



HAL
open science

Caractérisation des propriétés pro- et anti-coagulantes associées aux cellules musculaires lisses vasculaires

Rose Said

► **To cite this version:**

Rose Said. Caractérisation des propriétés pro- et anti-coagulantes associées aux cellules musculaires lisses vasculaires. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0004 . tel-01749151

HAL Id: tel-01749151

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749151>

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 (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

par

Rose SAID

**Caractérisation des propriétés pro- et anti-coagulantes
associées aux cellules musculaires lisses vasculaires**

Date de soutenance : 5 janvier 2012

Membres du jury :

Rapporteurs :	Pr Philippe NGUYEN	«PU, EA 3801, Reims»
	Dr Isabelle GOUIN-THIBAUT	«MCU, Inserm U 765, Paris»
Examineurs :	Pr Thomas LECOMPTE	«PU, Inserm U 961, Nancy»
	Dr Véronique REGNAULT	«CR1, Inserm U 961, Nancy»

Je remercie le Docteur Patrick Lacolley, Directeur de l'unité Inserm U961 pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour son intérêt, son implication dans mon travail ainsi que pour ses conseils durant ces quatre années. Soyez assuré de mon profond respect.

Je tiens tout particulièrement à remercier ma directrice de thèse, le Docteur Véronique Regnault, pour m'avoir guidée, motivée, conseillée dans mon travail. Tout au long de ces quatre années, elle m'a fait bénéficier de ses conseils, de sa grande curiosité et rigueur scientifique. Son exigence mêlée de patience et d'encouragements m'a permis d'améliorer sans cesse mon travail.

Que Mme le Docteur Isabelle GOUIN-THIBAUT et Mr le Professeur Philippe NGUYEN trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

Un grand Merci du fond du coeur à une personne à qui je serais reconnaissante toute ma vie !!!! C'est au professeur Thomas Lecompte !!!! Merci de m'avoir accueillie pour la première fois à Nancy au sein de l'unité U734 en 2007. Merci pour votre suivi continu pendant les années suivantes !!! Merci de m'avoir donné l'opportunité de suivre une formation hospitalière dans votre (ancien) service d'hématologie biologique à Nancy. Merci pour les discussions tellement scientifiques et professionnelles qu'on a partagé pendant ces quatre années. Merci pour votre humanité et gentillesse !!!! Merci également à votre aimable petite famille !!! J'ai tellement de remerciements et de reconnaissances à vous présenter que j'aurais beaucoup aimé pouvoir vous les présenter dans ma langue maternelle !!!! Tout simplement, c'est grâce à vous que j'y suis arrivée !!!!

A Jean-Pierre Max, Ingénieur de Recherche Inserm, à qui je voudrais dire un grand Merci d'avoir contribué en grande partie à mon travail de thèse. Je tiens également à vous exprimer toute ma reconnaissance pour votre grande disponibilité, pour discuter les données de littérature, les résultats de thèse, ainsi que la résolution des problèmes informatiques au laboratoire. Merci de m'avoir écouté dans les bons comme dans les moins bons moments. Merci pour votre très bonne humeur tout au long de ces quatre ans.

Merci à Natacha et Amélie, mes voisines de bureau pour leur soutien et leur conseil durant ma thèse.

Merci également à Faten Soussi, Maître de Conférence, de m'avoir aidé dans ma première inscription à Nancy 1, de son soutien pendant les premiers mois après mon arrivée à Nancy.

Merci à tous les membres de service d'hématologie biologique à CHU Brabois à Nancy, où j'ai suivi une formation médicale pendant les deux dernières années de ma thèse, qui m'ont toujours accueillie avec un grand sourire. Un merci tout particulier à Marie Hacquard, d'avoir acceptée de travailler ensemble sur deux papiers pendant mon stage hospitalier. Merci Marie, de ta gentillesse et de ton soutien continu pour me remonter le moral !!!

Je remercie également les assistants au service d'hématologie biologique, Julien Perrin et Marc Muller. C'est grâce à vous que j'ai beaucoup appris en hématologie... !!!

Merci également à tous les biologistes dans le service d'hématologie biologique, Birgit, Silvan et Véronique Latger-Canard... Merci de vos conseils et remarques ainsi que pour vos cours très professionnels !!!!

Merci à tous les membres de l'unité U961 et du groupe choc avenir. Un grand Merci à toi Huguette Louis !!! C'est grâce à toi que j'ai appris la culture cellulaire et c'est grâce à ton implication dans le projet que j'ai obtenu les résultats de stretch mécanique et la génération de thrombine !!! Je te remercie également pour les expériences de cytométrie en flux et d'avoir répondu à toutes mes questions lors de la rédaction de ma thèse.

Merci à mes meilleures copines à Nancy, Nacira, Natalia et Michelle !!! Ils vont me manquer les repas à midi, ainsi que les verres à la place Stanislas !!!! C'est difficile pour moi d'imaginer Nancy sans nos bons souvenirs !!! Ne t'inquiète pas Natalia, on trouvera un autre moyen (que l'aller à Metz) pour réchauffer nos cartes bancaires !!!

Merci à toute ma famille !!!!

Un très grand Merci en particulier à mes parents pour leur amour et leur soutien. Vous avez toujours cru en moi, même dans les moments difficiles, et je vous en remercie. Merci de m'avoir créé les meilleures conditions pour que je puisse toujours avancer, et merci de pouvoir supporter la séparation parfois très dure pour nous trois !!! Cette thèse est aussi bien la votre, elle représente pour moi la reconnaissance de votre éducation car c'est grâce à vous si j'en suis là.

Merci à toi Rime, ma sœur unique !!! Merci à Dima et Julia pour la joie qu'elles m'offraient de temps en temps !!!

Merci à toi Talal, de m'avoir attendu avec une grande patience toutes ces années !!!! Malgré la distance, nous avons pu partager les joies ainsi que les peines de ces quatre ans. C'est grâce à ta phrase que j'ai beaucoup résisté : «on sera bientôt ensemble !!!!».

Enfin, Je tiens à remercier l'université de Damas et le ministère d'éducation supérieure en Syrie de m'avoir donné la chance de poursuivre mes études supérieures en France grâce à une bourse dans le cadre de collaboration Franco-Syrien.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS ET SYMBOLES.....	5
1 CONTEXTE DU SUJET.....	7
2 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	9
2.1 <i>Endothélium</i>	10
2.1.1 Endothélium et hémostase	10
2.1.1.1 Contrôle de l'hémostase par l'endothélium	11
2.1.1.2 Activité prothrombotique de l'endothélium	12
2.2 <i>Les cellules musculaires lisses vasculaires</i>	13
2.2.1 Les intégrines.....	14
2.2.1.2 Les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$: structure et fonctions	19
2.2.1.2.1 L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$	19
2.2.1.2.2 L'intégrine $\alpha_v\beta_3$	20
2.3 <i>Les plaquettes sanguines</i>	22
2.3.1 Description générale.....	22
2.3.2 Interaction plaquettes-paroi vasculaire.....	22
2.4 <i>Hémostase</i>	23
2.4.1 L'hémostase primaire	23
2.4.2 L'hémostase secondaire : ou la coagulation sanguine.....	27
2.4.2.1 Les protéines de la coagulation.....	27
2.4.2.1.1 Les facteurs de la coagulation	28
2.4.2.1.2 Les éléments cellulaires.....	36
2.4.2.2 Déroulement de la coagulation.....	38
2.4.3 La fibrinolyse.....	43
2.4.4 Régulation de la coagulation : le rôle des inhibiteurs	43
2.5 <i>Les Microparticules (MP)</i>	54
2.5.1 Les stimuli de la production des microparticules	56
2.5.2 Composition des microparticules.....	56
2.5.3 Communication intercellulaire par les microparticules	57
2.5.4 Propriétés pro-et anti-coagulantes des microparticules	58
2.6 <i>Génération de thrombine par les cellules vasculaires et les actions cellulaires de la thrombine</i>	60
2.6.1 Génération de thrombine à la surface des cellules musculaires lisses vasculaires.....	60
2.6.2 La thrombine et ses actions cellulaires.....	61
3 MATERIELS ET METHODES	63
3.1 <i>Cellules vasculaires</i>	63
3.1.1 Isolement de cellules musculaires lisses aortiques du rat.....	63
3.1.2 Culture cellulaire	64
3.1.2.1 Milieux de culture.....	64
3.1.2.2 Duplication des cellules.....	64
3.1.2.3 Exposition des cellules à des déformations cycliques	65
3.1.2.4 Coloration des cellules musculaires lisses du rat Wistar au bleu de trypan	66
3.2 <i>Préparation de microparticules cellulaires dérivées des plaquettes, des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses aortiques humaines</i>	66
3.2.1 Préparation de microparticules plaquettaires par l'activation des plaquettes humaines avec la ionomycine	66

3.2.2 Préparation de microparticules dérivées des cellules endothéliales et microparticules dérivées des cellules musculaires lisses par activation des cellules d'origine avec la ionomycine	67
3.2.3 Détermination de la capacité de la thrombine à activer les plaquettes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses aortiques humaines	67
3.2.4 Quantification des microparticules préparées par activation de cellules parentales avec la thrombine par cytométrie en flux	68
3.2.4.1 Principe de la cytométrie en flux	68
3.2.4.2 Quantification des microparticules	68
3.3 Préparation de vésicules phospholipidiques moléculairement définies (VP)	68
3.4 Mesure de l'activité procoagulante de phospholipides (PPA).....	69
3.5 Mesure des facteurs pro-et anti-coagulants aux cellules endothéliales et cellules musculaires lisses aortiques humaines.....	70
3.5.1 Mesure de l'activité du facteur tissulaire des cellules endothéliales, des cellules musculaires aortiques humaines, et des microparticules dérivées de ces cellules	70
3.5.2 Mesure du TFPI exprimé par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses aortiques humaines.....	71
3.5.2.1 Extraction des protéines cellulaires.....	71
3.5.2.2 Dosage des protéines cellulaires	72
3.5.2.3 Mesure du TFPI en ELISA	72
3.5.2.3.1 Principe du test.....	72
3.5.2.3.2 Protocole	73
3.5.3 Mesure de l'EPCR à la surface des CE et CML aortiques humaines	73
3.6 Préparation de spécimens plasmatiques	74
3.6.1 Plasma riche en plaquettes (PRP).....	74
3.6.2 Plasma dépourvu en plaquettes (PDP)	74
3.7 La Thrombinographie	75
3.7.1 Définition générale de la technique	75
3.7.2 Conditions de réalisation du test.....	75
3.7.3 Les paramètres thrombinographiques.....	78
3.7.4 Etude de systèmes anticoagulants à la surface des cellules endothéliales et cellules musculaires aortiques humaines en thrombinographie	79
3.7.4.1 Etude du rôle du TFPI associé à la surface de cellules	79
3.7.4.2 Etude du système de la protéine C activée.....	79
3.8 Mesure de la protéine C activée formée à la surface des cellules endothéliales et cellules musculaires lisses aortiques humaines adhérentes en présence de la protéine C et de la thrombine	81
3.9 Inactivation du facteur Va par la protéine C activée	81
3.10 Etude du rôle de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans la génération de thrombine à la surface des cellules musculaires lisses aortiques de rat Wistar.....	83
3.10.1 Incubation des cellules musculaires lisses avec des peptides RGD avant les expériences de coagulation.....	83
3.10.2 Transfection des cellules musculaires lisses aortiques du rat Wistar avec un siARN α_v , siARN α_5 ou siARN contrôle avant les expériences de coagulation.....	84
3.11 Statistiques.....	84
4 RESULTATS.....	85
4.1 Génération de thrombine à la surface des cellules musculaires lisses aortiques de rat Wistar .	85
4.1.1 Profil du thrombinogramme	85
4.1.2 Effets de la protéine C activée.....	86
4.1.3 Effet du nombre des cellules	87
4.1.4 Effet de l'ajout de FT exogène.....	89
4.1.5 Effet de la conservation des cellules avant la thrombinographie	90
4.1.6 Effet du détachement des cellules par la trypsine	91

4.1.7 La sensibilité des CML à la PCa ajoutée en thrombinographie.....	93
4.2 Comparaison de la génération de thrombine à la surface des cellules musculaires lisses aortiques issues de rats Zucker contrôles et obèses.....	94
4.3 Etude de la génération de thrombine à la surface des cellules musculaires lisses de rat Wistar soumises ou non à des contraintes mécaniques.....	97
4.3.1 Effet d'étirement cyclique appliqué aux cellules sur l'activité procoagulante de phospholipides, la génération de thrombine à la surface des cellules musculaires lisses et sur leur sensibilité à la PCa	97
4.3.2 Effet de peptides RGD sur l'activité procoagulante de phospholipides et la génération de thrombine à la surface des CML de rat Wistar	100
4.3.2.1 Influence des peptides sur l'activité procoagulante de phospholipides	101
4.3.2.2 Influence des peptides sur la génération de thrombine	101
4.3.3 Effet d'un ARN interférant ciblant la sous-unité α_v (siARN α_v) sur l'activité PPA et la génération de thrombine à la surface des cellules musculaires lisses de rat Wistar non soumises à des déformations cycliques	102
4.3.4 Effet d'un peptide RGD cyclique ou d'un siARN α_v sur la génération de thrombine à la surface des cellules musculaires lisses aortiques de rat Wistar soumises à des déformations cycliques	103
4.4 Génération et inhibition de la thrombine à la surface des plaquettes, des cellules endothéliales, et des cellules musculaires lisses humaines	105
4.4.1 Thrombinographie réalisée avec les trois types cellulaires (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses aortiques humaines adhérentes et plaquettes humaines en suspension) ...	105
4.4.2 Caractérisation des propriétés pro- et anti- coagulantes des plaquettes, des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses	106
4.4.2.1 Rôle des phospholipides anioniques exposés à la surface membranaire	106
4.4.2.2 Activité du facteur tissulaire exprimée à la surface des cellules endothéliales et cellules musculaires lisses humaines adhérentes	108
4.4.2.3 Rôle du TFPI exprimé à la surface des cellules endothéliales et cellules musculaires lisses adhérentes dans l'inhibition de la génération de thrombine.....	111
4.4.2.4 Rôle de la PCa formée à la surface des cellules endothéliales et cellules musculaires lisses dans l'inhibition de la thrombine générée à leur surface.....	113
4.4.3 Etude de la sensibilité des trois types cellulaires (plaquettes, cellules endothéliales, et cellules musculaires lisses humaines) à la PCa exogène	115
4.4.3.1 Comparaison, en thrombinographie, de la sensibilité à la PCa à la surface des cellules endothéliales, et cellules musculaires lisses et plaquettes	116
4.4.3.2 Mécanismes impliqués dans les propriétés pro-et anti-coagulantes des cellules endothéliales, et cellules musculaires lisses et plaquettes humaines	118
4.4.3.2.1 Propriétés pro-coagulantes.....	118
4.4.3.2.1.1 Mesure de l'activité PPA à la surface des cellules endothéliales, et cellules musculaires lisses activées par la thrombine	119
4.4.3.2.1.2 Mesure de l'activité PPA dans les culots récupérés après l'incubation des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses et des plaquettes avec la thrombine, contenant des MP-CE, MP-CML et MP plaquettaires respectivement	120
4.4.3.2.1.3 Quantification en cytométrie en flux des MP formées par les trois types cellulaires activés par la thrombine.....	121
4.4.3.2.2 Propriétés anti-coagulantes associées aux cellules endothéliales et cellules musculaires lisses vasculaires.....	122
4.4.3.2.2.1 Formation de la PCa à la surface des cellules endothéliales et cellules musculaires lisses.....	122
4.4.3.2.2.2 Cinétique d'inactivation du FVa par la PCa à la surface des cellules endothéliales et cellules musculaires lisses	125
4.4.3.2.2.3 Rôle de l'EPCR cellulaire exprimé à la surface des cellules endothéliales et cellules musculaires lisses dans la sensibilité de ces cellules à la PCa exogène	127
4.4.3.2.2.4 Effet du TFPI exprimé à la surface des cellules endothéliales et cellules musculaires lisses et la PCa exogène sur l'inhibition de la génération de thrombine par la PCa à la surface de ces cellules.....	129
4.5 Etude de la génération-inhibition de thrombine à la surface des microparticules dérivées des plaquettes, des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses humaines	133

4.5.1 Génération de thrombine à la surface des microparticules dérivées des plaquettes, des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses	133
4.5.2 Mesure de l'activité FT à la surface des microparticules dérivées des cellules endothéliales et cellules musculaires lisses.....	134
4.5.3 Sensibilité à la PCa des microparticules dérivées des plaquettes, des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses vasculaires	135
4.5.3.1 Etude de l'inactivation de facteur Va par la PCa en présence des microparticules dérivées des plaquettes, des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses humaines	137
5 DISCUSSION	140
6 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	156
Références	159

ABREVIATIONS ET SYMBOLES

aa	Acides aminés
ADP	Adénosine diphosphate
ADPase	Adénosine diphosphatase
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARNm	ARN messenger
ATPase	Adénosine triphosphatase
AT	Antithrombine
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Albumine bovine sérique
CE	Cellules endothéliales
CML	Cellules musculaires lisses
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
EDRF	Endothelial derived relaxing factor
EDTA	Acide éthylène diamine tétracétique
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPCR	Endothelial protein C receptor
ETP	Endogenous thrombine potential
FGF	Fibroblast growth factor
FII	Prothrombine
FT	Facteur tissulaire
GAGs	Glycosaminoglycanes
GDP	Guanosine DiPhosphatase
Gla	Acide- γ -carboxyglutamique
GTP	Guanosine TriPhosphatase
GP	Glycoprotéine
15 HETE	15 hydroxyeicosatetraenoic acid
HUVEC	Human Umbilical Endothelial Cells
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IL	Interleukine
kDa	KiloDalton
KHPM	Kininogène de haut poids moléculaire
MEC	Matrice extracellulaire
MP	Microparticules
NO	Nitrique oxyde
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor 1
PAR	Protease-activated receptor
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDP	Plasma dépourvu en plaquettes
PC	Phosphatidylcholine
PCa	Protéine C activée
PCI	Inhibiteur de la protéine C
PE	Phosphatidyléthanolamine
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1
PGI ₂	Prostacycline
Prékallikérine	PK

PRP	Plasma riche en plaquettes
PS	Protéine S
PSer	Phosphatidylsérine
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand 1
RGD	Arginine–Glycine–Acide aspartique
SHBG	sex hormone binding protein
SVF	Sérum de veau fœtal
SM	Sphingomyéline
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
TM	Thrombomoduline
TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha
t-PA	Activateur tissulaire du plasminogène
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VP	Vésicules phospholipidiques
vWF	Von Willebrand factor
UK	Urokinase

1 CONTEXTE DU SUJET

La paroi artérielle saine exerce un rôle anticoagulant en fournissant différents facteurs impliqués dans la régulation de la génération de thrombine (1). Si la contribution des composants plasmatiques et des éléments cellulaires circulants du sang est incontestable et très étudiée dans la génération-inhibition de la thrombine en situations physiologiques et pathologiques (2,3), seulement peu d'études ont montré que les cellules musculaires lisses vasculaires (CML) apoptotiques ou non peuvent servir de support pour la formation de thrombine (4-6). Aucune étude d'entre elles n'a cependant étudié la participation des systèmes anticoagulants, en particulier celui de la protéine C activée (PCa) et celui de l'inhibiteur du facteur tissulaire (TFPI) qui peuvent tous deux impliquer la paroi artérielle.

