. The early activation of integrin αvβ3 followed by a significant increase in its expression at 30 minutes of stretch suggested a possible clustering of integrins and subsequent increased thrombin generation. In our study, the phosphorylation of Src and FAK by mechanical forces showed a modulation of VSMCs mediated by outside-in signalling whereas talin cleavage gave evidence of a bidirectional signaling. The results of the total inhibition of these dynamic signaling processes by RGD peptides, a αv-siRNA or a talin-siRNA support the conclusion that integrin αvβ3-mediated mechanotransduction may regulate thrombin generation on VSMCs. The results with the ILK siRNA are more complex to analyse since it suppressed both phosphorylation of Akt as previously shown27 and talin cleavage, without affecting Src and FAK phosphorylation. Our data rather suggest that ILK is involved in inside-out signaling as previously shown in platelets.[28]

VSMC responses to mechanical forces are involved in numerous vascular diseases including hypertension, thoracic aortic aneurysm, atherosclerosis and age-dependent arterial stiffening.[29,30] One emerging concept is that changes in VSMC phenotype are crucial in the pathogenesis of these diseases. Hemodynamic forces, in modulating thrombin generation at the surface of VSMCs, may play an important role in several cell functions such as migration, proliferation and apoptosis, as well as focal adhesion formation. In the presence of increased pulse pressure such as in systolic hypertension, enhanced thrombin production may play a

critical role in local thrombus formation.9 The role of integrin αvβ3 in VSMC-supported thrombin generation may impact current therapeutic approaches to atherothrombosis. However a potential beneficial role of direct thrombin inhibitors or anti-integrin agents would be hampered by excessive bleeding.[31-33] In particular the use of anti-integrin agents to block upstream thrombin generation within the vascular wall cannot be advocated because of the increased bleeding risk due to platelet integrin blockade. Therefore, it would be important for the future to target the specific function of VSMC integrin αvβ3 as a receptor for prothrombin. Further elucidation of the interactions between functions of integrin αvβ3 and mechanical forces in VSMCs is a major challenge for future research.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mary Osborne-Pellegrin for helpful discussion and comments on the manuscript.

SOURCES OF FUNDING

This study was supported by the Région Lorraine, the Communauté Urbaine du Grand Nancy and the ANR program ANR- 09-GENO-010.

DISCLOSURES

None.

REFERENCES

1. Flynn PD, Byrne CD, Baglin TP, Weissberg PL, Bennett MR. Thrombin generation by apoptotic vascular smooth muscle cells. Blood. 1997;89:4378-4384.

2. Bretschneider E, Braun M, Fischer A, Wittpoth M, Glusa E, Schror K. Factor Xa acts as a PDGF-independent mitogen in human vascular smooth muscle cells. Thromb Haemost. 2000;84:499-505.

3. Pathak A, Zhao R, Monroe DM, Roberts HR, Sheridan BC, Selzman CH, Stouffer GA. Thrombin generation in vascular tissue. J Thromb Haemost. 2006;4:60-67.

4. Campbell RA, Overmyer KA, Selzman CH, Sheridan BC, Wolberg AS. Contributions of extravascular and intravascular cells to fibrin network formation, structure, and stability. Blood. 2009;114:4886-4896.

5. Vidwan P, Pathak A, Sheth S, Huang J, Monroe DM, Stouffer GA. Activation of protease-activated receptors 3 and 4 accelerates tissue factor-induced thrombin generation on the surface of vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010;30:2587-2596.

6. Borissoff JI, Spronk HM, Heeneman S, ten Cate H. Is thrombin a key player in the 'coagulation-atherogenesis' maze? Cardiovasc Res. 2009;82:392-403.

7. Leroyer AS, Isobe H, Leseche 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;49:772-777.

8. Nguyen KT, Frye SR, Eskin SG, Patterson C, Runge MS, McIntire LV. Cyclic strain increases protease-activated receptor-1 expression in vascular smooth muscle cells. Hypertension. 2001;38:1038-1043.

9. Regnault V, Perret-Guillaume C, Kearney-Schwartz A, Max JP, Labat C, Louis H, Wahl D, Pannier B, Lecompte T, Weryha G, Challande P, Safar ME, Benetos A, Lacolley P. Tissue factor pathway inhibitor: a new link among arterial stiffness, pulse pressure, and coagulation in postmenopausal women. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011;31:1226-1232.

10. Byzova TV, Rabbani R, D'Souza SE, Plow EF. Role of integrin alpha(v)beta3 in vascular biology. Thromb Haemost. 1998;80:726-734.

11. Sedding DG, Hermsen J, Seay U, Eickelberg O, Kummer W, Schwencke C, Strasser RH, Tillmanns H, Braun-Dullaeus RC. Caveolin-1 facilitates mechanosensitive protein kinase B (Akt) signaling in vitro and in vivo. Circ Res. 2005;96:635-642.

12. Zhou D, Herrick DJ, Rosenbloom J, Chaqour B. Cyr61 mediates the expression of VEGF, alphav-integrin, and alpha-actin genes through cytoskeletally based mechanotransduction mechanisms in bladder smooth muscle cells. J Appl Physiol. 2005;98:2344-2354.

13. Stouffer GA, Smyth SS. Effects of thrombin on interactions between beta3-integrins and extracellular matrix in platelets and vascular cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003;23:1971-1978.

14. Byzova TV, Plow EF. Activation of alphaVbeta3 on vascular cells controls recognition of prothrombin. J Cell Biol. 1998;143:2081-2092.

15. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoord R, Lecompte T, Beguin S. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. Pathophysiol Haemost Thromb. 2003;33:4-15.

16. Membre A, Wahl D, Latger-Cannard V, Max JP, Lacolley P, Lecompte T, Regnault V. The effect of platelet activation on the hypercoagulability induced by murine monoclonal antiphospholipid antibodies. Haematologica. 2008;93:566-573.

17. Haga JH, Li YS, Chien S. Molecular basis of the effects of mechanical stretch on vascular smooth muscle cells. J Biomech. 2007;40:947-960.

18. Chapman GB, Durante W, Hellums JD, Schafer AI. Physiological cyclic stretch causes cell cycle arrest in cultured vascular smooth muscle cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2000;278:H748-754.

19. Cheng J, Zhang J, Merched A, Zhang L, Zhang P, Truong L, Boriek AM, Du J. Mechanical stretch inhibits oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells by up-regulating integrin alphavbeta3 and stablization of PINCH-1. J Biol Chem. 2007;282:34268-34275.

20. Albinsson S, Hellstrand P. Integration of signal pathways for stretch-dependent growth and differentiation in vascular smooth muscle. Am J Physiol Cell Physiol. 2007;293:C772-782.

21. Qu MJ, Liu B, Wang HQ, Yan ZQ, Shen BR, Jiang ZL. Frequency-dependent phenotype modulation of vascular smooth muscle cells under cyclic mechanical strain. J Vasc Res. 2007;44:345-353.

22. Standley PR, Obards TJ, Martina CL. Cyclic stretch regulates autocrine IGF-I in vascular smooth muscle cells: implications in vascular hyperplasia. Am J Physiol. 1999;276:E697-705.

23. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002;22:1381-1389.

24. Suzuki M, Naruse K, Asano Y, Okamoto T, Nishikimi N, Sakurai T, Nimura Y, Sokabe M. Up-regulation of integrin beta 3 expression by cyclic stretch in human umbilical endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 1997;239:372-376.

25. Harburger DS, Calderwood DA. Integrin signalling at a glance. J Cell Sci. 2009;122:159-163.

26. Moser M, Legate KR, Zent R, Fassler R. The tail of integrins, talin, and kindlins. Science. 2009;324:895-899.

27. Legate KR, Montanez E, Kudlacek O, Fassler R. ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006;7:20-31.

28. Honda S, Shirotani-Ikejima H, Tadokoro S, Maeda Y, Kinoshita T, Tomiyama Y, Miyata T. Integrin-linked kinase associated with integrin activation. Blood. 2009;113:5304-5313.

29. Hoffman BD, Grashoff C, Schwartz MA. Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction. Nature. 2011;475:316-323.

30. Qiu H, Zhu Y, Sun Z, Trzeciakowski JP, Gansner M, Depre C, Resuello RR, Natividad FF, Hunter WC, Genin GM, Elson EL, Vatner DE, Meininger GA, Vatner SF. Short communication: vascular smooth muscle cell stiffness as a mechanism for increased aortic stiffness with aging. Circ Res. 2010;107:615-619.