Les intégrines, qui servent de lien entre l'environnement extracellulaire et intracellulaire jouant un rôle important dans la signalisation cellulaire, peuvent également jouer un rôle dans la génération de thrombine. Il a été démontré que l'intégrine majeure de surface des plaquettes, $\alpha_{IIb}\beta_3$, sert de récepteur pour la prothrombine et cette liaison accélère la transformation de prothrombine en thrombine (7). Au niveau des cellules vasculaires, c'est l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (8), qui appartient à la même famille, qui est le récepteur pour la prothrombine.

Les outils biochimiques actuels pour explorer la coagulation *in vitro* ne permettent qu'une approche fragmentaire. La thrombinographie (9) consiste en l'enregistrement du travail de la thrombine au cours de la coagulation *in vitro* de plasma en présence de plaquettes, par fluorescence « *in situ* ». Plus de 90 % de la thrombine est formée après la gélification détectable du sang. Les systèmes inhibiteurs stoechiométriques (antithrombine) et dynamique (PCa) agissent largement au-delà de la gélification détectable du sang. La thrombinographie permet donc une approche intégrative du système de la coagulation.

L'objectif principal de ce travail était de comparer l'implication (i) de cellules vasculaires, les CML et les cellules endothéliales (CE), ou de cellules circulantes, les plaquettes, et (ii) de microparticules (MP) issues de ces différentes cellules dans la génération de la thrombine mais également dans son inhibition par le système anticoagulant dynamique de la PCa et l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI), et d'identifier les déterminants et les mécanismes responsables des différences observées entre ces supports cellulaires pour la coagulation.

Une première partie des travaux a été consacrée à la mise au point de l'étude de la génération de thrombine avec des CML isolées à partir d'aortes thoraciques de rats. Trois types de rats ont été étudiés, le rat Wistar comme modèle de rat normal, le rat Zucker obèse comme modèle de syndrome métabolique avec une hypertension (fa/fa) et son contrôle, le rat Zucker lean (FA/FA).

Dans la suite, nous avons eu le but de mettre en évidence l'implication de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, récepteur de la prothrombine sur les CML à l'aide des peptides mimétiques du site de reconnaissance de l'intégrine sur la prothrombine (RGD « Arginine–Glycine–Acide aspartique ») ou d'un si ARN ciblant la sous-unité α_v . Nous avons également étudié les effets des contraintes mécaniques sur l'implication de cette intégrine dans la génération de thrombine.

Finalement, nous avons comparé la génération de thrombine à la surface des CML, des CE aortiques humaines (commerciales), des plaquettes humaines (contenues dans un plasma riche en plaquettes (PRP) préparé à partir de sujets sains), et des MP dérivées de ces trois types cellulaires, préparées par l'activation des cellules avec la ionomycine.

Plusieurs éléments pro-et anti-coagulants intervenant dans les données thrombinographiques ont été identifiés et mesurés (dans des systèmes purifiés) sur les surfaces cellulaires ainsi que sur leurs microparticules.

Grâce aux résultats obtenus dans ce travail, nous avons démontré, pour la première fois, l'importance des systèmes anticoagulants (PCa et TFPI) dans la détermination de la génération de thrombine à la surface des cellules vasculaires et des MP issues de ces cellules.

2 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Les vaisseaux sont composés de trois tuniques : l'intima, la média et l'adventice (**Figure 1**). L'intima est formée d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) orientées longitudinalement dans le sens du courant sanguin, séparée du sous endothélium par la membrane basale. La média ou la couche moyenne est constituée essentiellement de cellules musculaires lisses (CML) et de fibres élastiques. L'adventice, ou la couche externe, est constituée d'un tissu conjonctif lâche qui fixe le vaisseau au tissu conjonctif environnant et de vaisseaux nourriciers, les vasa-vasorum. Deux couches d'élastine, appelées les limitantes élastiques interne et externe, séparent la média de l'intima et de l'adventice respectivement.

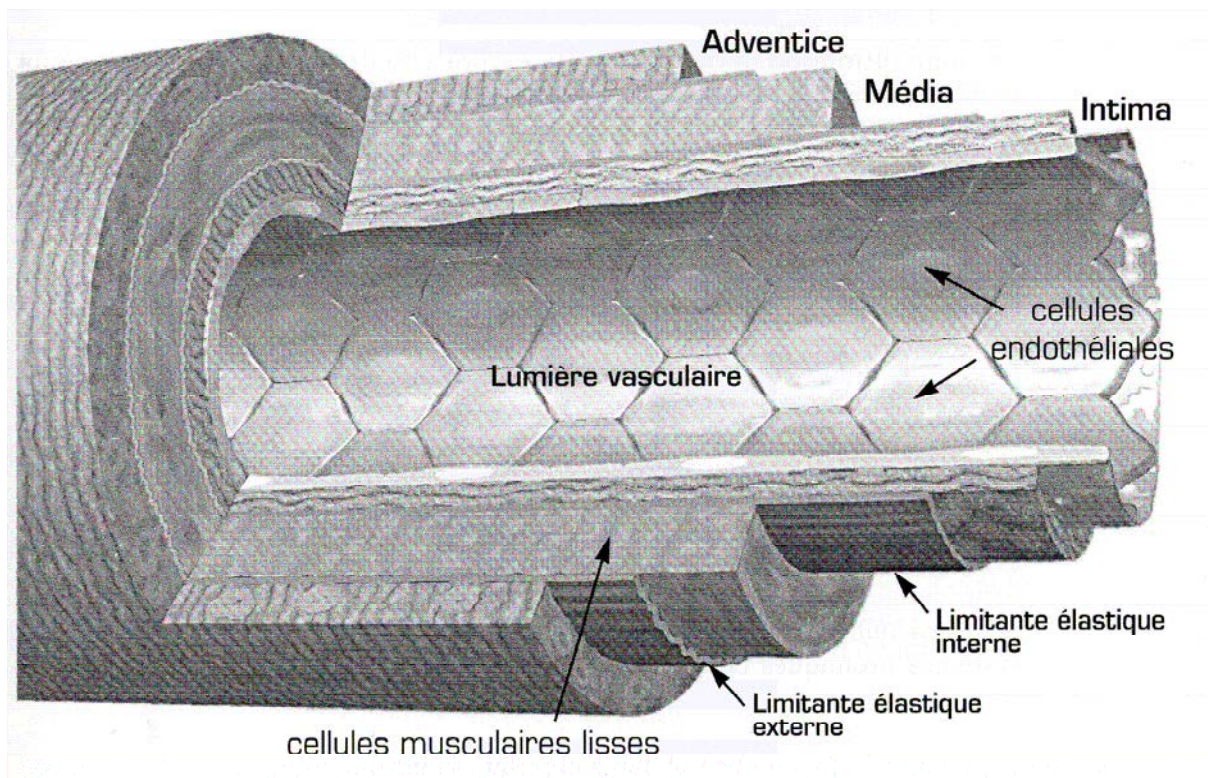


Figure 1 : Structure schématique d'un vaisseau (1)

2.1 Endothélium

La position de l'endothélium à l'interface sang/tissu le prédispose à des fonctions spécialisées comme la régulation de l'hémostase, mais aussi de nombreux autres processus physiologiques tels que la réponse immunitaire et inflammatoire, le tonus vasomoteur, la réparation tissulaire ou l'angiogénèse (10-13).

L'ensemble du réseau vasculaire avec une superficie totale de cette interface estimée chez l'homme à environ 350 m² est constitué d'une couche de CE de 50 µm (longueur) X 25 µm (largeur) environ, aplaties (0,5 µm épaisseur) et allongées dans le sens du flux sanguin (11,12,14). Les CE présentent une remarquable hétérogénéité structurale, immunologique et fonctionnelle en fonction de l'espèce, de l'âge, de l'organe d'origine, de la taille des vaisseaux ; cette hétérogénéité existe à titre d'exemple, au niveau de l'expression du facteur von Willebrand (*vWF pour von Willebrand factor*) et dans les types de composants matriciels ou dans la concentration d'activateurs du plasminogène. Il a été également démontré que les CE provenant de divers organes diffèrent en termes de production de cytokines, de propriétés adhésives et de réactivité aux stimuli inflammatoires (12). Dans toutes les territoires vasculaires, la CE est physiologiquement polarisée : sa face basale est ancrée sur une matrice thrombogène, le sous endothélium, composé de macromolécules qu'elle synthétise (collagène de type I, IV, III, V, VI, fibronectine, laminine, vWF) ; sa face apicale, en contact avec le sang, est thromborésistante (10,11,14).

Différentes familles de molécules ont été identifiées pour assurer l'adhésion : CE-CE (intégrines, cadhérines, PCAM 1 « *pour Vascular Cell Adhesion Molecule 1* »), l'adhésion CE/matrice (intégrines), et l'adhésion CE/cellules circulantes (Sélectine P, sélectine E, ICAM- 1 et 2 (*pour Intercellular Adhesion Molecules 1 et 2*), et VCAM-1 (*pour Vascular Cell Adhesion Molecule 1*). Les deux premières adhésions (CE/CE et CE/matrice) jouent un rôle important dans le maintien de la monocouche endothéliale, ainsi, dans le maintien de l'intégrité vasculaire, qui participe à la thromborésistance physiologique de l'endothélium (11,15).

2.1.1 Endothélium et hémostase

A l'état physiologique, l'équilibre entre les propriétés thromborésistantes de l'endothélium et les propriétés thrombogènes, est en faveur des activités antithrombotiques pouvant empêcher

l'activation des systèmes de l'hémostase à sa surface et l'adhésion des cellules circulantes au sous-endothélium.

2.1.1.1 Contrôle de l'hémostase par l'endothélium

En plus de l'intégrité vasculaire assurée par la continuité de la monocouche endothéliale qui empêche le contact des éléments sanguins avec les molécules thrombogènes du sous endothélium, le rôle régulateur de l'endothélium dans l'équilibre hémostatique peut être abordé selon trois niveaux :

- Interaction plaquettes-vaisseaux (hémostase primaire).
- Génération de thrombine (coagulation).
- Fibrinolyse.

➤ Inhibition de l'adhésion-agrégation plaquettaire :

A partir du pool de phospholipides membranaires, et par la voie du métabolisme de l'acide arachidonique, l'endothélium synthétise la prostacycline (PGI₂) qui est un puissant antiagrégant et vasodilatateur (11,16,17).

La PGI₂ inhibe l'adhésion des plaquettes stimulées en les désactivant, par augmentation de leur contenu en adénosine monophosphate cyclique (AMPC).

Une autre molécule, le NO (nitrique oxyde), synthétisé à partir de L-arginine grâce à une enzyme appelée NO synthétase, et libéré par l'endothélium, est responsable de l'activité de l'EDRF (*pour endothelial derived relaxing factor*) sur le tonus vasculaire, en induisant le relâchement des cellules musculaires lisses et en inhibant le recrutement et l'adhésion des plaquettes (18,19).

Enfin, la présence d'ecto-enzyme de type adénosine diphosphatase (ADPase), adénosine triphosphatase (ATPase) à la surface de l'endothélium permet de neutraliser rapidement l'adénosine diphosphate (ADP) et l'adénosine triphosphate (ATP) libérés par les plaquettes lorsqu'elles sont activées (20,21).

➤ Inhibition de la coagulation :

La CE participe à la régulation de la coagulation par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes complémentaires d'inhibition de la thrombine : 1) Les CE sont riches en glycosaminoglycanes (GAGs), des polysaccharides biochimiquement apparentés à l'héparine, qui potentialisent

l'action de l'antithrombine (AT) dans l'inhibition des facteurs activés (sérines protéases) de la coagulation en interagissant avec l'AT et l'héparine cofacteur 2 et en accélérant, par conséquence, de façon similaire à l'héparine l'inhibition de la thrombine (22,23) ; 2) L'expression et la sécrétion du TFPI (*pour tissue factor pathway inhibitor*) qui inhibe la voie extrinsèque de la coagulation (24) ; 3) L'expression des protéines impliquées dans le système anticoagulant dynamique de la protéine C activée (PCa) telles que la thrombomoduline (TM) et l'EPCR (*pour Endothelial protein C receptor*) (25) ; 4) La synthèse de la protéine S (ayant un effet anticoagulant propre et joue comme cofacteur de la PCa pour son inactivation du facteur Va et VIIIa de la coagulation) (26). 5) La synthèse de l' α_2 -macroglobuline (un autre inhibiteur de la coagulation).

➤ **Action fibrinolytique :**

En produisant de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA), et en exprimant des récepteurs à la fois pour le t-PA, l'urokinase (UK) et le plasminogène (10,11,27), les CE permettent de focaliser l'action de ces enzymes représentée par la transformation du plasminogène en plasmine (responsable de la dissolution du dépôt fibrineux formé en permanence à la surface vasculaire) en présence du t-PA et de l'UK à proximité du caillot de fibrine tout en les protégeant de l'action spécifique des inhibiteurs comme l' α_2 -antiplasmine, l' α_2 -macroglobuline, et l'inhibiteur de l'activateur vasculaire du plasminogène et de l'UK d'origine endothéliale (PAI-1 «*pour plasminogen activator inhibitor 1*») et d'origine placentaire (PAI-2) .

2.1.1.2 Activité prothrombotique de l'endothélium

Suite à une lésion vasculaire responsable de la rupture de la continuité de l'endothélium et de la mise à nu du sous endothélium thrombogène qui est alors exposé aux éléments procoagulants du sang, les processus d'hémostase primaire et de coagulation sont déclenchés. Cependant, il a été démontré que même en absence d'une lésion vasculaire, et en présence de certains stimuli, l'endothélium possède une capacité prothrombotique, directe par la synthèse des molécules proagrégantes, procoagulantes et antifibrinolytiques, ou indirecte par l'expression des molécules d'adhérence pouvant impliquer des cellules circulantes à activité thrombogène.

Phénomènes induisant les propriétés thrombogènes des cellules endothéliales suite à leur activation :

Suite à l'activation des CE par certaines molécules, impliquées dans la coagulation comme la thrombine, ou dans l'inflammation comme les cytokines telles l'interleukine 1 (IL1) et le TNF- α (*pour tumor necrosis factor-alpha*), ou aux facteurs de croissance comme le b-FGF (*pour basic fibroblast growth factor*), les CE s'impliquent dans le système de la coagulation. Ainsi, les CE pourraient participer dans la coagulation soit **directement** : par l'exposition des phospholipides membranaires, l'expression de facteur tissulaire (FT) et de facteur V, et de récepteurs membranaires pour le facteur IX-IXa, et le facteur Xa, ce qui aboutisse à une génération rapide et localisée de la thrombine (28-32) ou **indirectement** : via les propriétés adhésives des cellules endothéliales pour les leucocytes (résultant de l'activation de l'endothélium par l'endotexine et les cytokines inflammatoires) surtout les monocytes connus pour leur expression importante de FT (33), et par conséquence, de leur participation à la génération de thrombine. D'autre part, les CE activées par des traces de thrombine sont capables de la synthèse et la sécrétion de médiateurs chimiques dérivées des lipides qui activent les plaquettes comme le 15 HETE (*pour 15 hydroxyeicosatetraenoic acid*) et le PAF (*pour platelet activating factor*) (34).