31. Comparison of sibrafiban with aspirin for prevention of cardiovascular events after acute coronary syndromes: a randomised trial. The SYMPHONY Investigators. Sibrafiban versus Aspirin to Yield Maximum Protection from Ischemic Heart Events Post-acute Coronary Syndromes. Lancet. 2000;355:337-345.

32. Cannon CP, McCabe CH, Borzak S, Henry TD, Tischler MD, Mueller HS, Feldman R, Palmeri ST, Ault K, Hamilton SA, Rothman JM, Novotny WF, Braunwald E. Randomized trial of an oral platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonist, sibrafiban, in patients after an acute coronary syndrome: results of the TIMI 12 trial. Thrombolysis in Myocardial Infarction. Circulation. 1998;97:340-349.

33. Shattil SJ. Signaling through platelet integrin alpha IIb beta 3: inside-out, outside-in, and sideways. Thromb Haemost. 1999;82:318-325.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Representative thrombin generation curves at the surface of rat and human VSMCs. Rat (light grey) and human (dark grey) VSMCs were collected and resuspended in human platelet-poor plasma to give a final concentration 1.25×105 cells/mL in the assay. Coagulation was triggered with 0.25 pM of tissue factor.

.

Figure 2. Selective inhibition of integrin αvβ3 by RGD peptides and αv-siRNA down-regulates thrombin generation on unstretched rat VSMCs. Thrombin generation (A) and phospholipid procoagulant activity (B) were measured at the surface of unstretched VSMCs pretreated with RGD or control peptides for 30 minutes at 37°C. C, Representative Western blot analysis and protein levels of integrin αv subunit in VSMCs transfected for 24 hours with control or αv-siRNA in DMEM/F12 containing 10% FBS and maintained in 0.5% FBS for 2 additional days. Results are expressed as fold decreases versus cells treated with a control siRNA after normalization to α-tubulin. D, Representative thrombin generation curves at the surface of cells treated with control (dark grey) or αv-siRNA (light grey). E, ETP values expressed as ratios of those obtained with the tested siRNA on values obtained with control siRNA, and PPA values on cells treated with control or αv-siRNA. VSMCs were suspended in human platelet-poor plasma to give a final concentration 1.25×105 cells/mL in the thrombin generation assay or adjusted to 3×10^6 cells/mL in the buffer assay for PPA. ETP indicates endogenous thrombin potential and PPA, phospholipid procoagulant activity. Results are means±SEM of 3 experiments performed in duplicate. * $P<0.05$ versus untreated cells using a trend ANOVA (A and B) or versus a ratio value of 1 using a paired Student's t test (C and E).

Figure 3. VSMC phenotype and integrin expression in response to cyclic stretch. Representative confocal immunofluorescence analysis of α-smooth muscle actin (A) and typical fluorescence profile in FACS analysis by double staining with annexin V and propidium iodide (B) of control unstretched and stretched (1 Hz, 10% elongation) rat VSMCs. Quantitative PCR (C) and Western blot (D and E) analysis of VSMC differentiation markers (αSMA and SM-MHC) and integrin subunits in cells subjected to cyclic stretch for the indicated time periods. PI indicates propidium iodide, αSMA, α-smooth muscle actin and SM-

MHC, smooth muscle myosin heavy chain. Results (means±SEM of 3 experiments performed in triplicate) are expressed as fold increases versus control unstretched cells after normalization to GAPDH for RNA expression or to □-tubulin for protein expression. * P<0.05 versus a ratio value of 1 using a paired Student's t test.

Figure 4. Adhesion of VSMCs to prothrombin and VSMC-supported thrombin generation in response to cyclic stretch. Rat VSMCs subjected to cyclic stretch for the indicated time period were harvested. (A) Adhesion to immobilized bovine prothrombin for 30 minutes at 37°C, (B) phospholipid procoagulant activity and thrombin generation were measured with (C), representative thrombin curves and (D), thrombin generating capacity assessed by ETP values. VSMCs were suspended in human platelet-poor plasma to give a final concentration 1.25×105 cells/mL in the thrombin generation assay or adjusted to 3×106 cells/mL in the buffer assay for PPA. ETP indicates endogenous thrombin potential and PPA, phospholipid procoagulant activity. Results are means±SEM of 3 experiments performed in triplicate. * P<0.05 versus a ratio value of 1 (A and D) or versus unstretched cells (B) using a paired Student's t test.

Figure 5. Effects of cyclic RGD peptides and α5-siRNA or αv-siRNA on integrin αvβ3 expression, cell adhesion and VSMC-supported thrombin generation. Representative Western blot analysis (A) and protein levels (B) of integrin αv subunit in VSMCs preincubated for 30 minutes at 37°C with control or RGD cyclic peptides or transfected for 24 hours with control-siRNA, α_5-siRNA or α_v-siRNA and maintained in 0.5% FBS for 2 additional days before being subjected to cyclic stretch for the indicated time period. Results are normalized to □-tubulin. Adhesion to immobilized bovine prothrombin for 30 minutes at 37°C (C) and thrombin generating capacity (D) measured after stretch of pretreated VSMCs. Results (means±SEM of 3 experiments performed in triplicate) are expressed as fold increases versus unstretched cells treated with a control peptide or a control siRNA. ETP indicates endogenous thrombin potential. * P<0.05 versus VSMCs pretreated with control peptide or siRNA at the same time of stretch using an unpaired Student's t test.

Figure 6. Effects of cyclic RGD peptides and siRNA against α_v, α_5, talin or ILK on integrin $\alpha_v\beta_3$ signaling in VSMCs in response to cyclic stretch. A, Phosphorylated levels of

Src, FAK, Akt, ERK and ILK, and protein levels of cleaved talin in VSMCs subjected to cyclic stretch for the indicated time period. Cleavage of talin was expressed as the amount of the 190-200 kDa cleavage product relative to the 225 kDa intact molecule after normalization to α-tubulin. Phosphorylated levels of Src (B), FAK (C), Akt (D), and ILK (E), and protein levels of cleaved talin (F) in cells preincubated for 30 minutes at 37°C with control or RGD cyclic peptides or transfected for 24 hours with control, α_5-, α_v-, talin- or ILK-siRNA and maintained in 0.5% FBS for 2 additional days before being subjected to cyclic stretch. Results (means±SEM of 3 experiments performed in triplicate) are expressed as fold increases versus unstretched cells treated with a control peptide or a control siRNA. * $P<0.05$ versus a ratio value of 1 using a paired Student's t test (A) or versus VSMCs pretreated with control peptide or siRNA at the same time of stretch using an unpaired Student's t test (B-F).

Figure 1

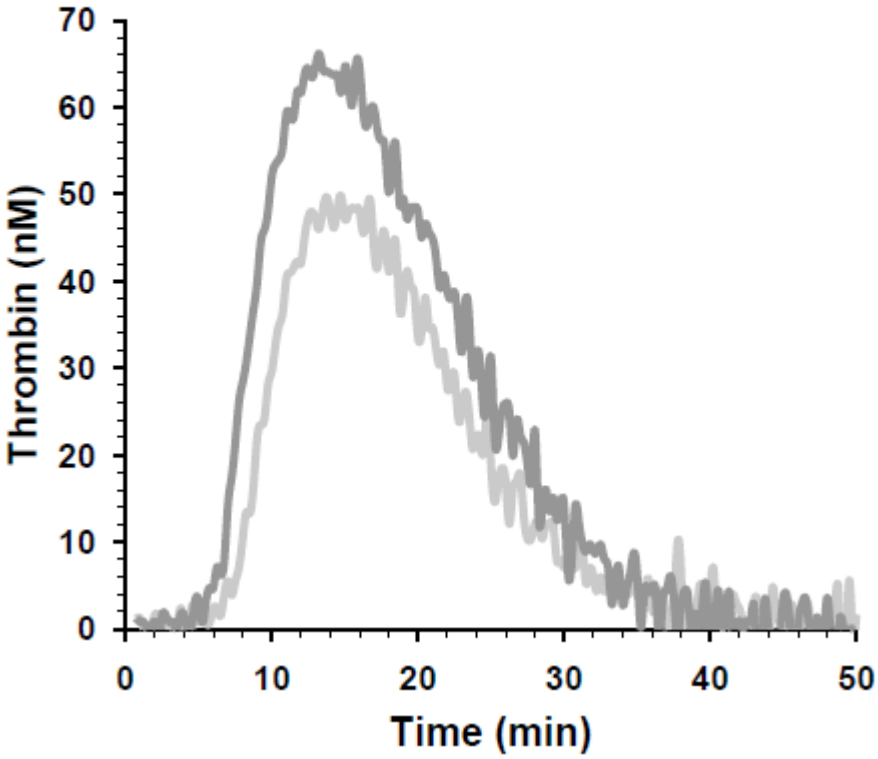


Figure 2

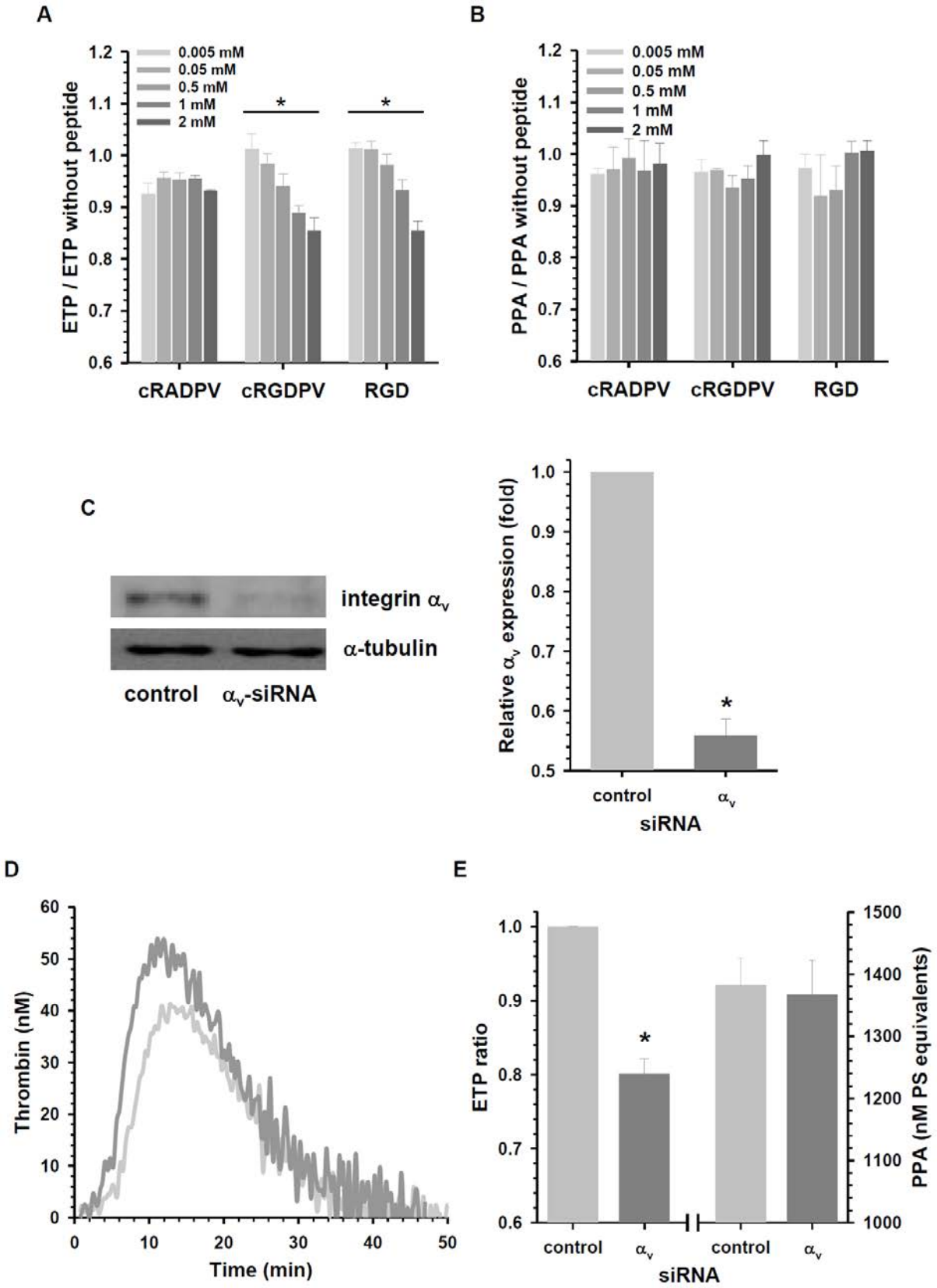

A
0.005 mM
0.05 mM
0.5 mM
1 mM
2 mM
ETP / ETP without peptide
cRADPV
cRGDPV
RGD
B
PPA / PPA without peptide
C
integrin αv
α-tubulin
control
αv-siRNA
Relative αv expression (fold)
siRNA
D
Thrombin (nM)
Time (min)
E
ETP ratio
PPA (nM PS equivalents)

Figure 3

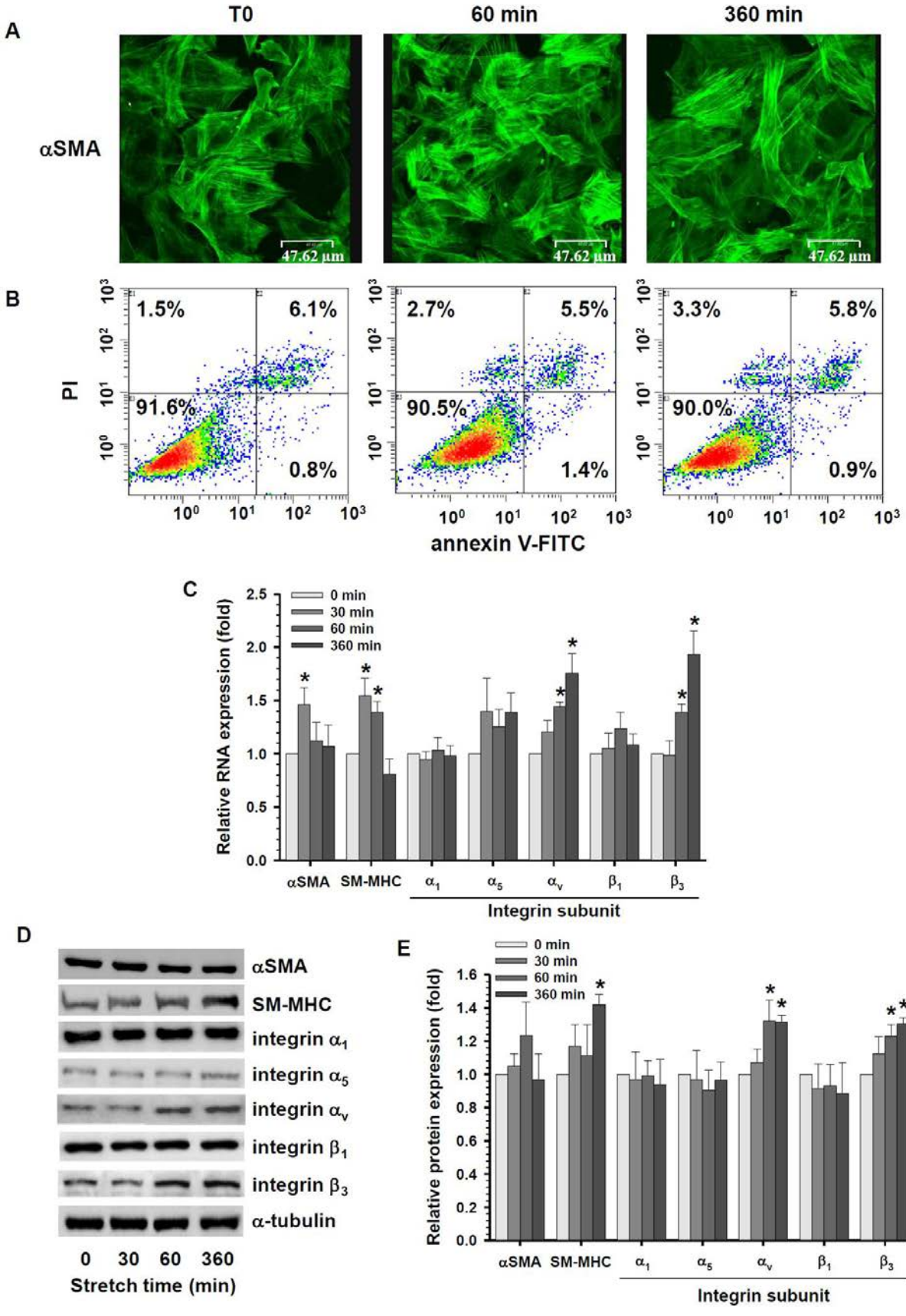

A
T0
60 min
360 min
αSMA
47.62 μm
B
PI
annexin V-FITC
1.5%
6.1%
91.6%
0.8%
2.7%
5.5%
90.5%
1.4%
3.3%
5.8%
90.0%
0.9%
C
Relative RNA expression (fold)
0 min
30 min
60 min
360 min
αSMA
SM-MHC
α1
α5
αv
β1
β3
Integrin subunit
D
αSMA
SM-MHC
integrin α1
integrin α5
integrin αv
integrin β1
integrin β3
α-tubulin
0 30 60 360
Stretch time (min)
E
Relative protein expression (fold)
0 min
30 min
60 min
360 min
αSMA
SM-MHC
α1
α5
αv
β1
β3
Integrin subunit