Toute anomalie dans la modulation de ces mécanismes complexes de régulation est susceptible de conduire de façon irréversible à la formation d'un thrombus et à la genèse de processus vasculaires lésionnels et inflammatoires.

2.2 Les cellules musculaires lisses vasculaires

La média contient exclusivement des cellules musculaires lisses (CML) et des constituants extracellulaires : fibres élastiques, élastine, collagène et protéoglycanes. Cette couche est très variable selon les différents territoires vasculaires, et la présence et l'organisation aussi bien des fibres élastiques que des CML varient selon la fonction des vaisseaux.

Les artères musculaires possèdent une limitante élastique interne et une limitante élastique externe qui séparent la média respectivement de l'intima et de l'adventice, et quelques lamelles élastiques entre les différentes couches de CML.

Les CML sont arrangées de façon concentrique. Dans certains types d'artères, des CML sont présentes entre l'intima et la média (notamment dans les artères coronaires et les artères rénales). Dans les artérioles, les couches de CML sont beaucoup moins nombreuses mais

toujours arrangées de la même façon (1 à 2 couches de CML). Dans les veinules et certaines veines, les CML et les fibres élastiques sont plutôt organisées de façon longitudinale, selon l'axe du vaisseau.

Les CML sont des cellules peu différenciées issues du mésoderme. Elles sont généralement fusiformes et uninuclées (contrairement aux CML squelettiques qui sont plurinuclées) et mesurent de 2 à 5 μm de diamètre pour une longueur très variable selon le tissu.

In vivo, les CML représentent la composante cellulaire principale de la paroi vasculaire. Les CML sont continuellement exposées à un étirement cyclique constant résultant du flux sanguin pulsatile et de la compression du vaisseau due à un amincissement de la paroi pendant son gonflement. Ainsi, les CML sont constamment sous une stimulation mécanique et elles la transforment en signaux intracellulaires par des «mécano-capteurs" comme les intégrines, les récepteurs tyrosine kinases et les canaux ioniques (35). Il a été démontré que la mécanotransduction des signaux via les intégrines est responsable de la modulation du phénotype de CML et leurs fonctions régulant ainsi la différenciation, la prolifération, l'apoptose, la migration et la réorganisation de la matrice extracellulaire (MEC) dans les CML vasculaires. En particulier, la mécanotransduction cellulaire induit une expression rapide et transitoire de molécules régulatrices telles que des facteurs de transcription, des molécules de signalisation, des facteurs de croissance et des protéines du cytosquelette (35-39).

De plus, lorsque les CML vasculaires sont soumises à des forces mécaniques cycliques, la thrombine peut induire des effets cellulaires sur ces CML par l'intermédiaire de son récepteur PAR1 (*pour protease-activated receptor 1*) (40). Nous avons récemment montré que l'application d'un stretch mécanique (10%, 1 Hertz) pour plus de 48 heures augmente la production et la sécrétion du TFPI par les CML vasculaires *in vitro* (41). Ainsi, les forces d'étirement mécaniques cycliques pourraient moduler l'expression de protéines de coagulation par les CML vasculaires, et par conséquent, la génération de thrombine à leur surface.

2.2.1 Les intégrines

C'est une famille de protéines transmembranaires qui jouent un rôle dans l'adhésion cellulaire, servant à lier les cellules avec les composants du matrice extracellulaire, et ou les cellules d'entre elles. Les intégrines jouent un rôle très important dans la migration, la différenciation et la survie des cellules. Elles sont constituées d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . La plupart d'entre elles se lient aux molécules de la matrice extracellulaire (par la

région extra-cellulaire de la sous-unité α qui détermine la spécificité des liaisons) et aux microfilaments (par leurs parties intracellulaires qui possèdent des domaines de liaison pour des molécules du cytosquelette). La structure générale des intégrines est montrée sur la **Figure 2**. Il existe 18 sous-unités α et 9 sous-unités β différentes, et leur combinaison détermine la spécificité de l'intégrine au ligand. A ce jour, 25 couples (dimères) $\alpha\beta$ fonctionnels ont été dénombrés.

Chaque sous-unité contient 3 domaines : un court domaine cytoplasmique (en C-terminal), un court domaine transmembranaire, et un grand domaine extracellulaire (extrémité N-terminale). Les sous-unités α contiennent une série de trois à quatre séquences répétitives fixant des cations divalents (Ca^{2+} et Mg^{2+}) impliquées dans la formation du complexe intégrine – ligand (42,43) et la chaîne β possède un domaine riche en cystéine. Les sites d'interaction intégrine-ligand sont constitués d'une courte séquence d'acides aminés. Le motif le plus connu, le peptide RGD (Arginine–Glycine–Acide aspartique) est présent dans plusieurs composants de la MEC tels que la fibronectine, la vitronectine, le fibrinogène ...etc. La différence de spécificité des intégrines indique que cette séquence RGD n'est pas suffisante pour la reconnaissance. L'environnement et la conformation sont également très importants pour la présentation et la liaison de ce peptide (44). D'autres séquences spécifiques ont été mises en évidence, telles que KQAGDV (Lysine–Glutamine–Alanine–Glycine–Acide aspartique–Valine), LDV (Leucine–Acide aspartique–Valine), KRLDGS (Lysine–Arginine–Leucine–Acide aspartique–Glycine–Sérine) et DGDEA (Acide aspartique–Glycine–Acide aspartique–Acide glutamique–Alanine) (45).

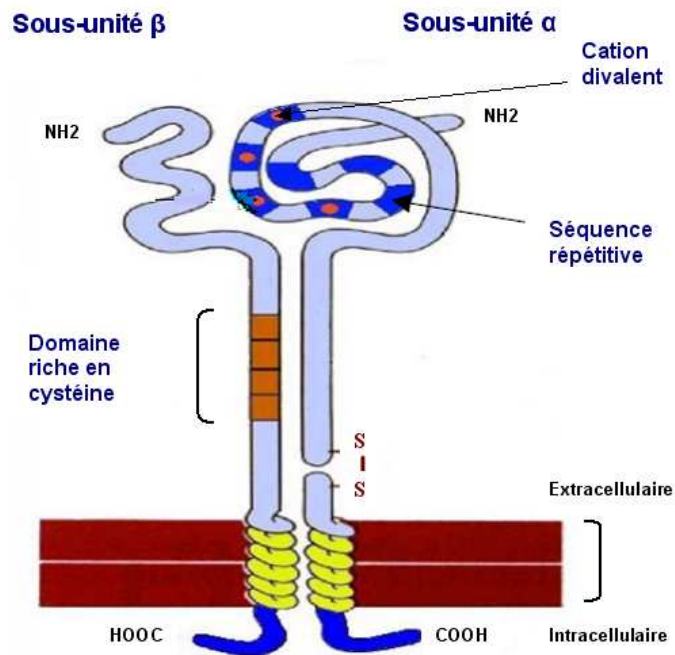


Figure 2 : Structure de l'intégrine

Au niveau intracellulaire, les intégrines, non liées directement à l'actine du cytosquelette, sont associées à des protéines régulant la motilité du cytosquelette, en particulier la taline pour la chaîne β et la paxilline pour la chaîne α , qui servent de plates-formes pour les interactions avec de nombreuses autres protéines : kindline, tensine, vinculine, actinine, filamine, parvine, cofiline, etc. Les liens ainsi créés entre la MEC et le cytosquelette se concentrent au niveau de contacts focaux constitués par le regroupement (*clustering*) des molécules d'intégrines, qui réalisent ainsi des points d'attachement de la cellule à la MEC. Ainsi, en plus de l'aspect qualitatif (affinité) de l'interaction intégrine-matrice s'ajoute l'aspect quantitatif (avidité) lié au nombre de molécules d'intégrines participant aux contacts focaux.

2.2.1.1 Voies de signalisations impliquées dans l'activation des intégrines

Les intégrines sont impliquées dans une signalisation bidirectionnelle : une signalisation « *outside-in* » permettant à la cellule de recevoir et de transmettre des consignes de prolifération ou de survie en fonction de son attachement à la MEC et une signalisation « *inside-out* », partant de messages intracellulaires activant les intégrines en modifiant leur conformation tridimensionnelle et en démasquant leurs sites récepteurs. Cette signalisation fait intervenir des kinases spécialisées, comme la FAK (*pour Focal adhesion kinase*) ou l'ILK (*pour Integrin-linked kinase*). L'activation de FAK, qui est une tyrosine kinase

cytoplasmique, la rend capable de s'autophosphoryler et d'activer en cascade d'autres voies de signalisation comme la voie des MAP kinases ou la voie de la PI3 kinase, ainsi que des kinases cytoplasmiques de la famille SRC (pour Sarcoma) comme CRK ou encore de recruter des protéines d'échange GDP (*pour Guanosine DiPhosphatase*)/GTP (*pour Guanosine TriPhosphatase*) qui activent des petites protéines G comme Rho capables, à leur tour, d'activer des kinases agissant sur les protéines du cytosquelette. Ainsi, l'activation de la FAK induit la formation des contacts focaux.

L'ILK, est une sérine/thréonine kinase qui possède un domaine de reconnaissance du phosphate en position 3 du phosphatidylinositol- 3,4,5-triphosphate. Une fois activée par la PI3 kinase, l'ILK phosphoryle la sous-unité β des intégrines, ce qui entraîne des modifications de conformation aboutissant à une modulation de la liaison intégrine–ligand au niveau de la MEC. Elle a également pour substrats de son activité kinase certaines protéines des contacts focaux : elle active des facteurs d'échange GTP/GDP de petites protéines G impliquées dans le contrôle du cytosquelette, comme Rac1 (*pour Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) et CDC42 (*pour Cell Division Cycle 42 homolog*) (46-48).

Le changement de conformation au niveau de l'intégrine suite à son activation, (via une signalisation « *outside-in* » et « *inside-out* »), est représenté sur la **Figure 3**.

En plus du rôle important des intégrines dans la liaison entre l'environnement extracellulaire et intracellulaire, certaines d'entre elles servent à la fois comme récepteurs de la prothrombine comme l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ exprimée à la surface des plaquettes et l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ exprimée à la surface de différentes cellules (plaquettes, CE et CML vasculaires).

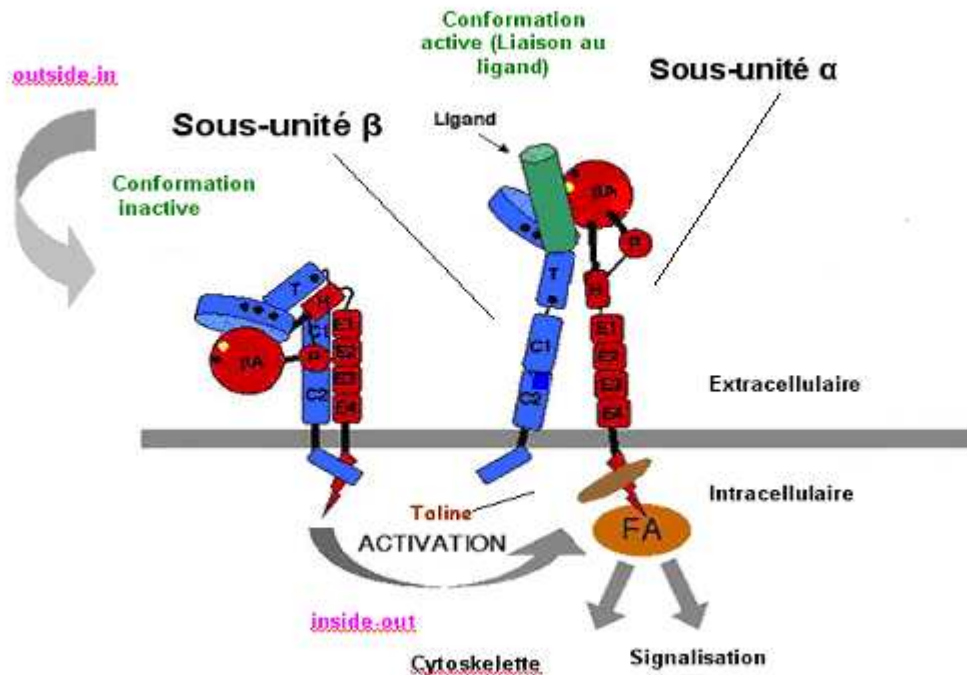


Figure 3 : Changement de conformation au niveau de l'intégrine (47)

L'activation de l'intégrine par des signaux « *outside-in* » et « *inside-out* » aboutit à sa liaison au ligand.

En liant la prothrombine, les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ et $\alpha_v\beta_3$ sont capables de concentrer la prothrombine à la surface cellulaire et d'accélérer sa conversion en thrombine. Ces deux intégrines ont de nombreux ligands communs, y compris le vWF, le fibrinogène, la fibronectine et la thrombospondine (8,49). Toutefois, les interactions de la prothrombine avec les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_{IIb}\beta_3$ sont fondamentalement différents : l'engagement de la prothrombine par l' $\alpha_v\beta_3$ à la surface des cellules vasculaires nécessite l'activation du récepteur, alors que sa liaison à l' $\alpha_{IIb}\beta_3$ à la surface des plaquettes est indépendante de l'activation de l'intégrine (7). Il a été montré que l' $\alpha_v\beta_3$ a une discrimination entre les ligands dépendants et indépendants de son activation, i.e. la prothrombine est un ligand activation dépendant de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, alors que le fibrinogène est un ligand activation indépendant de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

2.2.1.2 Les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$: structure et fonctions

2.2.1.2.1 L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

Appelée aussi glycoprotéine IIb-IIIa (GPIIb-IIIa), représentée sur la **Figure 4**, est un hétérodimère calcium dépendant, ayant une masse moléculaire de 140 kDa (kiloDalton). La GpIIb est composée de deux chaînes reliées par un pont disulfure, une chaîne lourde (b) extracellulaire et une chaîne légère (a) transmembranaire. La GpIIIa est constituée d'une chaîne polypeptidique unique, comportant plusieurs ponts disulfures intracaténaires. La GPIIIa, 90 kDa, est constituée d'une chaîne polypeptidique de 762 acides aminés. Elle est glycosylée lors de sa biosynthèse et son domaine extracellulaire représente 90% de la masse de la protéine. Les nombreux ponts intracaténaires qui caractérisent la structure de la protéine viennent de sa richesse en cystéine. La GPIIb et la GPIIIa sont synthétisées à un stade précoce de la différenciation mégacaryocytaire (50), mais elles n'existent dans les plaquettes que sous la forme du complexe GPIIb-IIIa répartis de façon homogène dans la membrane plasmique des plaquettes au repos qui comptent 50000 molécules GPIIb-IIIa par plaquette. 70% de la GPIIb-IIIa sont localisés à la surface des granules α ainsi que dans le système caniculaire ouvert. Après activation et dégranulation des plaquettes, les membranes des granules α fusionnent avec la membrane plasmique, augmentant le nombre des molécules de GPIIb-IIIa à la surface des plaquettes. En liant le fibrinogène, l' $\alpha_{IIb}\beta_3$ joue un rôle majeur dans l'agrégation plaquettaire en formant des ponts de fibrinogène entre les différentes plaquettes (51-53). Au cours de l'activation plaquettaire, la GPIIb-IIIa acquiert la capacité de fixer plusieurs protéines plasmatiques : le fibrinogène, le vWF et la fibronectine. Compte tenu de sa concentration plasmatique importante, et de sa plus grande affinité pour la GPIIbIIIa, le fibrinogène est toutefois le ligand distinct de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Byzova *et al* (7) ont montré que l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ sert de récepteur pour la prothrombine et cette interaction accélère la transformation de prothrombine en thrombine. Il a été démontré également que la liaison de la prothrombine à l' $\alpha_{IIb}\beta_3$ sur les plaquettes est indépendante de l'activation de l'intégrine (8).

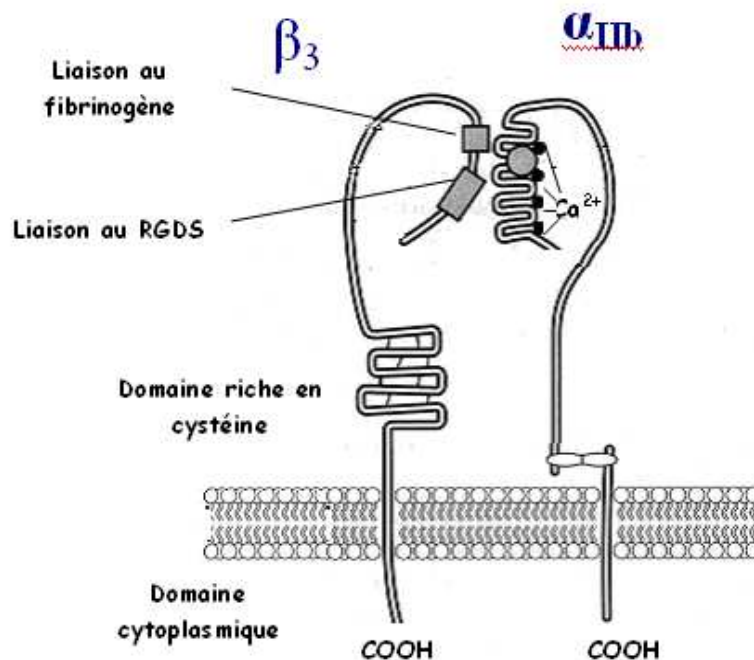


Figure 4 : Structure schématique du complexe ($\alpha_{IIb}\beta_3$) au repos (1)

2.2.1.2.2 L'intégrine $\alpha_v\beta_3$

Représentant l'une des intégrines les plus répandues, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est exprimée sur toutes les cellules provenant du mésenchyme et sur une variété de types de cellules dans les vaisseaux sanguins, y compris les cellules endothéliales, les CML, les fibroblastes, les macrophages, et en nombre moins important sur les plaquettes. Cette intégrine a un rôle dans l'angiogenèse, la réponse vasculaire aux blessures, la formation néointimale et la prolifération des CML en réponse à la thrombine (49,54). L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (**Figure 5**) possède la même sous-unité beta et une sous-unité alpha homologue (34%) à celle de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Sa liaison à de nombreux ligands implique aussi la reconnaissance d'une séquence RGD. Ces deux intégrines ont de nombreux ligands communs, y compris le vWF, le fibrinogène, la fibronectine et la thrombospondine.