Figure 4

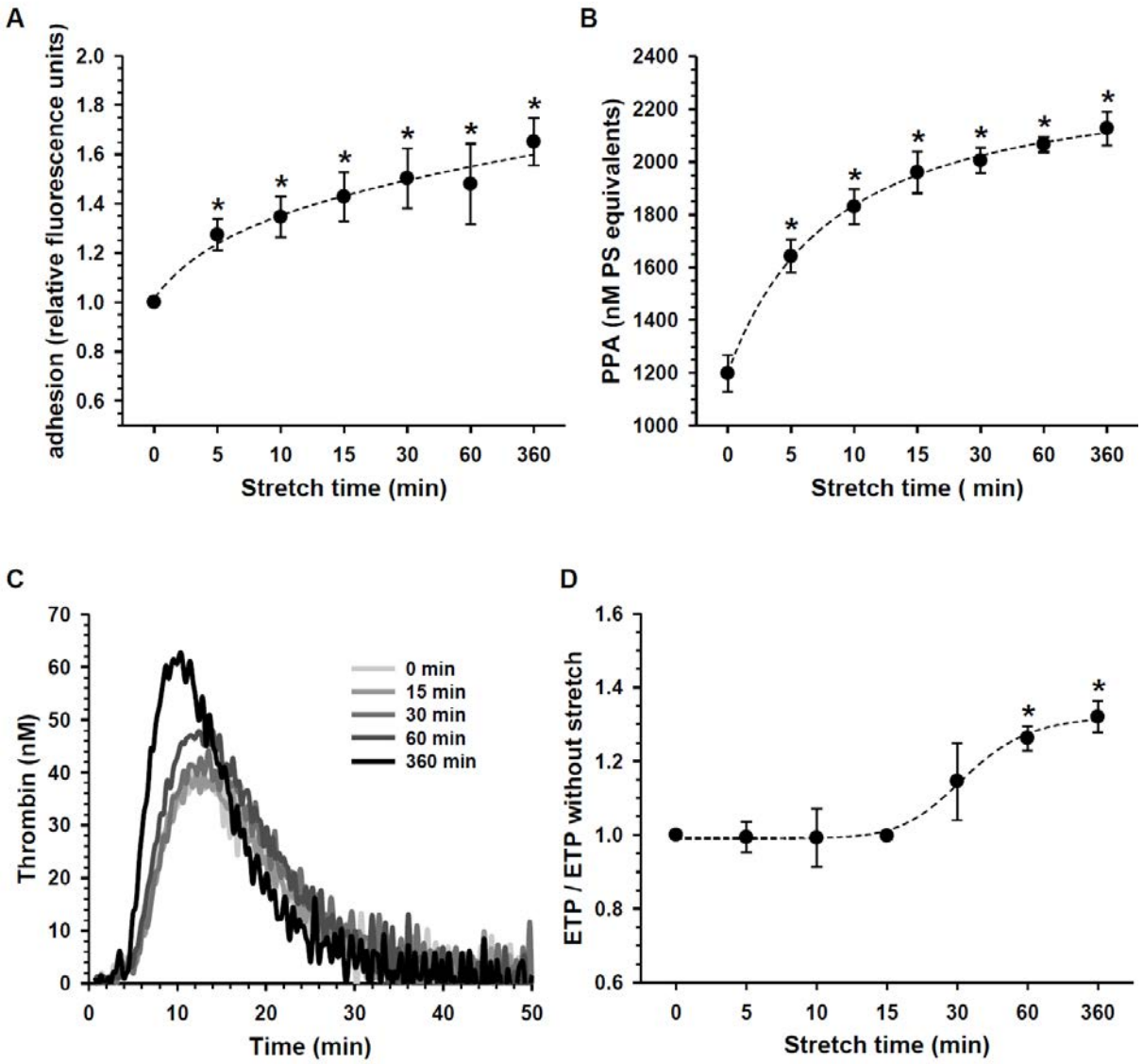

A
adhesion (relative fluorescence units)
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0
5
10
15
30
60
360
Stretch time (min)
B
PPA (nM PS equivalents)
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
Stretch time (min)
C
Thrombin (nM)
70
60
50
40
30
20
10
0
0 min
15 min
30 min
60 min
360 min
Time (min)
D
ETP / ETP without stretch
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
Stretch time (min)