Bien que les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ et $\alpha_v\beta_3$ aient la même sous-unité β_3 et que la sous-unité β soit impliquée dans plusieurs voies de signalisation et interactions avec le cytosquelette, les voies de signalisation (« *outside-in* » et « *inside-out* ») qui impliquent ces deux intégrines pourraient ne pas être les mêmes. La signalisation intracellulaire qui implique l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ ne dépend

pas que de son occupation par le ligand comme le fibrinogène. Ainsi, l'agrégation plaquettaire induite par ce dernier peut aussi influencer cette signalisation. Comme les cellules vasculaires n'ont pas la propriété de s'agréger comme les plaquettes, donc, la signalisation qui implique l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ sur les cellules vasculaires (comme les CML) pourrait ne pas être la même que celle qui implique l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ sur les plaquettes (55). La signalisation impliquant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ semble influencer et réguler l'avidité de cette intégrine et jouer un rôle important dans la modulation des effets de la MEC sur la prolifération, l'activation, la différenciation, la migration, l'adhésion et l'angiogénèse cellulaire (55).

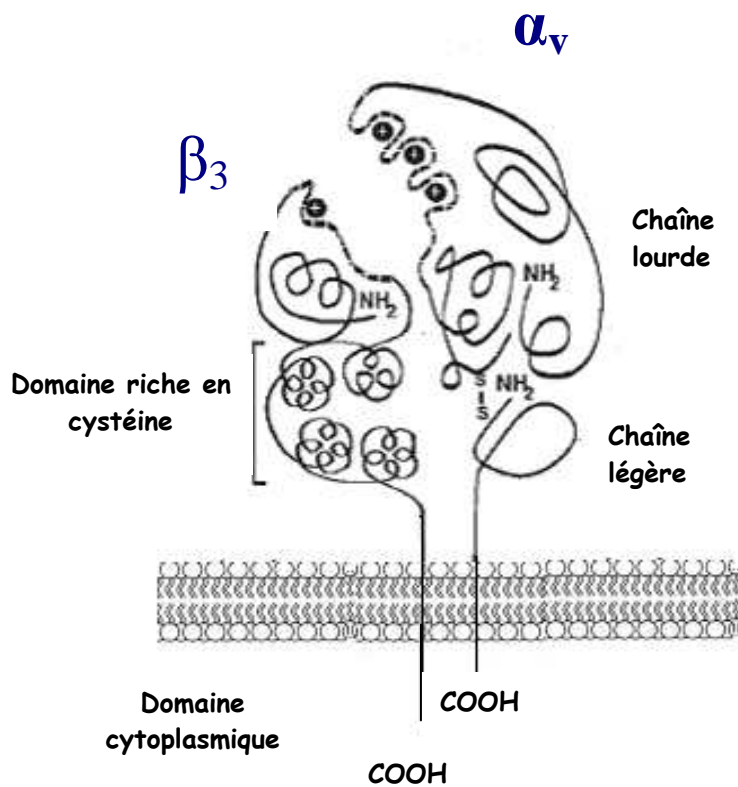


Figure 5 : Structure schématique du complexe ($\alpha_v\beta_3$) au repos (49)

2.3 Les plaquettes sanguines

2.3.1 Description générale

Ce sont des fragments cytoplasmiques issus des mégacaryocytes localisés dans la moelle osseuse. Après leur formation, elles sont libérées dans les sinusoides. A l'état normal 2/3 circulent dans le sang et 1/3 est stocké dans la rate. Les plaquettes circulantes sont des cellules anuclées de petite taille dont le nombre est compris entre 150 à 400 G /L. Les plaquettes non activées circulent dans le sang sous la forme de disques d'environ 2 μm de diamètre et possèdent un volume moyen de 7 à 12 μm^3 . D'une durée de vie comprise entre 7 et 12 jours, les plaquettes sont ensuite éliminées par phagocytose grâce au système monocytaire macrophagique de la rate, du foie et de la moelle osseuse principalement. L'ultrastructure complexe des plaquettes révélée par la microscopie électronique montre qu'elles comportent un système membranaire (plasmique et intracellulaire), un cytosquelette (microtubules et microfilaments) et des granules intraplaquettaires, granules denses (granules δ), granules α , lysosomes (granules λ). De plus, il existe dans son cytoplasme un vestige d'appareil de Golgi et de réticulum endoplasmique appelé système tubulaire dense, lieu de stockage du calcium intracellulaire. Les plaquettes possèdent également deux sources d'énergie assurant leur fonction ; ce sont des mitochondries en quantité limitée, et un grand nombre de glycogènes disséminés dans le cytoplasme (56-61).

2.3.2 Interaction plaquettes-paroi vasculaire

Les interactions des plaquettes avec les protéines adhésives du sous-endothélium font intervenir des récepteurs présents sur la membrane native des plaquettes ou exposés lors de l'activation plaquettaire. Ces récepteurs sont des glycoprotéines appartenant à la famille des intégrines. Dans les conditions physiologiques, il ne semble pas que les plaquettes puissent adhérer aux CE. Une lésion vasculaire, en mettant à nu le sous-endothélium, permet cette adhésion. Physiologiquement, cette interaction des plaquettes avec la paroi vasculaire, lors d'une brèche vasculaire, est essentielle pour l'arrêt du saignement et le maintien de l'intégrité de la paroi vasculaire. Les plaquettes peuvent se fixer au vWF ancré dans la matrice sous endothéliale (mais pas au vWF circulant) par l'intermédiaire de l'intégrine GPIb-GPIX pour

les plaquettes au repos ou de l'inégrine GPIIb-IIIa pour les plaquettes activées. Les plaquettes adhèrent également au collagène de la MEC via l'intégrine GPIa-IIa et aux autres structures sous endothéliales comme la fibronectine, la vitronectine via l'intégrine GPIIb-IIIa sur les plaquettes activées et à la laminine via l'intégrine GPIa-IIa (62-64).

2.4 Hémostase

L'hémostase est le processus physiologique aboutissant à l'arrêt d'une hémorragie et dont les mécanismes se déroulent en trois grandes étapes : l'hémostase primaire, l'hémostase secondaire (ou la coagulation sanguine) et la fibrinolyse.

2.4.1 L'hémostase primaire

Elle fait intervenir une vasoconstriction temporaire, les plaquettes, le vWF et le fibrinogène. Elle aboutit à la fermeture de la brèche vasculaire par un "thrombus blanc" (clou plaquettaire) (Figure 6).

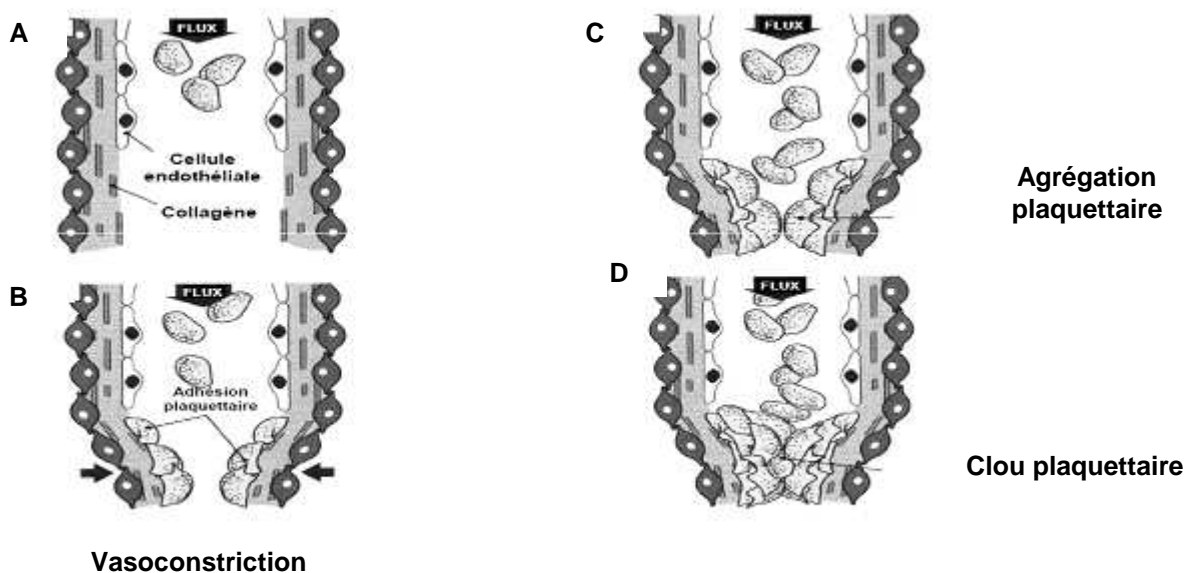


Figure 6 : Etapes de l'hémostase primaire

Après la lésion vasculaire, les plaquettes viennent adhérer aux surfaces sous-endothéliales où elles s'activent, sécrètent leur contenu granulaire et s'agrègent. L'adhésion est facilitée par la fixation du vWF à la GPIb présente sur la membrane plaquettaire.

L'agrégation des plaquettes fait intervenir l'interaction entre le fibrinogène et le complexe glycoprotéique GPIIb/IIIa à la surface plaquettaire. Simultanément, les plaquettes amplifient la génération de thrombine, en exposant des phospholipides anioniques membranaires, supports indispensables sur lesquels surviennent les réactions enzymatiques de la cascade de la coagulation.

2.4.1.1 Activation plaquettaire : Les plaquettes s'activent *in vivo* suite à leur adhésion aux structures sous-endothéliales ou *in vitro* sous l'effet d'un stimulus externe (ADP, thrombine, collagène...). L'activation plaquettaire comprend plusieurs événements :

- **Adhésion et changement de forme :** Les plaquettes activées, qui ont au repos une forme discoïde maintenue par les réseaux de microtubules et de filaments d'actine situés sous la membrane, deviennent sphériques avec une formation de pseudopodes en raison de la dépolymérisation de leurs microtubules, et le début de la polymérisation des filaments d'actine.
- **Sécrétion :** Dans les plaquettes activées, l'adhésion et la contraction des plaquettes lors de l'activation induit un regroupement de leurs granules, un fusionnement des membranes de ces dernières avec celle du système canaliculaire ouvert, ainsi qu'une sécrétion de leur contenu à l'extérieur de la plaquette par deux mécanismes dépendants ou non de la voie de l'acide arachidonique selon l'intensité de la stimulation. La sécrétion concerne les trois types de granules. Les substances libérées sont biologiquement actives et peuvent renforcer l'agrégation et la sécrétion des plaquettes (ADP, calcium, fibrinogène et sérotonine), influencer la coagulation (facteur V, fibrinogène, vWF, protéine S) et modifier la perméabilité vasculaire (VEGF « *pour Vascular Endothelial Growth Factor* ») et le tonus vasculaire (sérotonine). Les molécules thrombogènes sécrétées tels que l'ADP, la sérotonine, la thrombospondine, le fibrinogène et le vWF vont participer au recrutement de plaquettes non activées circulantes au niveau du site de lésion et initier ainsi l'
- **Agrégation :** Sur une première couche de plaquettes adhérentes au collagène via la glycoprotéine Ib qui se colle au sous endothélium grâce au vWF qui sert de ciment, se fixent d'autres plaquettes, par un phénomène d'agrégation plaquettaire grâce au fibrinogène qui établit des ponts entre les plaquettes par l'intermédiaire des glycoprotéines GPIIbIIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) présentes à leur surface. Une fois activé par le collagène, l'ADP ou bien encore la

thrombine, le complexe peut lier les protéines adhésives (fibrinogène, vWF, fibronectine et vitronectine) grâce à un changement de conformation. Ainsi, le fibrinogène lié au complexe GpIIb-IIIa établit des ponts entre les plaquettes par liaison au niveau de deux GpIIbIIIa situés sur deux plaquettes différentes entraînant ainsi leur agrégation (**Figure 7**).

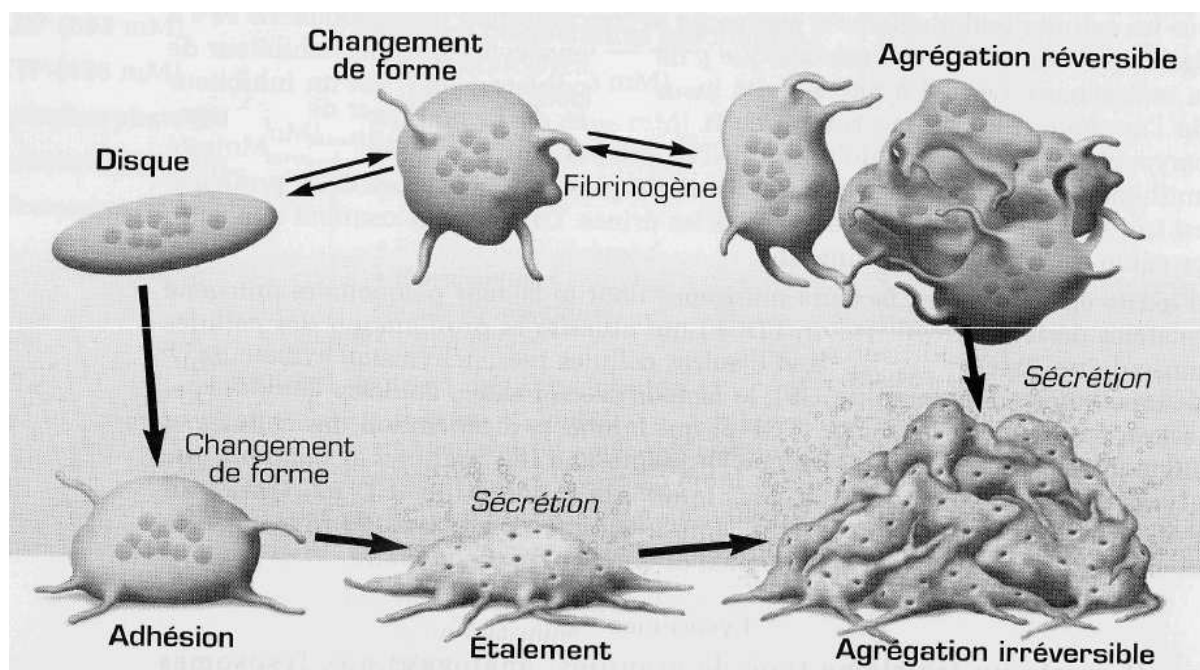


Figure 7 : Activation Plaquettaire (1)

➤ **Exposition des phospholipides anioniques (microvésiculation) :**

Même si ce phénomène a été plus étudié au niveau des plaquettes, il peut concerner tous les types cellulaires en réponse à un processus d'activation cellulaire ou d'apoptose.

Les membranes plasmiques sont constituées de molécules en proportions variables selon le type cellulaire (globalement 50% de lipides, 45% de protéines et 5% de glycanes), et sont organisées en bicouche. Les deux feuilletts de la membrane des cellules au repos présentent une asymétrie transversale de répartition de leurs phospholipides. Parmi ces derniers, la phosphatidylcholine (PC) et la sphingomyéline (SM) sont localisées principalement dans le feuillet externe ou exoplasmique, où se trouve aussi la plus grande proportion du cholestérol membranaire ; la phosphatidylsérine (PSer), la phosphatidyléthanolamine (PE) et les phosphoinositides (PI) sont majoritairement présents dans le feuillet endoplasmique. Deux protéines assurant le transport des phospholipides maintiennent l'équilibre de cette asymétrie au niveau de la membrane cellulaire. Un aminophospholipide translocase (flippase) spécifique pour la PSer et la PE induit un flux net de la face externe vers la face interne de ces

phospholipides par un mécanisme nécessitant de l'ATP mais inhibé par le calcium. Une deuxième enzyme, la floppase induit un transport de phosphatidylcholine et d'aminophospholipides de la face interne vers la face externe des plaquettes. Ce phénomène est calcium dépendant et nécessite également la présence de molécules d'ATP. Ce phénomène de «flip-flop» membranaire conduit à l'expression de phospholipides anioniques et procoagulants (phosphatidylsérine principalement) à la face externe des membranes plaquettaires (ou cellulaires lors de l'activation cellulaire) et un remaniement membranaire induisant la libération de microvésicules riches en phospholipides anioniques dans la circulation sanguine (65-69).

Lors de l'activation des cellules, la concentration en calcium cytosolique augmente. La flippase est inhibée et une troisième enzyme est activée, la scramblase, induisant une perte de l'asymétrie des phospholipides. Les phospholipides anioniques se retrouvent dans le feuillet externe par un mécanisme de «flip-flop» (66,68,70) montré sur la (**Figure 8**). La scramblase, qui ne nécessite pas d'ATP, assure un transport bidirectionnel et aspécifique des phospholipides entre les deux feuillets de la membrane. La quantité d'exposition des phospholipides anioniques au niveau de la membrane externe est variable et dépend de l'intensité de l'activation comme le montre une étude réalisée en présence de différents agonistes par Bevers *et al* (66). Comparées aux plaquettes contrôles, les plaquettes activées par les agonistes physiologiques (thrombine et collagène) se caractérisent par une augmentation de l'exposition des différents phospholipides sauf de la SM. La PSer et la PE sont augmentées de façon plus importante quand les plaquettes sont activées par un mélange de collagène + thrombine, ou par des agonistes non physiologiques (diamide et ionophore calcique comme le A23187).

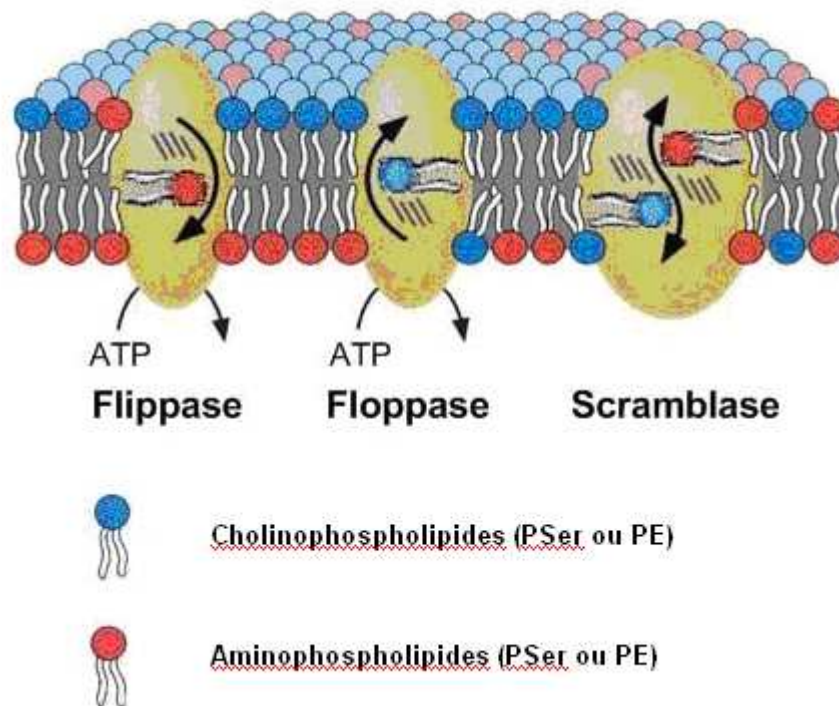


Figure 8 : Fonctionnement des flippase, floppase et scramblase (70)

2.4.2 L'hémostase secondaire : ou la coagulation sanguine

L'étape clé est la génération de thrombine, elle nécessite deux types de composants en présence du calcium :

- A. Plasmatiques : ou facteurs de coagulation.
- B. Cellulaires : les phospholipides membranaires et/ou des récepteurs pour certains facteurs de coagulation. La thrombine générée sera responsable de transformer le fibrinogène soluble en filaments de fibrine insoluble qui s'agglutinent autour du clou plaquettaire pour former un réseau de fibrine emprisonnant des globules rouges (thrombus rouge).

2.4.2.1 Les protéines de la coagulation

Les protéines de la coagulation sont d'une part les facteurs de la coagulation qui aboutissent à la génération de thrombine et d'autre part les inhibiteurs de la coagulation. Ce sont des glycoprotéines synthétisées principalement dans le foie sauf le FT.

2.4.2.1.1 Les facteurs de la coagulation

Les facteurs de la coagulation répertoriés dans le **Tableau I** ont été désignés par un numéro en chiffre romain par un comité international de standardisation en 1954 (1). Une fois ces facteurs activés, le numéro en chiffre romain est accompagné d'un suffixe « a ».

	Masse moléculaire (Dalton=Da)	Lieu de synthèse principal	Concentration Plasmatique (µg/mL)	Fonction	Vitamine K dépendance
I ou Fibrinogène	333000	foie	2600	substrat	non
II ou prothrombine	72000	foie	100	zymogène	non
V ou Proaccélélerine	330000	foie	10	cofacteur	oui
VII ou Proconvertine	51000	foie	0,5	zymogène	non
VIII ou antihémophile A	330000	foie	0,1	cofacteur	oui
IX ou Facteur Christmas ou facteur antihémophile B	55000	foie	5	zymogène	oui
X ou Facteur Stuart-Prower	59000	foie	10	zymogène	oui
XI ou Facteur Rosenthal	160000	foie	10	zymogène	non
XII ou Facteur Hageman	80000	foie	30	zymogène	non
XIII Facteur fibrin-stabilizing	300000	foie	20	zymogène	non
FT	37000	Divers types cellulaires	Non détectable	cofacteur	non
Protéine C	62000	foie	5	zymogène	oui
Protéine S	80000	foie	25	cofacteur	oui
TM	60300	endothélium	Non détectable	cofacteur	non
AT	58200	foie	150	Inhibiteur/cofacteur	

Tableau I : Les protéines plasmatiques de la coagulation et leurs principaux inhibiteurs

Tous les facteurs de la coagulation, sauf le FT et le calcium sont synthétisés par l'hépatocyte. En conséquence, chaque fois qu'il existe une insuffisance hépatocellulaire sévère, qu'elle qu'en soit la cause, il y aura une diminution globale, non sélective de tous les facteurs de coagulation et de leurs activités. Cette baisse d'activité est la conséquence d'un défaut de

synthèse de la protéine qui supporte l'activité de facteurs de la coagulation sauf le facteur VIII qui garde un taux normal ou élevé, même en cas d'insuffisance hépatocellulaire en raison de l'existence d'autres sources du FVIII. L'expression de l'ARN messager (ARNm) du FVIII a été mise en évidence au niveau d'autres organes, en particulier, le rein, la rate et au niveau des lymphocytes.

Le facteur tissulaire (FT) : Le FT est une glycoprotéine transmembranaire de 47 kDa synthétisée sous forme d'un propeptide de 295 acides aminés (aa) et qui après clivage du peptide signal de 32 aa donne la protéine mature de 263 aa (71). Le FT comporte une partie extracellulaire (aa 1 à 219), un domaine transmembranaire (aa 220 à 242) et un domaine intracytoplasmique (aa 243 à 263) (**Figure 9**).

Le domaine extracellulaire est le récepteur du FVII de la coagulation et aussi de sa forme activée (FVIIa). La liaison du FT au FVII entraîne son activation en FVIIa, par rupture d'un pont disulfure dans la molécule FVII (72). Les résidus clés permettant la fixation du FVIIa sont les résidus 16 à 26, l'Asp (Acide aspartique) 58, l'Arg (Arginine) 135 et la Phe (Phénylalanine) 140. Les Lysines 165-166 sont impliquées dans la fixation et l'activation du FIX et du FX (**Figure 10**).

Le segment transmembranaire, riche en aa hydrophobes, semble cependant indispensable à la liaison du FVII au domaine extracellulaire : une molécule de FT soluble privée du domaine transmembranaire est incapable de lier et d'activer le FVII. La région intracellulaire située en C-terminal, comporte le résidu Cystéine 245 qui est lié à un acide gras pour l'ancrage de la protéine à la membrane phospholipidique (73).

Le rôle de la partie intracytoplasmique reste encore mal connu. Alors qu'il était admis que le FT était synthétisé *in vivo* sous sa forme complète, Bogdanov *et al* ont montré, la synthèse *in vivo* d'une forme alternative du FT (74). Ce FT, dénommé FT alternativement épissé (*asTF* = "*alternatively spliced tissue factor*"), est une protéine de 206 aa dont les résidus 1 à 166 sont identiques à la forme complète du FT, tandis que les résidus 167 à 206 forment une nouvelle queue C-terminale. Il ne possède donc ni domaine transmembranaire, ni queue intracytoplasmique. La paire de lysine, Lys165-Lys166, qui intervient dans les interactions entre le FT et le facteur VIIa (75), est conservée dans la forme alternativement épissée (74). Bien qu'il ne possède ni domaine transmembranaire, ni queue intracytoplasmique, le *asTF* présente une activité procoagulante en présence de phospholipides (74).

Le FT est un récepteur de très haute affinité pour les FVII et FVIIa. Il a deux fonctions principales : il est responsable de l'autoactivation du FVII en FVIIa et est le cofacteur du

FVIIa pour l'activation des FIX et FX. Ces réactions nécessitent des phospholipides anioniques et du calcium. La voie du FT pour le déclenchement de la coagulation (appelée également la voie extrinsèque) est prépondérante *in vivo*.

Des études ont montré que le FT est exprimé dans les fibroblastes, les adipocytes (76), les astrocytes (77) et les péricytes (78). Les CML vasculaires expriment également le facteur tissulaire (79,80) de façon constitutive et après stimulation. Dans des conditions physiologiques, le FT n'est pas exprimé par les CE. Cependant, son expression peut y être induite *in vitro* grâce à différents stimuli tels que le TNF- α (81), les lipopolysaccharides (82), les cytokines (83) et l'histamine (84). L'induction *in vivo* du FT dans les CE continue à faire débat, bien que quelques études aient mis en évidence sa présence dans l'endothélium de patients anémiques et dans des modèles de septicémie induite par *Escherichia coli* chez les babouins (85,86).

Au niveau des organes, la distribution du FT n'est pas uniforme. Ainsi, des quantités importantes de FT ont été détectées dans les organes hautement vascularisés, tels que les poumons, le cerveau et le placenta (87,88). Le FT alternativement épicié a été détecté dans les poumons, le placenta et le plasma (89). Il a également été détecté dans des cellules, telles que les cardiomyocytes (90) et de nombreuses cellules cancéreuses (glioblastome, mélanome, carcinome gastrique,...)(91).

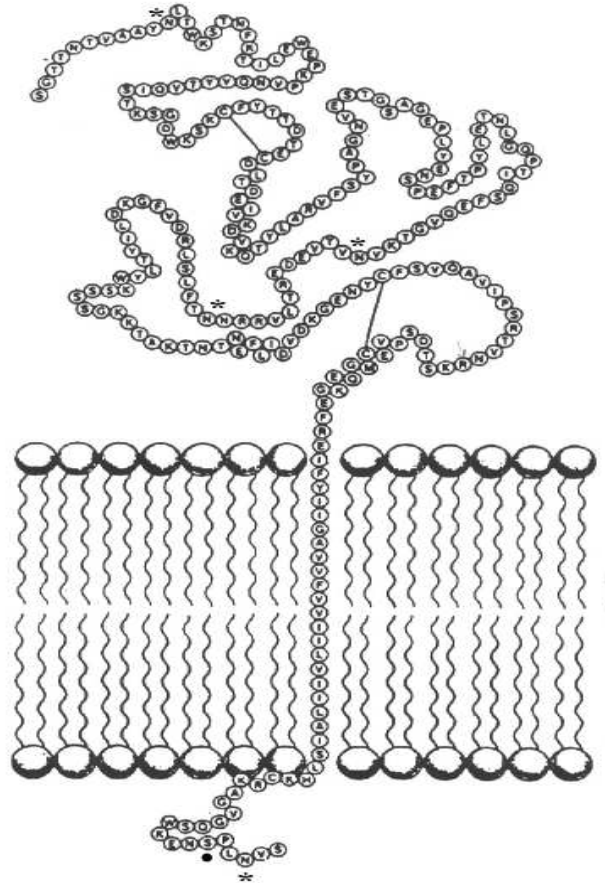


Figure 9 : Structure du facteur tissulaire humain (sans le peptide signal) (71)
 Astérisque : site de N-glycosylation ; rond noir : site de phosphorylation.

L'existence de FT circulant dans le sang a été démontrée et il a été dénommé "*blood-borne TF*" (92). Les sources actuelles de ce FT ne sont pas encore parfaitement déterminées. Le « *blood-borne TF* » existe sous une forme encryptée, et donc non fonctionnelle, séquestrée dans les cellules et les microparticules (93). La transformation en forme décryptée du FT, qui pourrait accompagner la transposition des phospholipides anioniques vers le feuillet externe des cellules (94), se produit lors d'une lésion ou d'une activation cellulaire (95).

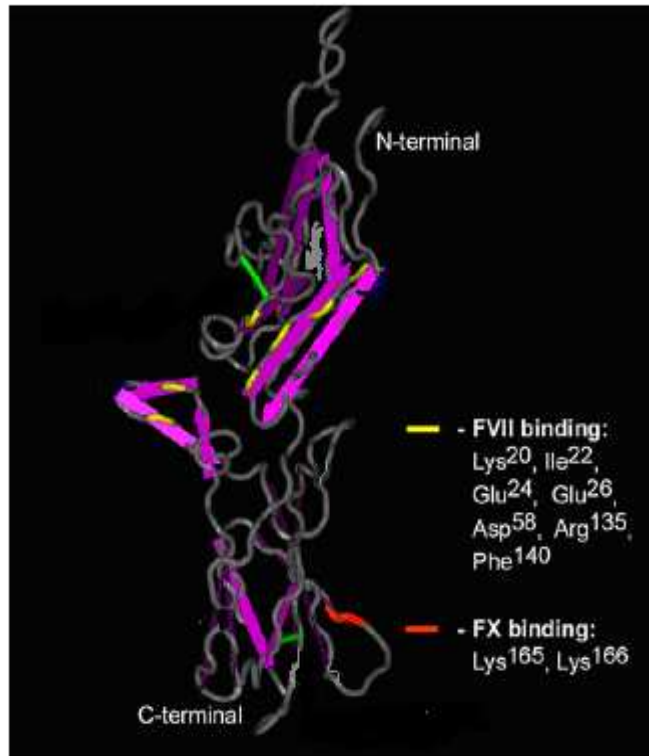


Figure 10 : Modélisation du domaine extracellulaire du FT humain (72)

Les ponts disulfures (en vert) proches des résidus qui interagissent avec le FVII (en jaune) et le FX (en rouge).

Actuellement, le rôle fonctionnel du FT circulant reste controversé. Certains auteurs considèrent en effet que la quantité de FT circulant est insuffisante pour générer un caillot hémostatique (96) et que la coagulation ne peut être déclenchée que par le FT exprimé dans la paroi des vaisseaux sanguins (97) alors que d'autres auteurs décrivent un FT circulant capable d'activer la coagulation (98).

Le fibrinogène : Il est le précurseur de la fibrine et est considéré comme le substrat de la coagulation. C'est une glycoprotéine de 340 kDa, formée de 6 chaînes polypeptidiques α , β et γ identiques 2 à 2. La cohésion est assurée par de nombreux ponts disulfures dans la région NH_2 terminale des chaînes polypeptidiques. Il contient des fibrinopeptides A et B au niveau des domaines N terminaux des chaînes A_α et B_β , qui sont clivés par la thrombine (**Figure 11**).

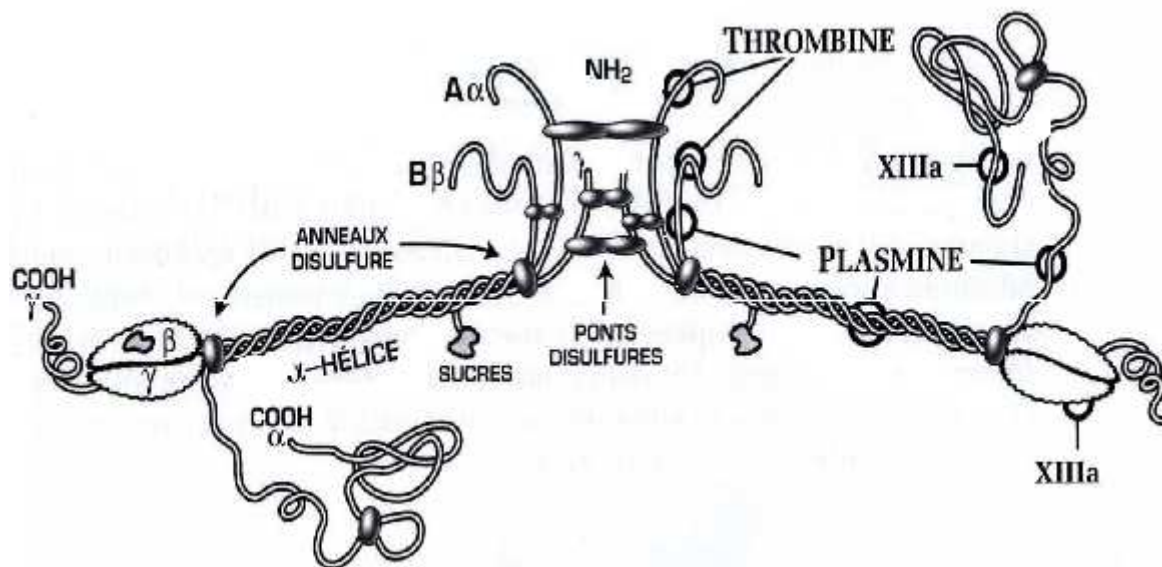


Figure 11 : Structure schématique du fibrinogène et sites de clivage par la thrombine

Comme décrit ci-dessus, les plaquettes s'agrègent entre elles via des ponts de fibrinogène, par l'intermédiaire de trois paires de sites de liaison pour la GpIIb/IIIa : une séquence de douze acides aminés à l'extrémité C-terminale de ses chaînes γ , une séquence RGDS (Arginine–Glycine–Acide aspartique–Sérine) et 14 séquences RGDF (Arginine–Glycine–Acide aspartique–Phénylalanine) situées sur ses chaînes α .