Figure 5

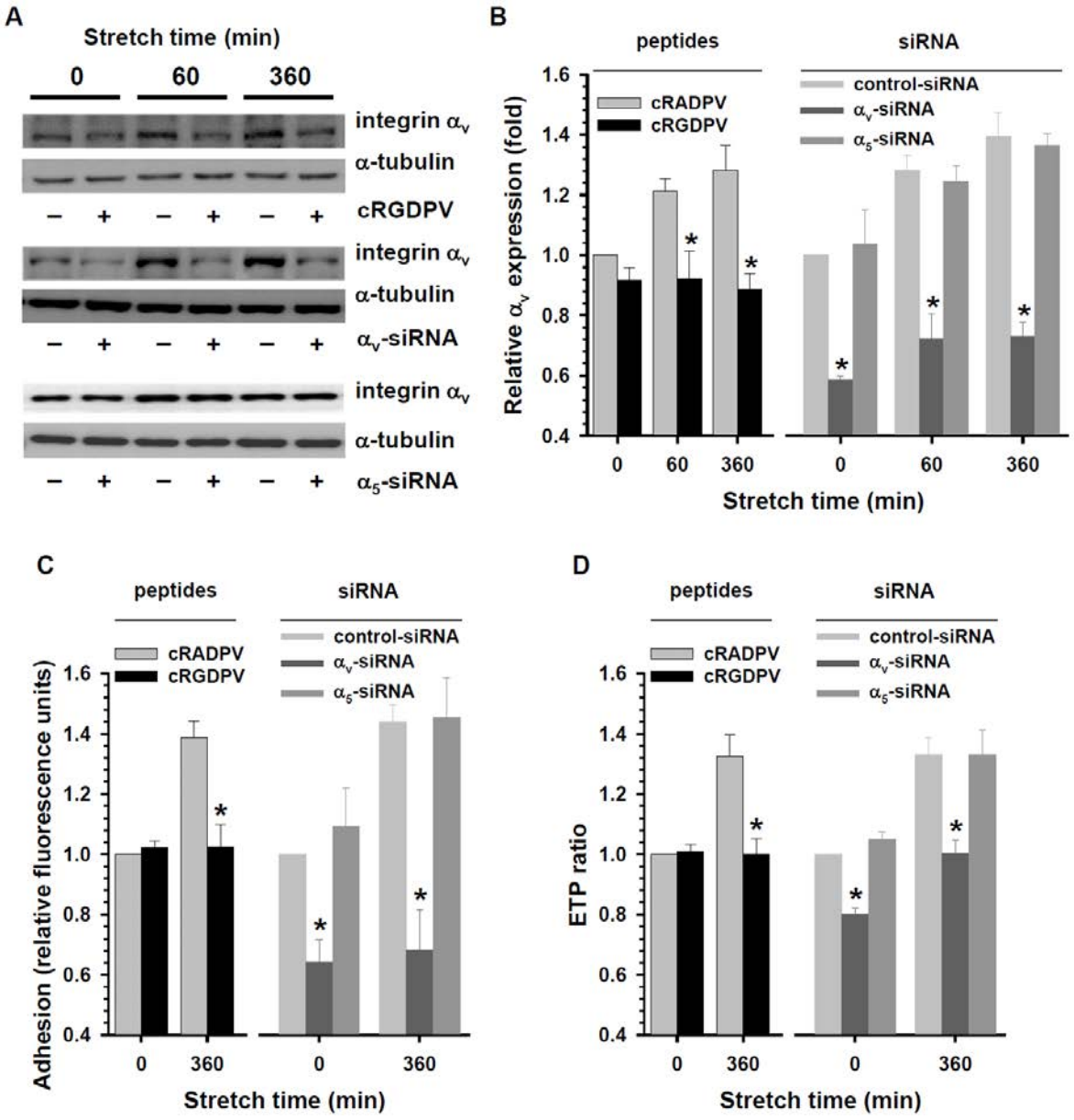
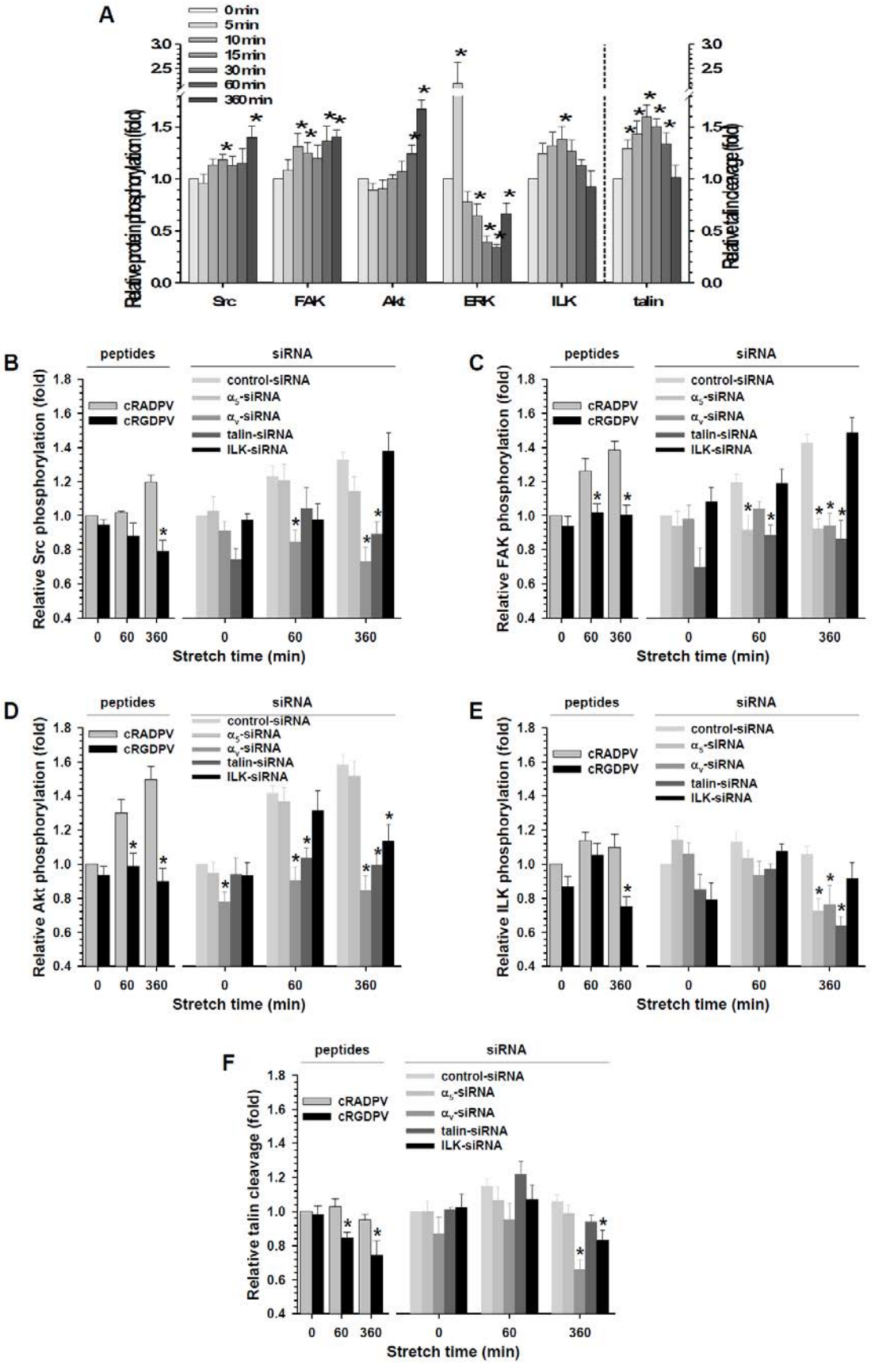

A
Stretch time (min)
0
60
360
integrin α_v
α-tubulin
cRGDPV
integrin α_v
α-tubulin
α_v-siRNA
integrin α_v
α-tubulin
α_5-siRNA
B
peptides
siRNA
cRADPV
cRGDPV
control-siRNA
α_v-siRNA
α_5-siRNA
Relative α_v expression (fold)
Stretch time (min)
C
peptides
siRNA
cRADPV
cRGDPV
control-siRNA
α_v-siRNA
α_5-siRNA
Adhesion (relative fluorescence units)
Stretch time (min)
D
peptides
siRNA
cRADPV
cRGDPV
control-siRNA
α_v-siRNA
α_5-siRNA
ETP ratio
Stretch time (min)

Figure 6


A
0 min
5 min
10 min
15 min
30 min
60 min
360 min
Relative protein phosphorylation (fold)
Relative talin cleavage (fold)
Src
FAK
Akt
ERK
ILK
talin
B
peptides
siRNA
cRADPV
cRGDPV
control-siRNA
α5-siRNA
αv-siRNA
talin-siRNA
ILK-siRNA
Relative Src phosphorylation (fold)
Stretch time (min)
C
Relative FAK phosphorylation (fold)
D
Relative Akt phosphorylation (fold)
E
Relative ILK phosphorylation (fold)
F
Relative talin cleavage (fold)

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Cyclic stretch-induced thrombin generation by rat vascular smooth muscle cells is mediated by the integrin αvβ3 signaling pathway

Xianqing Mao[1,2*], Rose Said[1,2*], Huguette Louis[1,2], Jean-Pierre Max[1,2], Denis Wahl[1,2], Zhenlin Li[3], Veronique Regnault[1,2], Patrick Lacolley[1,2]

[1]INSERM, U961, Vandoeuvre-les-Nancy, France

[2]Nancy Université, Nancy, France

[3]UPMC Université Paris 06, Paris, France

* contributed equally to this work

Short title: Vascular thrombin generation by cyclic stretch

Key words: integrin, signal transduction, vascular smooth muscle cell, thrombin generation, mechanical stretch

Supplemental table

Table: Primers for quantitative PCR analysis

Gene	Sense	Anti-sense
GAPDH	AGATCCACAACGGATACATT	CCCTCAAGATTGTCAGCAA
αSMA	TGTGCTGGACTCTGGAGATG	GAAGGAATAGCCACGCTCAG
SM-MHC	GATGTGGTGCAGAAAGCTCA	CTTTGTTCACACGGCTGAGA
Integrin α_1 subunit	AGAGGCACAATCCAGGACTG	GGTAGGAGCGAGACATTCAC
Integrin α_5 subunit	ATGGCTCAGACATCCACTCC	GGTCATCTAGCCCATCTCCA
Integrin α_v subunit	AACTGCTCAGTGCTTGCAGA	GCGGATGACTTCAGGGAATA
Integrin β_1 subunit	GGACAGGAGAAAATGGACGA	GTGAAGCCCAGAGGTTT
Integrin β_3 subunit	CCACTGATGCCAAGACCCATA	AGACAATGCCTGCCAGCCT

GAPDH, glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase; αSMA, α-smooth muscle actin; SM-MHC, smooth muscle myosin heavy chain

Supplemental figure legends

Supplemental figure I. *Expression of Bax and Bcl2 proteins in response to cyclic stretch in VSMCs*. Results (means±SEM of 3 experiments performed in triplicate) are expressed as ratios between Bax and Bcl2 protein levels.