Facteurs dépendants de la vitamine K :

La vitamine K intervient dans l'étape finale de la synthèse de quatre facteurs de coagulation, les facteurs **II, VII, IX et X** et également dans la synthèse de la protéine C et la protéine S, deux protéines qui jouent un rôle régulateur de la coagulation.

La vitamine K est le cofacteur d'une enzyme, la carboxylase, qui convertit des résidus d'acide glutamique en acide- γ -carboxyglutamique (Gla) dans la région amino-terminale de ces protéines (**Figure 12**). Les résidus Gla sont indispensables à l'activité de ces protéines. Ils permettent leur liaison au niveau des phospholipides anioniques en présence de calcium.

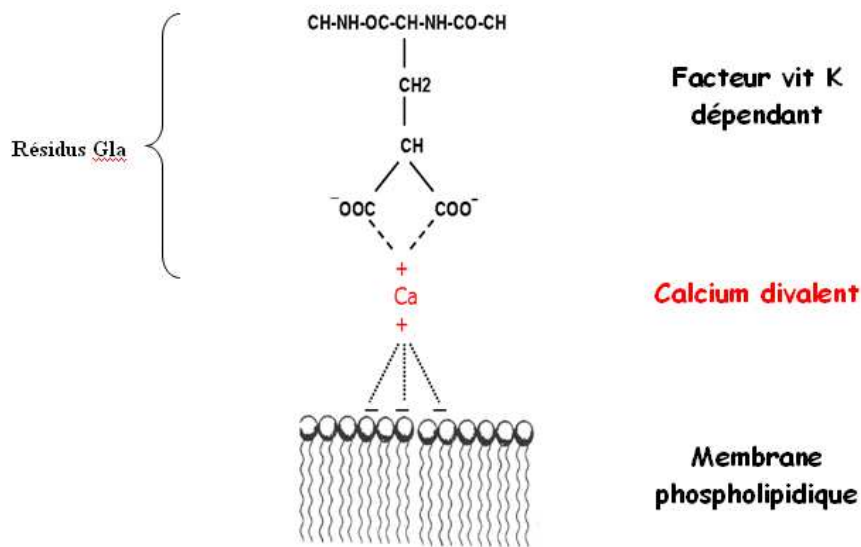


Figure 12 : Liaison des protéines vitamine K-dépendantes (carboxylées) aux phospholipides anioniques via des ponts calciques

Les facteurs vitamine K dépendants sont des zymogènes de sérines protéases constitués d'une seule chaîne polypeptidique à l'exception du facteur X. Leur masse moléculaire varie de 50 et 70 kDa. La région amino-terminale est suivie, pour les facteurs VII, IX et X, par deux domaines répétitifs (environ 50 aa) analogues au facteur de croissance épidermique (EGF « pour *Epidermal Growth factor* ») puis par un domaine sérine protéase. Pour la prothrombine, les deux domaines EGF sont remplacés par deux domaines « kringle » (K, environ 85 aa). Ces domaines permettent d'établir des interactions protéine-protéine, essentielles à la cohésion des complexes enzymatiques de la coagulation. Le site catalytique de l'enzyme est toujours centré sur une sérine non loin de l'extrémité COOH terminale (Sérine, Acide aspartique, Histidine) (99).

FXI, FXII et prékallikréine sont aussi des zymogènes de sérines protéases, mais ne sont pas vitamine K-dépendants. Le facteur XI est un dimère constitué de deux sous-unités identiques unies par un pont disulfure. Ces sous-unités contiennent quatre domaines caractéristiques de 90 aa en forme de pomme, puis un domaine sérine protéase (100). La prékallikéine (PK) est monocaténaire, mais avec une structure très voisine de celle du facteur XI. Elle circule dans le plasma sous la forme d'un complexe binaire avec le kininogène de haut poids moléculaire

(KHPM). Le facteur XII est monocaténaire, il a une structure différente dans la partie amino-terminale mais la partie carboxy-terminale porte également un domaine sérine protéase. Le FXI, FXII, la prékallikréine, et le KHPM représentent les facteurs de la phase contacte.

Le facteur XIII est le zymogène d'une transglutaminase qui agit sur les polymères de fibrine pour y apporter des liaisons covalentes fortes afin de renforcer et stabiliser la fibrine pour la rendre plus résistante à l'action de la plasmine. C'est un tétramère composé de deux sous-unités α et deux sous-unités β . Les sous-unités α contiennent le site catalytique qui va être démasqué lors de l'activation du facteur XIII, alors que les sous-unités β stabilisent et régulent les sous-unités α (101).

Les cofacteurs : Les facteurs **V**, **VIII**, et le **KHPM** sont des cofacteurs enzymatiques et non des zymogènes. Les facteurs V et VIII sont des glycoprotéines de grande taille (330 kDa) de structure très proche. Ils comportent trois domaines A (environ 330 aa) et deux domaines C (environ 150 aa), répartis entre les régions amino-terminale et carboxy-terminale des molécules et séparés par une région de connexion, différente entre les deux molécules et très sensibles à la protéolyse, surtout pour le facteur VIII. Cette protéolyse est responsable de l'existence de fragments du FVIII et du FV de plus petites tailles (200 à 80 kDa). Ces fragments sont générés par excision d'une partie de la région centrale. Le KHPM est une protéine monocaténaire dont la structure est différente de celle des facteurs V et VIII, mais qui se comporte également comme un cofacteur. Pour être actif, il lui suffit simplement d'être fixé sur une surface électronégative, telle que le verre ou le kaolin *in vitro* ou le sous-endothélium *in vivo*.

Pour acquérir leur rôle de cofacteurs les FV et FVIII doivent être activés par la thrombine ou le FXa. L'activité protéolytique des facteurs de la coagulation (FVIIa, FIXa et FXa) est négligeable en absence de calcium, de phospholipides et de leur cofacteur (FT, FVa et FVIIIa) (102).

Le **Tableau II** présente l'efficacité de ces différents constituants sur l'activation des zymogènes (102).

Enzyme	Zymogène	Facteur d'activation
FVIIa	FX	1
FVIIa/FT/phospholipides/Ca ²⁺	FX	1,8×10 ⁷
FIXa	FX	1
FIXa/FVIIIa/phospholipides /Ca ²⁺	FX	1,2×10 ⁹
FXa	FII	1
FXa/FVa/phospholipides /Ca ²⁺	FII	1.1×10 ⁶

Tableau II : Activation des zymogènes en fonction de la présence ou non de cofacteurs de la coagulation

2.4.2.1.2 Les éléments cellulaires

La coagulation ne peut se dérouler sans la présence de surfaces phospholipidiques fournies par des cellules (endothéliales, monocytes, plaquettes, musculaires lisses, fibroblastes ...), ainsi par des dérivées de ces cellules telles que les microparticules.

Lors de l'activation cellulaire, les phospholipides anioniques membranaires (notamment la P_{Ser}) sont externalisés et servent de surface de catalyse aux réactions de coagulation.

La coagulation est un phénomène de surface ; les enzymes et les substrats se fixent sur les phospholipides chargés négativement via des ponts calciques (**Figure 13 A**). Les cofacteurs se fixent d'une part sur les phospholipides, d'autre part sur le substrat pour lesquels ils possèdent des sites de reconnaissance spécifiques. Cet arrangement concentre localement l'enzyme et le substrat en accélérant la réaction « Exemple : complexe prothrombinase (**Figure 13 B**) ».

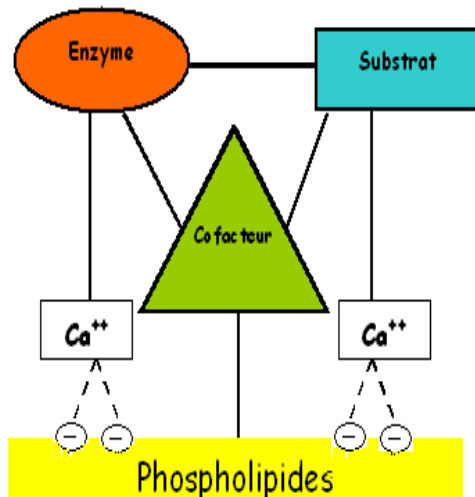


Figure 13 A : Principe des réactions enzymatiques de la coagulation sur les surfaces phospholipidiques.

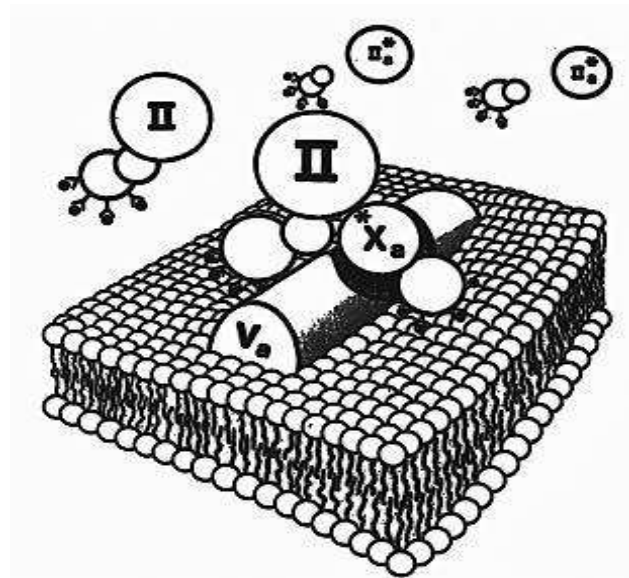


Figure 13 B : la coagulation est un phénomène de surface «complexe prothrombinase».

Figure 13 : Rôle des surfaces phospholipidiques dans les réactions enzymatiques de la coagulation

Plusieurs études au niveau des plaquettes humaines se sont intéressées aux mécanismes impliqués dans l'intervention de leurs surfaces dans la génération de thrombine.

Aucune corrélation n'a été observée entre l'exposition de P_{Ser} à la surface des plaquettes et la quantité de la thrombine générée suggérant un rôle d'autres éléments que la P_{Ser} dans la détermination de la quantité de thrombine générée à la surface des plaquettes (3). Plusieurs molécules ont été identifiées comme récepteurs de certains facteurs de coagulation au niveau des plaquettes. Le complexe GP-Ib-IX-V a été identifié comme un des récepteurs de la thrombine. La liaison (thrombine-GP-Ib α) protège la thrombine de sa dégradation protéolytique par l'AT et conduit à une modification de son site actif (103). D'autres récepteurs plaquettaires de la thrombine de type récepteurs protéases à 7 domaines transmembranaires (PAR « pour protease activated receptors ») ont été identifiés comme le (PAR1, PAR4). Lorsque le récepteur PAR1 est clivé par la thrombine, un nouveau peptide d'activation va se former. Ce dernier peut aussi se lier à la thrombine induisant une cascade de signalisation dans la plaquette qui aboutira à une activation plaquettaire augmentant l'activité procoagulante des plaquettes. L'interaction thrombine-GP-Ib α augmente l'hydrolyse du récepteur PAR1 par la thrombine favorisant ainsi l'activation plaquettaire (104). Quant au récepteur PAR4, la signalisation survenue suite à son clivage par la thrombine est impliquée dans l'agrégation plaquettaire et non pas directement dans l'activité procoagulante des

plaquettes. Un troisième récepteur de la thrombine est l'intégrine GPIIb/IIIa cité au-dessus ayant d'autres ligands comme le fibrinogène et la prothrombine. La liaison de la GPIIb/IIIa à la thrombine pourrait induire une signalisation « *outside in* » capable d'activer l'intégrine augmentant ainsi son affinité au fibrinogène (signalisation « *inside-out* »). Ce phénomène induit un recrutement de nouvelles plaquettes capables de s'agréger et d'amplifier ainsi le processus de l'agrégation plaquettaire. La localisation de la thrombine à la surface des plaquettes (grâce aux différents récepteurs) pourrait accélérer l'activation d'autres facteurs de coagulation liés aux plaquettes comme le facteur V et le facteur VIII. Le facteur VIII (qui circule normalement dans le plasma lié au vWF) peut se lier à la thrombine indirectement par la liaison du vWF à la thrombine via le complexe GP-Ib-IX-V, favorisant ainsi l'activation du FVIII par la thrombine (105). Le FVa peut se lier aux lipides plaquettaires (106,107). Plusieurs études ont montré que le FVa sert de protéine de liaison pour le FXa sur les plaquettes (108-110). D'autres études ont suggéré le rôle d'EPR1 (*pour effector cell protease receptor 1*) dans la coordination de l'interaction entre le FVa et le FXa sur les plaquettes (111). Le complexe GP-Ib-IX-V sert comme récepteur pour le FXI lors de l'activation plaquettaire favorisant ainsi l'activation de ce dernier par la thrombine (106). Ainsi, les surfaces cellulaires sont indispensables pour accélérer les réactions enzymatiques non seulement via les phospholipides anioniques (PSer) mais aussi via les récepteurs pour plusieurs facteurs de coagulation.

2.4.2.2 Déroutement de la coagulation

La coagulation du sang est l'aboutissement d'une cascade de réactions protéolytiques qui ont lieu sur les surfaces membranaires. *In vitro*, la coagulation peut être initiée de deux façons différentes. La première dite «voie extrinsèque» de la coagulation, est l'exposition du sang au contact du FT qui semble prépondérant et essentielle *in vivo*. La seconde, connue sous le nom de «voie intrinsèque» est l'exposition du sang au contact d'une surface chargée négativement. *In vivo*, il semble que la voie intrinsèque vient secondairement renforcer la croissance du caillot de fibrine (**Figure 14**).

La voie extrinsèque de la coagulation :

Elle est initiée par le contact du sang au FT qui va se lier au FVIIa pour activer le FX en FXa. L'activation du FX représente la voie commune avec la voie endogène qui aboutira à la génération de thrombine, qui à son tour, sera capable de transformer le fibrinogène en gel de fibrine. La voie extrinsèque du FT est la voie prépondérante et essentielle *in vivo*.

La voie intrinsèque de la coagulation :

Le contact du sang avec des surfaces artificielles ou avec certains constituants du sous endothélium lors de la lésion vasculaire peut déclencher le processus de la coagulation. Cette étape est appelée « phase contacte ». Elle fait intervenir les KHPM et la PK et le FXII qui vont s'activer au contact des surfaces artificielles ou sous endothéliales. Ainsi, le facteur XI peut aussi être activé par le FXII lui-même activé par les complexes KHPM et PK. Cependant, la contribution de cette activation à l'hémostase physiologique est minime. Cela est attesté par l'absence de syndrome hémorragique chez les sujets sévèrement déficitaires en FXII, KHPM et PK. En revanche, les déficits en FXI peuvent s'accompagner de syndromes hémorragiques importants.

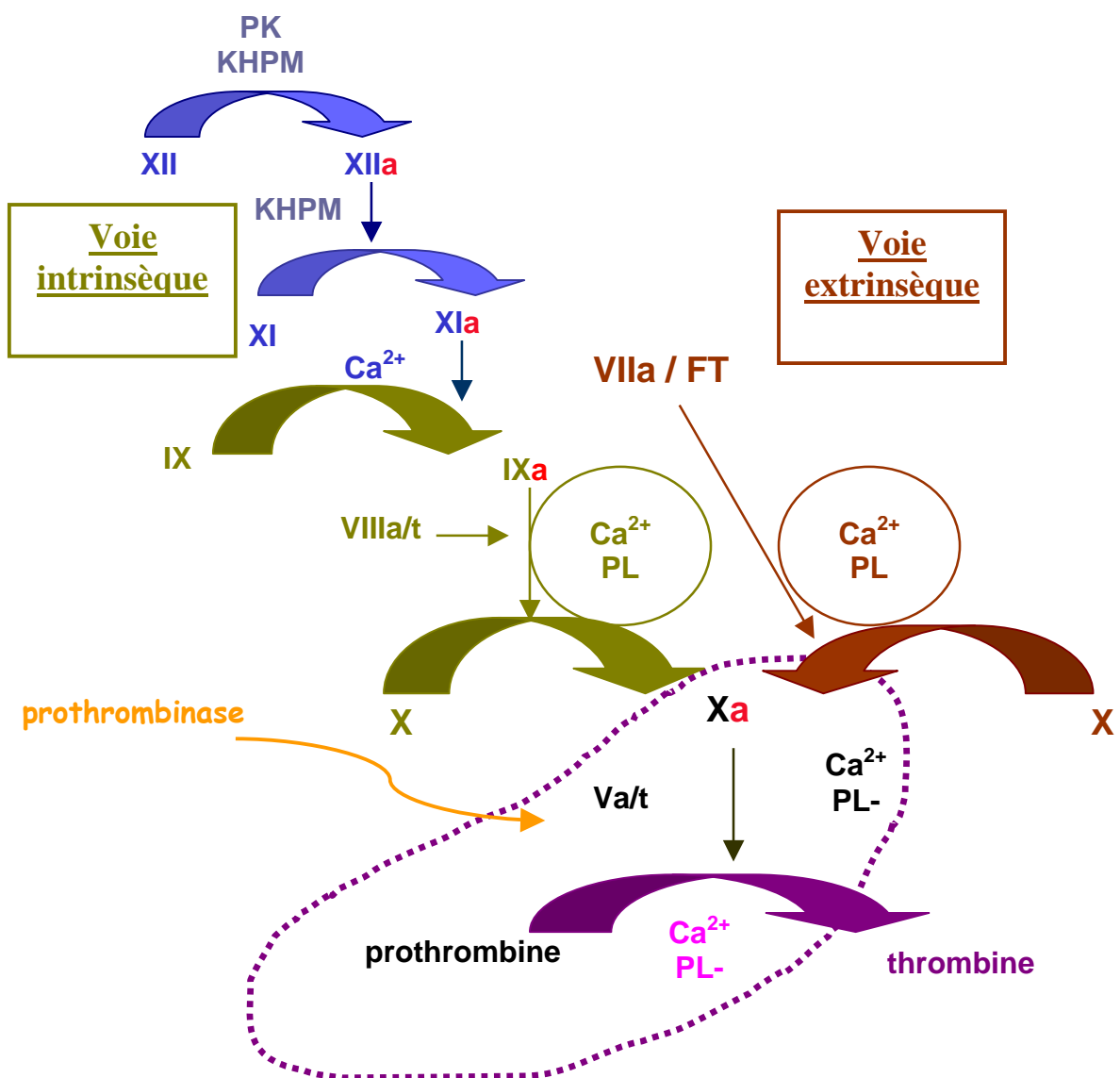


Figure 14 : Voie intrinsèque et extrinsèque de la coagulation
 PL- : phospholipides chargés négativement

La coagulation se déroule en plusieurs étapes : **l'initiation, l'amplification et la propagation**

❖ **Initiation**

Lors d'une brèche vasculaire au niveau d'un vaisseau sain, le FT qui est exprimé au niveau du site de la lésion vasculaire sera en contact avec le sang. L'interaction entre le FT et le FVIIa, qui représente dans le milieu plasmatique 1 à 2 % de la concentration en FVII total (112), est l'élément déclenchant de la coagulation. La source de FVIIa est controversée. Il a été rapporté qu'il serait issu des cellules sanguines telles les leucocytes, les monocytes ou encore des microparticules plaquettaires ou bien qu'il circulerait comme une protéine soluble (92,96,113). Le FT non lié au FVIIa pourrait échapper aux inhibiteurs présents dans le plasma ; par conséquent, il n'aura pas d'activité protéolytique (activatrice) pour les FIX et FX (114). De nombreuses enzymes sont capables de convertir le FVII en FVIIa par protéolyse limitée dont la thrombine, le FXa, le FIXa et le FXIIa. Le FVIIa active également le FVII en présence de FT (115). Le complexe FT/FVIIa active les FIX et FX fixés sur la surface membranaire avec une efficacité plus importante pour le FX (116) ; ainsi, à partir de la formation du complexe FVIIa-FT, deux voies d'activation sont possibles :

- Quand le FT est en excès, le complexe [FVIIa- FT] active directement le FX. Cette voie peut être rapidement inhibée par l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire, le TFPI.
- Quand le FT est en faible quantité, le complexe [FVIIa- FT] active alors le FIX. L'accumulation de FIXa en présence de son cofacteur le FVIIIa, de phospholipides et d'ions calcium permettra secondairement l'activation du FX en FXa. Le FXa active à son tour le FII à la surface des plaquettes activées (ou aux surfaces phospholipidiques appropriées) ce qui permet la formation des premières molécules de thrombine (**Figure 15**).

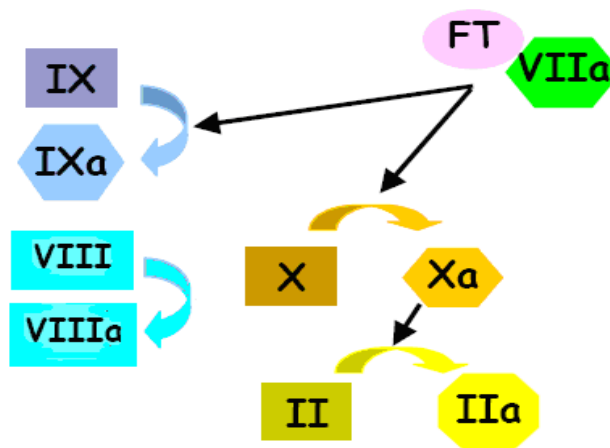


Figure 15 : Phase d'initiation de la coagulation
 II = prothrombine ; IIa = thrombine

❖ **Amplification et propagation du système**

La thrombine amplifie alors immédiatement sa propre formation (**Figure 16**) :

(1) elle stimule l'activation des plaquettes, (ainsi que d'autres types cellulaires pouvant être impliqués) augmentant ainsi la quantité de phospholipides membranaires nécessaires à la réaction en se fixant sur son (ou ses) récepteur(s) selon le type cellulaire (117).

(2) elle active les cofacteurs VIII et V ce qui permet d'accélérer l'activation du FX et du FII par formation des deux complexes ténase (FIXa-FVIIIa-Ca²⁺-phospholipides) et prothrombinase (FXa-FVa-Ca²⁺-phospholipides).

(3) elle peut aussi activer le FVII, le FXI, et le FXIII.

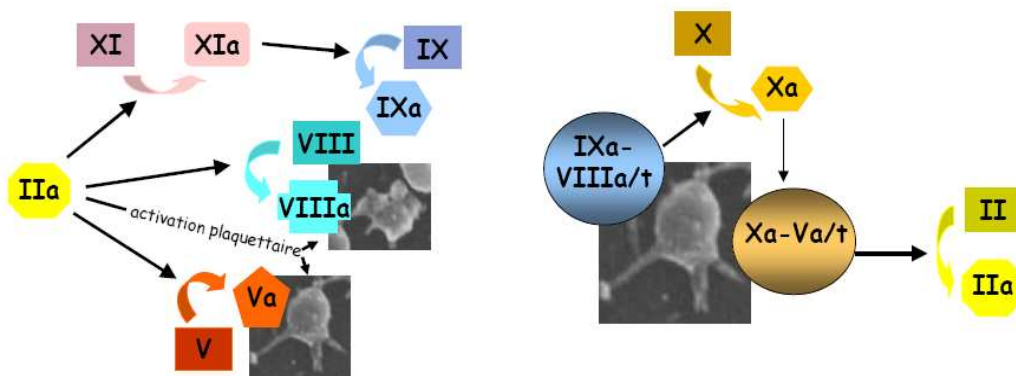


Figure 16 : Phase d'amplification et de propagation de la coagulation

Lorsque la concentration de thrombine formée est suffisante, la thrombine convertit le fibrinogène en monomères de fibrine par clivage des fibrinopeptides A et B au niveau des domaines N-terminaux des chaînes $A\alpha$ et $B\beta$ respectivement (**Figure 17**). Les nouvelles extrémités amino-terminales des chaînes α et β se lient à des structures complémentaires de monomères de fibrine voisins (régions carboxy-terminales des chaînes β et γ), entraînant une polymérisation des monomères de fibrine (118). L'accumulation de fibrine au niveau de l'agrégat plaquettaire va entraîner la formation du caillot. Le caillot est stabilisé par le FXIII lui-même activé par la thrombine. Cette activation est régulée par la fibrine qui sert de cofacteur et par le calcium.

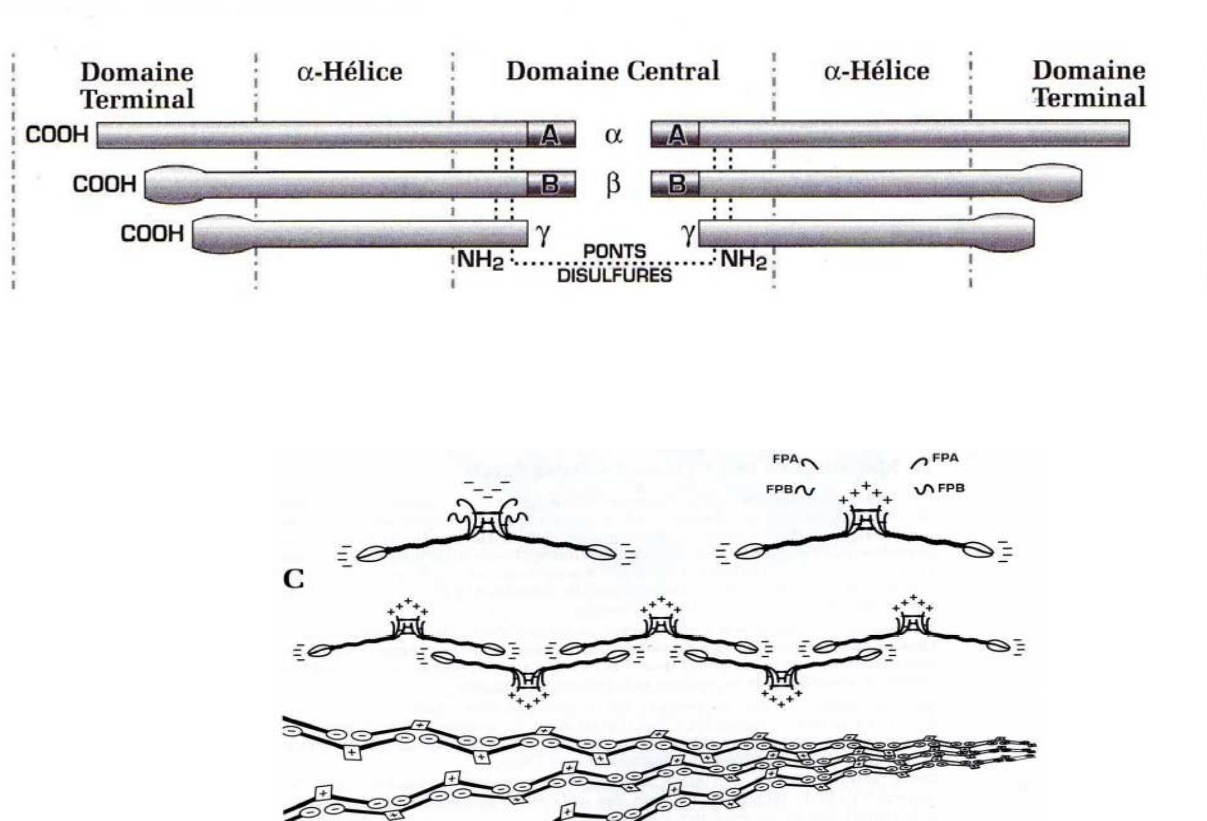


Figure 17 : Polymérisation de la fibrine (1)

2.4.3 La fibrinolyse

Elle permet la destruction des caillots, ou la limitation de leur extension. Dans le plasma normal, le plasminogène va être activé en plasmine grâce à l'action des activateurs plasmatiques (l'urokinase « UK » et la phase contacte) et tissulaire (t-PA). La plasmine va agir sur la fibrine, mais aussi sur le fibrinogène et les facteurs V et VIII de la coagulation, pour lyser le caillot et former des produits de dégradation de la fibrine (D-Dimers). La libération des inhibiteurs du système de fibrinolyse comme le PAI1 (*pour Plasminogen Activator Inhibitor 1*) va inhiber le t-PA et l'UK et empêcher la dissémination du phénomène. L'anti-C1 estérase qui fait partie de la voie du complément inhibe la phase contacte, et l'HRGP (*pour Histidine Rich Glycoprotéine*) inhibe la fixation du plasminogène sur la fibrine.

2.4.4 Régulation de la coagulation : le rôle des inhibiteurs

Les réactions de coagulation sont limitées au niveau de la brèche vasculaire grâce à des systèmes de contrôle empêchant les facteurs activés de la coagulation de circuler dans le plasma et d'entraîner une activation diffuse de la coagulation. Deux systèmes **majeurs** contrôlent la quantité de thrombine générée : (1) des **inhibiteurs** stoechiométriques circulant dans le plasma et qui neutralisent directement l'activité de protéases impliquées dans la coagulation.

(2) le **système de la protéine C** qui est un système inhibiteur dynamique initié par la thrombine elle-même pour contrôler sa génération.

Parmi les inhibiteurs stoechiométriques, **l'AT** est l'un des inhibiteurs principaux de la coagulation (119). C'est une glycoprotéine, de la famille de serpins à large spectre, qui inactive le IXa, Xa, XIa, XIIa, la kallikréine, la plasmine, l'UK et la trypsine mais qui est essentiellement l'inhibiteur de la thrombine et du FXa ; un complexe covalent enzyme-substrat se forme entre une arginine située dans le site réactif de l'AT (Arginine 393-Sérine) et le site enzymatique de la sérine protéase, neutralisant ainsi l'enzyme (120).

L'AT inhibe également le FVIIa lié au FT mais de façon peu efficace. La fixation des facteurs IXa et Xa à la surface des phospholipides anioniques les protège en partie de l'inactivation par l'antithrombine (108). C'est principalement la thrombine libre qui sera inhibée par l'AT. La présence d'héparine ou d'héparane sulfate (présent à la surface de l'endothélium) accélère 1000 fois la vitesse d'inactivation des enzymes de la coagulation (121) en provoquant un

changement conformationnel de l'AT qui lui permet d'augmenter son effet inhibiteur. Un effet inactivateur 2300 fois plus important a été remarqué lors de la saturation de l'AT par l'héparine (122). Les complexes inactifs formés sont éliminés de la circulation par le foie.

Le **TFPI** est exprimé principalement sur la CE mais également sur les hépatocytes, les CML *in vitro* (123,124) et peu exprimé sur les mégacaryocytes, les monocytes, les fibroblastes pulmonaires, et les cellules synoviales (125). Présent à de faibles concentrations plasmatiques, il régule la voie du FT ou la voie extrinsèque de la coagulation ; il est le principal régulateur de la phase d'initiation. Le TFPI a une masse moléculaire d'environ 42 kDa, et est composée de 276 aa, comportant 3 domaines inhibiteurs de protéases de type Kunitz (**Figure 18**), et une extrémité C-terminale chargée positivement ayant un site de haute affinité pour l'héparine : l'héparine augmente l'activité du TFPI *in vitro*, par augmentation de l'affinité pour le FXa. L'héparine déplace le TFPI de son site de fixation endothéliale, probablement les GAGs.

Le premier domaine Kunitz se lie au facteur VIIa et le second au facteur Xa. Il se lie au FXa puis forme un complexe quaternaire FT/FVIIa/FXa/TFPI. Pour exercer son effet inhibiteur le TFPI doit se lier dans un premier temps au FXa puis au complexe FT/FVIIa (126-128) ; ainsi, le TFPI ne peut intervenir qu'après la formation du FXa (124). Le complexe FT/FVIIa est alors inhibé ce qu'il va bloquer l'activation des FXa et FIXa et donc la génération de thrombine. Le troisième domaine Kunitz est impliqué dans sa liaison aux lipoprotéines plasmatiques comprenant également le site de liaison à l'héparine. Le TFPI *in vivo* est réparti en 3 pools :

- ❑ lié aux surfaces cellulaires : 80 % du TFPI total.
- ❑ associé aux lipoprotéines : 80 % du TFPI plasmatique circule lié aux LDL (*pour low-density lipoprotein*) et HDL (*pour high-density lipoprotein*) (via le domaine Kunitz-3).
- ❑ libre dans le plasma : seulement 5-20% du TFPI plasmatique circule sous forme libre, et seulement cette forme libre est capable d'exercer une activité anticoagulante. (125,129).

Deux isoformes de TFPI ont été identifiés, TFPI-1 et TFPI-2. Le TFPI-2 présente des analogies avec le TFPI-1 (32% sur l'ensemble de la molécule), et plus particulièrement dans la région C-terminale. Cette dernière est plus longue pour le TFPI-1 qui est ainsi plus sensible à la protéolyse. L'alignement des séquences des deux TFPI montre également des régions entre les domaines de Kunitz plus courtes pour le TFPI-2. En dépit de ces analogies, il est

cependant à noter que les anticorps monoclonaux commercialisés et spécifiques du TFPI-1 ne réagissent pas avec le TFPI-2. Le TFPI-1 agit essentiellement dans le secteur intravasculaire où il inhibe le complexe (FT/FVIIa). Bien que sa structure soit proche de celle du TFPI-1, le TFPI-2 exerce une activité inhibitrice vis-à-vis d'une gamme de sérine protéases plus variée, certaines étant impliquées dans les processus de la coagulation et de la fibrinolyse. Le TFPI-2 inhibe fortement les activités amidolytiques de la trypsine, de la plasmine, du facteur XIa, de la chymotrypsine et de la kallikréine plasmatique, vis-à-vis de substrats synthétiques spécifiques (130-132).

Pour le TFPI-2, il a été décrit que le second domaine Kunitz était impliqué dans l'interaction du TFPI-2 avec la protéine gC1qR (*pour kininogen binding protein*), régulatrice des cascades du complément, de la coagulation et de la production des kinines. Cette interaction permettrait d'expliquer la fixation du TFPI-2 à la MEC et à la surface cellulaire indépendamment des protéoglycanes (133).

L'association entre le TFPI-2 et l'héparine ou les GAGs de la MEC, qui sont chargés négativement, impliquerait plusieurs résidus arginine du Kunitz-1 et 3 du TFPI-2.