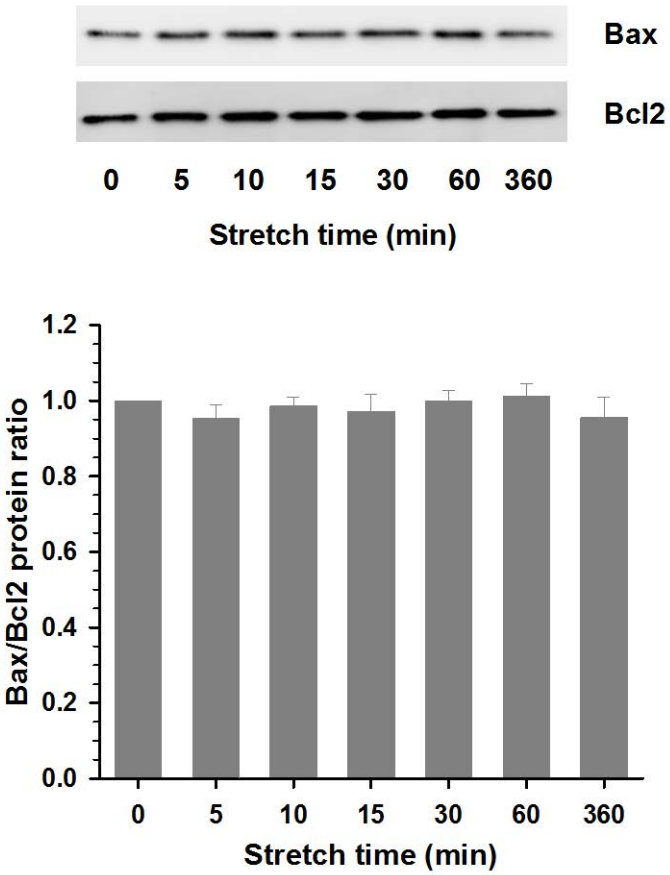
Supplemental figure II. *Effects of si-RNA against integrin α5 subunit, talin and ILK on their respective proteins in VSMCs.* Representative Western blot analysis and protein levels of integrin α5 subunit (A), talin intact molecule (B) or ILK (C) in rat VSMCs transfected for 24 hours with control or tested siRNA in DMEM/F12 containing 10% FBS and maintained in 0.5% FBS for 2 additional days. Results are expressed as fold decreases versus cells treated with a control siRNA after normalization to α-tubulin. Results are means±SEM of 3 experiments performed in triplicate. * $P<0.05$ versus a ratio value of 1 using a paired Student's t test.

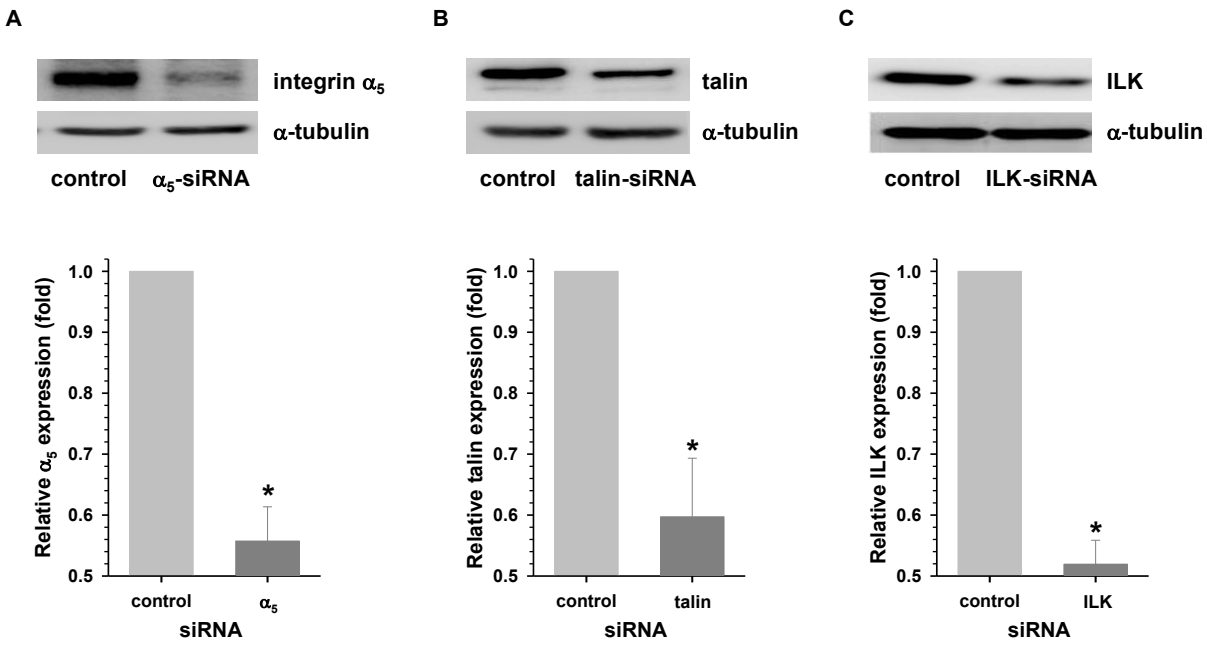
Supplemental figure III. *Western blot analysis of the effects of cyclic stretch on phosphorylation levels of Src, FAK, Akt, ERK and ILK and on cleavage of talin.* For quantification, see Figure 6.

Supplemental figure IV. *Western blot analysis of the effects of the cRGDPV peptide and siRNA against α5, αv, talin or ILK on phosphorylation levels of Src, FAK, Akt and ILK and on cleavage of talin in response to cyclic stretch.* For quantification, see Figure 6.

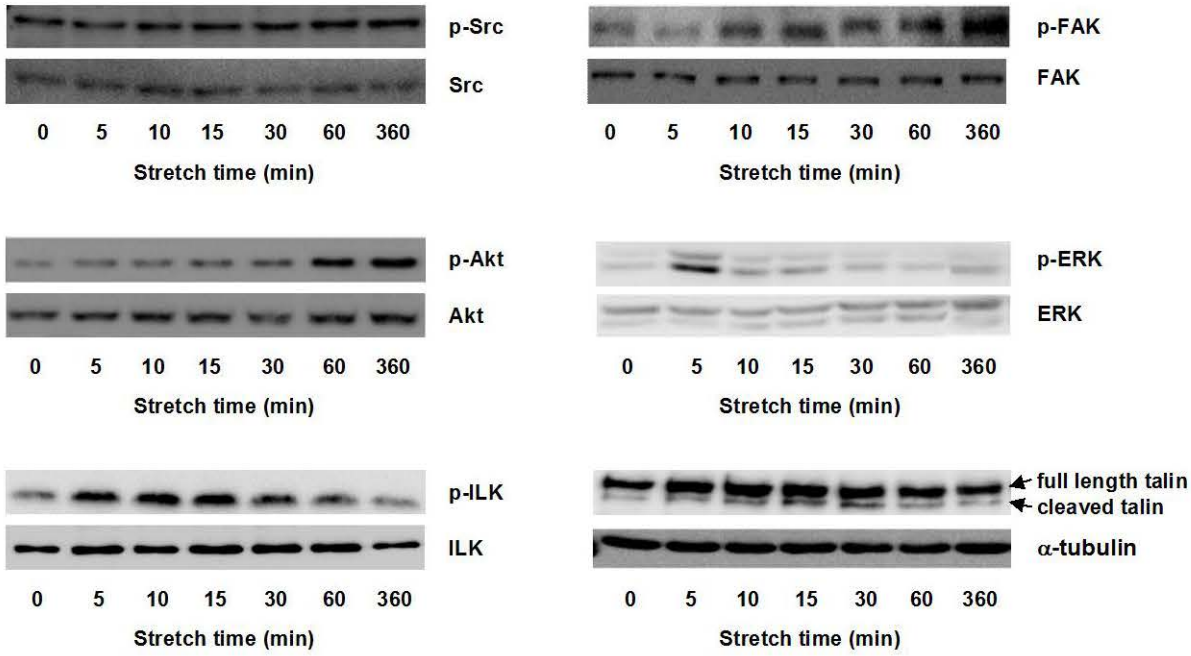
Supplemental figure V. *Effects of siRNA against talin or ILK on integrin α_v subunit expression in response to cyclic stretch*. Representative Western blot analysis and protein levels of integrin α_v subunit in VSMCs transfected for 24 hours with control siRNA, talin-siRNA (A) or ILK-siRNA (B) and maintained in 0.5% FBS for 2 additional days before being subjected to cyclic stretch for the indicated time period. Protein levels are normalized to □-tubulin. Results (means±SEM of 3 experiments performed in triplicate) are expressed as fold increases versus unstretched cells treated with a control siRNA. * $P<0.05$ versus VSMCs pretreated with control siRNA at the same time of stretch using an unpaired Student's t test.

Supplemental figure I

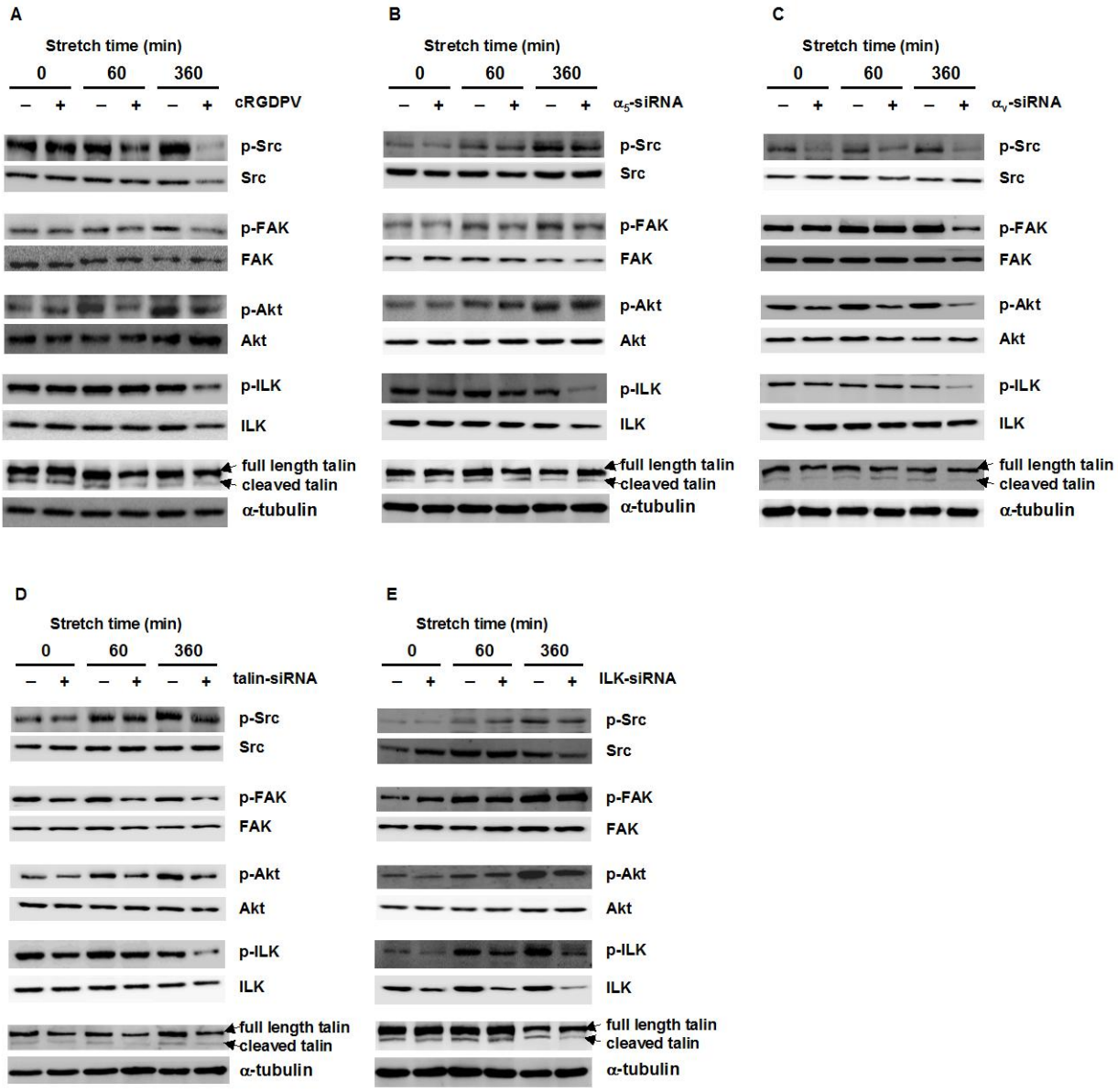



A
integrin α5
α-tubulin
control
α5-siRNA
Relative α5 expression (fold)
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
*
control
α5
siRNA
B
talin
α-tubulin
control
talin-siRNA
Relative talin expression (fold)
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
*
control
talin
siRNA
C
ILK
α-tubulin
control
ILK-siRNA
Relative ILK expression (fold)
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
*
control
ILK
siRNA

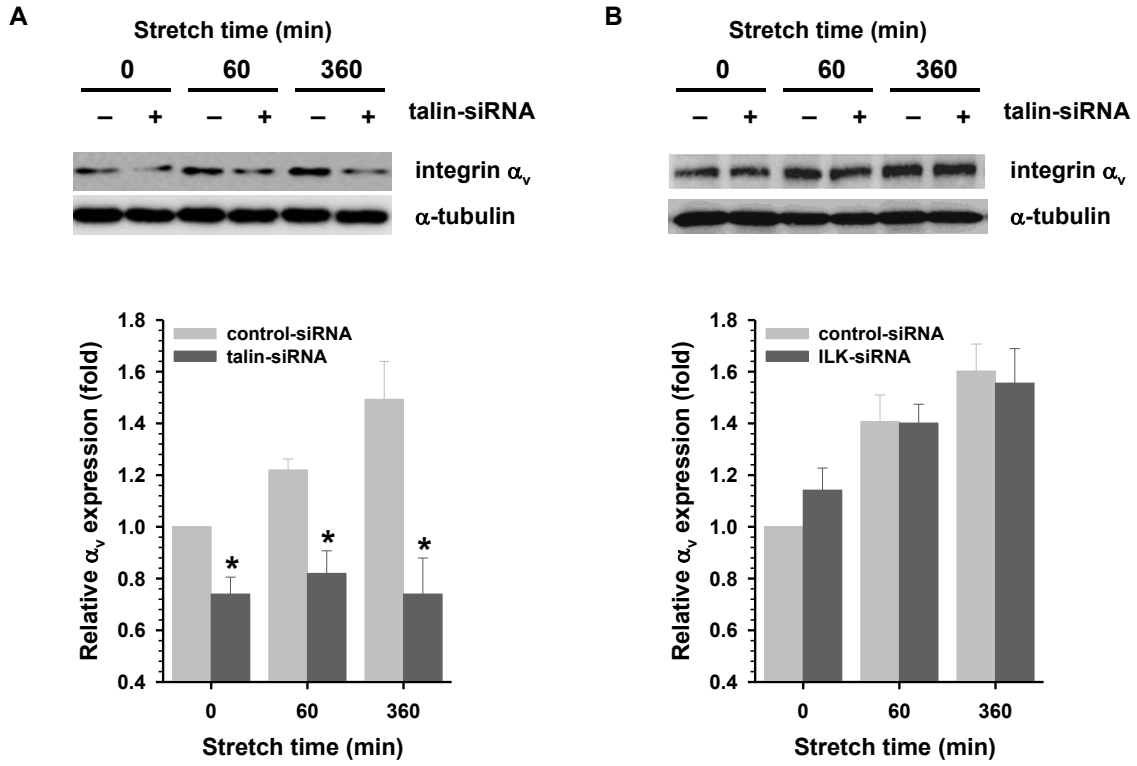
Supplemental figure III



Supplemental figure IV



Supplemental figure V



Publications scientifiques

Mao XQ, Said R, Louis H, Max J.P, Wahl D, Li Z, Regnault V and Lacolley P. Cyclic stretch-induced thrombin generation by rat vascular smooth muscle cells is mediated by the integrin αvβ3 signaling pathway. (Soumis)

Mao XQ, Ait-Aissa Karima, Lagrange Jeremy, Youcef G, Louis H. Hypertension, hypercoagulability and the metabolic syndrome : a cluster of risk factors for cardiovascular disease (Accepté).
Bio-medical materials and engineering (2011).

Lacolley P, **Mao XQ**, Said R, Thornton S.N, Regnault V. Aldosterone, endothelium dysfunction and cardiovascular diseases. Dossier-Aldostérone, cœur et vaisseaux (Publié).
MT Cardio, 2008; 4: 188-193.

Présentation Orale
Mao XQ, Bui C, Chabel M, Ramalanjoana N, Gulberti S, Magdalou J, Netter P, Coughtrie M.W.H., Ouzzine M, and Fournel-Gigleux S. Epigenetic regulation of heparan-sulfate synthesis by DNA methylation.
Septembre 2011, 1er journées scientifiques du LEA Nancy-Dundee "Protéoglycanes : Santé, Pathologie et Thérapeutiques", Nancy, France.

Mao XQ, Said R, Louis H, Li Z, Regnault V and Lacolley P. Effets des contraintes mécaniques sur l'intégrine alpha V beta 3 des cellules musculaires lisses vasculaires.
Avril 2009, 26ème Congrès Annuel du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (GRRC), Nancy, France.

Communications scientifiques
Mao XQ, Bui C, Chabel M, Coughtrie M.W.H., Netter P, Magdalou J, Ouzzine M, and Fournel-Gigleux S. Epigenetic alterations of glycosaminoglycan synthesis.
Octobre 2011, 6ème Journées Scientifiques du Pole Lorrain d'Ingénierie du Cartilage (PLIC), Nancy, France.

Said R, **Mao XQ**, Max JP, Louis H, Wahl D, Lecompte T, Lacolley P and Regnault V. Activité thrombogène des microparticules d'origine endothéliale, musculaire et plaquettaire.
Mai 2011, 28ème Congrès Annuel du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (GRRC), Lyon, France.

Mao XQ, Said R, Louis H, Li Z, Regnault V and Lacolley P. Effets des contraintes mécaniques cycliques sur la génération de thrombine par les cellules musculaires lisses vasculaires.
Avril 2010, 27ème Congrès Annuel du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (GRRC), Nantes, France.

Said R, Nguyen Dinh Cat A, **Mao XQ**, Charhbili V, Huet-Panek N, Labat C, Jaisser F, Lacolley P and Regnault V. Le récepteur aux minéralocorticoides modifie la sensibilité au système anticoagulant de la protéine C.
Avril 2009, 26ème Congrès Annuel du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (GRRC), Nancy, France

Mao XQ, Louis H, de Isla N, Challande P, Regnault V, Lacolley P. Cyclic mechanical strain-induced contractile differentiation is coupled with an increased expression of integrin αv, β1 and β3 in vascular smooth muscle cells.
Mai 2008, 25ème Congrès Annuel du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (GRRC), Montpellier, France.

Said R, **Mao XQ**, Louis H, Max JP, Lecompte T, Lacolley P, Regnault V. Vascular smooth muscle cells: potential players in thrombin generation and inhibition.
Mai 2008, 25ème Congrès Annuel du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (GRRC), Montpellier, France.

Goudot G, Louis H, **Mao XQ**, Li Z, Challande P, Régnault V, Lacolley P. Angiotensin II increase integrin α1 and α5 subunits expression on smooth muscle cells.
Mai 2008, 25ème Congrès Annuel du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (GRRC), Montpellier, France.

Mao XQ, Goudot G, De Isla N, Li Z, Challande P, Regnault V, Lacolley P, Louis H. Cyclic mechanical stretch-induced contractile differentiation is coupled with an increased expression of integrin β1, β3 and αv in vascular smooth muscle cells. Hypertension, 2008; 52: 756.
Octobre 2008, 13ème Congrès Annuel ECCR (European-Council-for-Cardiovascular-Research), Nice, France.
Avec actes publiés Octobre 2008.

Said R, **Mao XQ**, Louis H, Max JP, Poitevin G, Lecompte T, Lacolley P, Regnault V. Vascular smooth muscle cells are potential players in thrombin generation and inhibition. Hypertension, 2008; 52: 756.
Octobre 2008, 13ème Congrès Annuel ECCR (European-Council-for-Cardiovascular-Research), Nice, France.
Avec actes publiés Octobre 2008.

Prix de communications

2010 – Prix de « Chinese Government Award For Outstanding Self-financed Abroad » (Paris, France)

2010 – Prix de Poster et présentation orale, Doctoriales Lorraines 2010 (Ventron, France)

2009 – Prix de poster pour la « Fédération Scientifique » à la Faculté de Médecine UHP 2009 (Nancy, France)

2008 – Prix Witner de la Faculté de Médecine UHP 2008 (Nancy, France)

Résumé

Effets des contraintes mécaniques cycliques sur la génération de thrombine à la surface des cellules musculaires lisses vasculaires de rat

Les cellules musculaires lisses (CML) vasculaires les composants cellulaires principaux de la paroi artérielle, sont exposées constamment aux contraintes mécaniques. Les contraintes mécaniques cycliques régulent de nombreuses fonctions des CML vasculaires via les intégrines. Parmi les intégrines, l'$\alpha_v\beta_3$ est non seulement un mécano-transducteur mais aussi le récepteur de la prothrombine à la surface des CML. L'activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ par les contraintes mécaniques pourrait favoriser l'adhésion des CML à la prothrombine et aussi accélérer la génération de thrombine à la surface des CML. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié l'effet des contraintes mécaniques sur la génération de thrombine par les CML et identifié les voies de la signalisation impliquées. Nous avons utilisé un modèle de Flexcell utilisant les CML aortiques de rat, soumises à un étirement cyclique (10%, 1Hz). L'exposition à l'étirement cyclique pendant 1h et 6h induit un phénotype de différenciation et non-apoptotique des CML et une augmentation de l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Il y a aussi une augmentation de la phosphorylation de Src, FAK, AKT de façon temps dépendant et une augmentation de la phosphorylation de l'ILK à 15 min et du clivage de taline de 5 à 60 min. L'étirement cyclique augmente l'adhésion des CML à la prothrombine et la génération de thrombine avec un effet maximum à 6h de 67% et 30% respectivement. Le peptide mimétique de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (cRGDPV) et le siARN α_v bloquent tous les effets de l'étirement cyclique sur les CML. Le siARN taline inhibe l'expression de la sous-unité αv et également la phosphorylation de Src, AKT et ILK. Le siARN ILK n'a pas d'effet sur l'expression de l' αv mais inhibe la phosphorylation d'AKT et le clivage de taline à 6h de l'étirement cyclique. Ainsi, l'étirement cyclique induit une plus forte génération de thrombine par les CML vasculaires via l'activation des voies de signalisation dépendante de l'$\alpha_v\beta_3$. Cette étude suggère que la génération de thrombine intravasculaire peut être régulée par des antagonistes de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et peut devenir une nouvelle cible thérapeutique chez les patients avec une pression pulsée élevée.

Mots clés: contraintes mécaniques cycliques; CML vasculaire; thrombine; intégrine $\alpha_v\beta_3$; mécanotransduction

Effects of cyclic mechanical stretch on thrombin generation at the surface of rat vascular smooth muscle cells

Vascular smooth muscle cells (SMC), the main cellular components of the arterial wall, are constantly exposed to mechanical stretch. Cyclic mechanical stress regulates many functions of vascular SMC via integrins. Among the integrins, $\alpha_v\beta_3$ is not only a mechanotransducer but also the receptor of prothrombin in the vascular SMC. Activation of integrin $\alpha_v\beta_3$ by mechanical stretch may promote SMC adhesion to prothrombin and also accelerate thrombin generation on the surface of SMC. To test this hypothesis, we have studied the effect of mechanical stretch on the generation of thrombin by SMC and identified possible signaling pathway involved. We used a Flexcell model using rat aortic SMC subjected to cyclic stretch (10%, 1Hz). Exposure to cyclic stretch for 1h and 6h induced a phenotype of differentiation and non-apoptosis of SMC and an increased expression of integrin $\alpha_v\beta_3$. There was also an increase in phosphorylation of Src, FAK, and AKT in a time dependent manner, increased phosphorylation of ILK at 15min and the cleavage of talin from 5 to 60min. Cyclic stretch increased the adhesion of prothrombin to the SMC, and thrombin generation with a maximum effect of 67% and 30% respectively. A peptide mimetic of integrin $\alpha_v\beta_3$ (cRGDPV) and αv siRNA both blocked all the effects of cyclic stretch on SMC. A talin siRNA inhibited the expression of αv and the phosphorylation of Src, AKT and ILK. An ILK siRNA has no effect on the expression of αv but inhibited the phosphorylation of AKT and the cleavage of talin at 6h of stretch. Thus, cyclic stretch induced a higher thrombin generation by vascular SMC via activation of signaling pathways dependant on $\alpha_v\beta_3$. This study suggests that intravascular thrombin generation can be regulated by antagonists of integrin $\alpha_v\beta_3$ and can become a new therapeutic target for the patients with a high pulse pressure.

Keywords: cyclic mechanical stretch; vascular SMC; thrombin; integrin $\alpha_v\beta_3$; mechanotransduction