D'autres activités cellulaires ont été attribuées au TFPI ; antiprolifératives (notamment le TFPI-1 (134), et mitogène pour les CML (surtout le TFPI-2) (135).

La région C-terminale du domaine Kunitz-3 de TFPI semble acquiert pour sa liaison aux GAGs à la surface cellulaire (136). Des formes tronquées de TFPI qui manquent le domaine Kunitz-3 ont été identifiées dans le plasma (137). Elles sont incapables de s'associer aux surfaces cellulaires. Ces formes tronquées gardent leur activité anticoagulante et sont présentes à des taux élevés avec le TFPI intact dans le plasma des patients de CIVD (coagulation intra vasculaire disséminée) (138). Des études structurelles ont montré que ces formes tronquées de TFPI, ne contenant que les domaines Kunitz-1 et Kunitz-2, possèdent une activité anti-proliférative très faible. Cette observation suggère que l'activité antiproliférative est donc associée à la portion C-terminale de la protéine dont fait partie le domaine Kunitz-3 (139). Le TFPI intact pourrait se lier au récepteur des lipoprotéines de très basse densité (VLDL « *pour very low- density lipoprotein* ») afin de lui permettre d'exercer son activité antiproliférative (134).

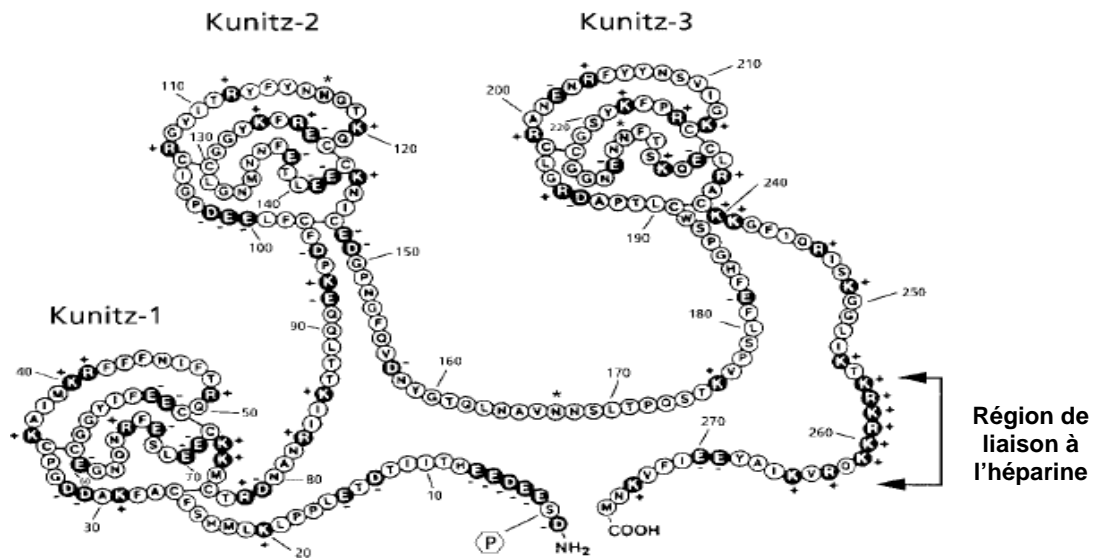


Figure 18 : Structure de l'inhibiteur du facteur tissulaire (TFPI) (124)

Le système de la protéine C : C'est un système anticoagulant dynamique constitué de cinq molécules essentielles ; la protéine C, la TM, la thrombine, le récepteur endothélial de la protéine C (EPCR), et la protéine S (140,141) (**Figure 19**, **Figure 20**). Les molécules composant le système anticoagulant de la protéine C présentent des similitudes structurales (**Figure 19**). Elles contiennent des motifs présentant une homologie avec les domaines EGF mais en nombre variable, deux pour la protéine C, quatre pour la protéine S et six pour la TM. L'EPCR lui ne contient pas de domaines EGF. De plus, toutes les protéines impliquées possèdent un domaine globulaire situé en position C-terminale pour la protéine C et la protéine S (domaine SHBG « pour Sex hormone-binding protein ») contenant le site catalytique et en position N-terminale pour la TM (domaine « lectine-like ») et l'EPCR.

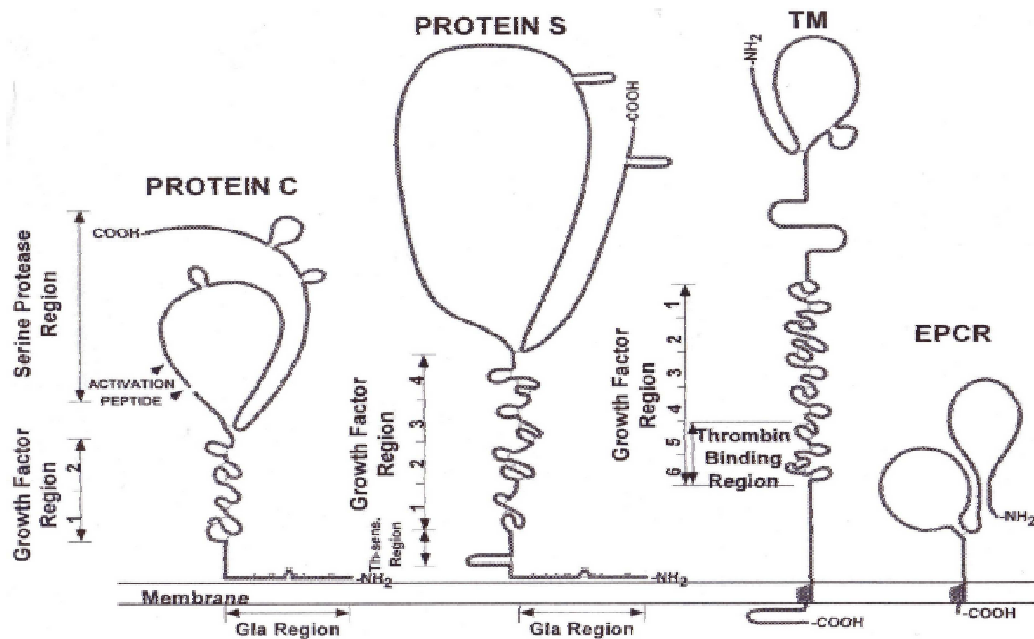


Figure 19 : Représentation schématique de la protéine C, la protéine S, la TM et l'EPCR (142)

La **protéine C (Figure 19)** est une glycoprotéine dont la concentration plasmatique est de 65 nM (environ 4 µg /mL). De masse moléculaire de 62 kDa, elle circule comme une pro enzyme à une sérine-protéase anticoagulante et est activée par la thrombine liée à la TM membranaires. La PCa clive et inhibe les cofacteurs de la coagulation, FVIIIa et FVa, ce qui se traduit par une régulation négative de l'activité du système de coagulation. La protéine C comporte 417 aa répartis en deux chaînes polypeptidiques reliées par un pont disulfure. La chaîne lourde comprend un domaine Gla (vitamine K dépendant) (résidus 1-37), et deux domaines EGF (EGF-1, résidus 46-92 et EGF-2, résidus 93-136), alors que la chaîne légère porte un peptide d'activation (residus 158-169), et un domaine sérine protéase (résidus 170-419) (141,143). La carboxylation post-traductionnelle de neuf aa glutamiques génère les aa Gla, importants pour lier le calcium ainsi que pour un repliement correct du domaine, nécessaire pour l'activité anticoagulante de la PCa. Le domaine Gla peut également se lier à l'EPCR, une interaction qui est important tant pour l'activation de la protéine C que pour les activités anti-inflammatoires et anti-apoptotiques de la PCa. Les fonctions des domaines EGF ne sont pas bien connues, mais elles sont plus susceptibles d'être importantes pour l'interaction avec d'autres protéines comme la protéine S, le FVa et le FVIIIa. Le peptide d'activation (AP pour *activated peptide*) de la protéine C est libéré lors de l'activation par le

complexe thrombine -TM- EPCR par clivage entre les résidus Arg 169-leu 170 (141). Le domaine sérine protéase sera converti en sa forme active (**Figure 20**). .

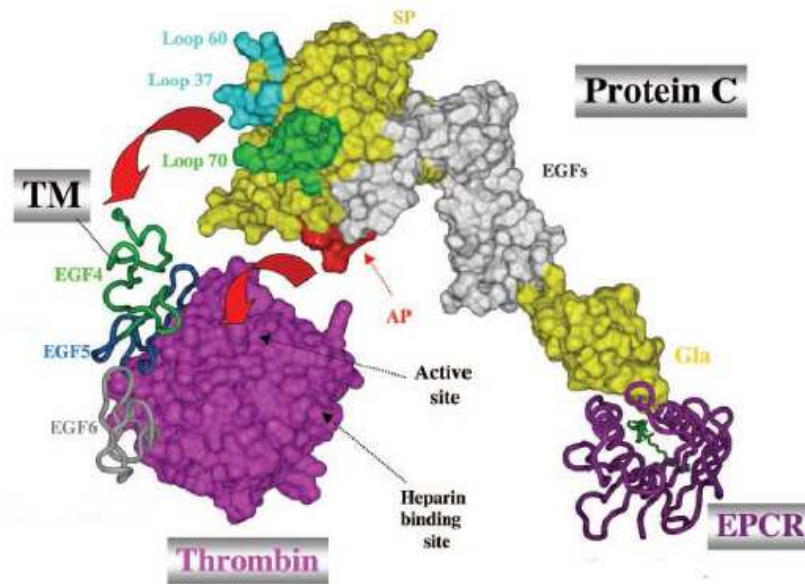


Figure 20 : Schéma représentant l'activation de la protéine C sur les membranes cellulaires (141)

La Thrombomoduline (TM) :

La TM est une glycoprotéine membranaire intrinsèque dont la masse moléculaire est de 65 kDa, exprimée essentiellement par les CE, mais aussi par les trophoblastes, les CML vasculaires, plusieurs lignées tumorales, et par des lignées de mégacaryocytes. L'organisation structurale de la TM est similaire à celle du récepteur de LDL. Les 223 aa dans la N-terminale de la molécule ont une certaine homologie avec les lectines. Ce domaine est suivi d'une région (aa 238-481) riche en cystéine contenant six domaines répétitifs homologues aux domaines EGF. Les deux domaines EGF 5 et 6 contiennent un site de fixation pour la thrombine au niveau de l'exosite 1 ce qui bloque les interactions avec les autres protéines se liant à la thrombine et modifie ainsi sa spécificité enzymatique (142,144,145) (**Figure 21**). Elle acquiert alors des propriétés anticoagulantes en activant la protéine C en PCa, alors que les domaines EGF 4 à 6 sont nécessaires pour l'activation de la protéine C et les domaines EGF 3 à 6 sont impliqués dans l'activation du TAFI (*pour thrombin activatable fibrinolysis*

inhibitor) (**Figure 21**). La thrombine seule est capable d'activer la protéine C. Cependant, sa vitesse d'activation est environ 1000 fois plus importante en présence de TM (146). Tous les domaines EGF de la TM exercent un rôle mitogène important pour les fibroblastes et ils sont homologues à un nombre de protéines de la coagulation dont le facteur VII, facteur IX, le facteur XII, la protéine C, l'activateur tissulaire du plasminogène, et l'UK.

Dans la TM, les six domaines EGF sont adjacents, alors que dans le récepteur de LDL deux domaines EGF sont adjacents et le troisième est séparé par 270 aa. De plus, dans le cas de l'antithrombine, l'accélération de l'inactivation de la thrombine (la demi-vie de la thrombine est environ 3 sec) est complètement dépendante de la présence de chaînes de glucosamine sulfate (*pour chondroïtin sulfate*) sur la TM (147). Toutes les molécules de TM humaine ne possèdent pas la fraction de glucosamine sulfate qui suit le domaine EGF6. Cette fraction est suivie par une région transmembranaire de 23 acides aminés hydrophobes et une région cytoplasmique de 38 acides aminés (538-575) (**Figure 21**).

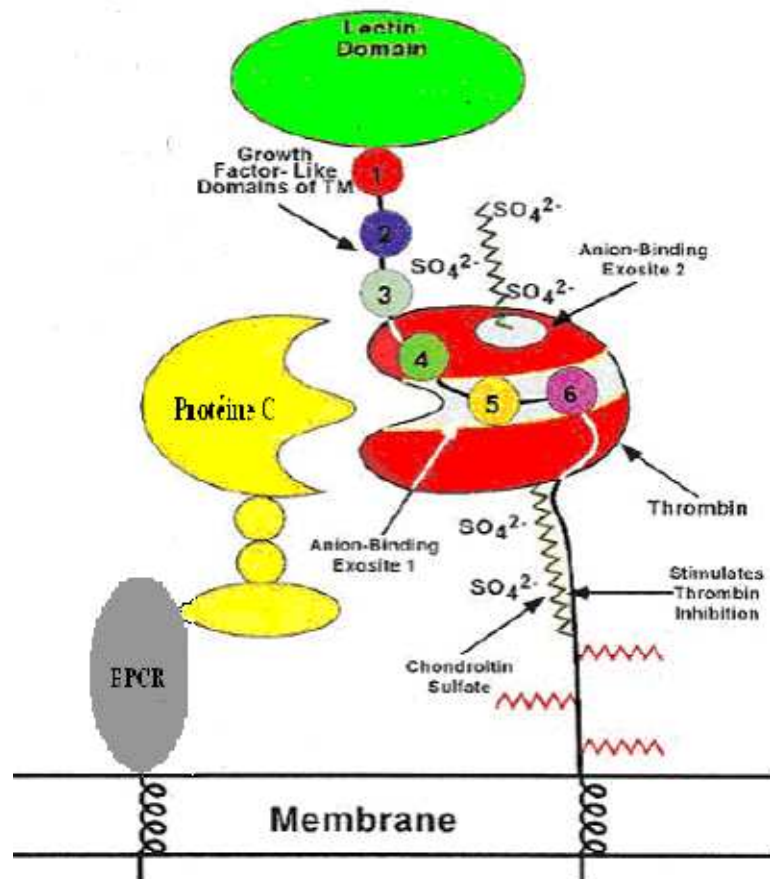


Figure 21 : Structure moléculaire de la thrombomoduline (140)

L'**EPCR (Figure 19)** est une protéine membranaire constituée de deux hélices α et de 8 feuilletts β reliés entre eux et permettant la liaison aux phospholipides. La liaison de la protéine C à l'EPCR par l'intermédiaire de ses domaines Gla permet d'aligner la protéine C au complexe thrombine/TM (148,149). L'EPCR est essentiellement exprimé par les CE mais aussi, par les CML vasculaires (150) et il est également détecté dans les neutrophiles (151).

L'EPCR a une structure semblable à celui du complexe de la classe majeure d'histocompatibilité de la famille de protéines 1/CDI (protéines de surfaces du type 1), qui sont couramment impliqués dans l'immunité/inflammation. L'EPCR accélère environ 20 fois l'activation de la protéine C par le complexe thrombine-TM en le concentrant près de la surface de la paroi vasculaire (152). Contrairement à la TM, l'EPCR est plus exprimé dans les CE de grands vaisseaux (153,154). Lorsque la PCa est générée, elle demeure liée à l'EPCR pendant une courte période avant de s'associer à la protéine S aux surfaces phospholipidiques, ou elle clive ses substrats, les facteurs Va / VIIIa. Ainsi, quand la PCa est libérée de l'EPCR, elle a des propriétés anticoagulantes. Quand la PCa est temporairement complexée avec l'EPCR, elle clive le récepteur PAR1, initiant une signalisation intracellulaire et aboutissant à des effets anti-apoptotiques (155,156) et anti-inflammatoires (157).

La **protéine S (PS)** est une protéine plasmatique dont la concentration plasmatique est d'environ 25 $\mu\text{g/mL}$ de masse moléculaire de 70 kDa. La PS est constitué d'une chaîne polypeptidique de 635 aa répartie en plusieurs parties : a) Une partie N-terminal homologue à celle des protéines vitamine K-dépendantes (127), comportant un domaine Gla (les aa 1-46), quatre domaines EGF comparables à ceux d'autres protéines de la coagulation vitamine K-dépendantes ; le domaine Gla est séparé du premier domaine EGF (EGF1) par un segment supplémentaire de 29 aa, contenant un pont disulfure nommé la région sensible à la thrombine (TSR). b) Une grande partie C-terminale contenant une région homologue à la SHBG (125) avec deux régions type laminine G (148,158). Ce SHBG-like domaine joue un rôle d'intermédiaire dans la liaison de la PS avec une protéine du complément : la C4BP (*pour C4 Binding Protein*), ce qui entraîne une inhibition du rôle de la PS comme cofacteur de la PCa. Dans le plasma, 60% de la PS est complexé avec le C4BP et seulement les 40% restant libres peuvent agir comme cofacteur de la PCa (159).

Il a été démontré dans plusieurs études que la PS exerce un effet anticoagulant *in vitro* indépendamment de la protéine C en inhibant directement les complexes prothrombinase et tenase en impliquant différents modes d'action : **(1)** une inhibition du complexe prothrombinase via une liaison directe sur les FVa et FXa (159-163), **(2)** une compétition

entre la PS et les complexes tenase et prothrombinase pour la liaison sur les phospholipides anioniques (164), ou (3) une inversion de l'effet protecteur du FXa dans l'inactivation du FVa (165,166) ; cet effet est suggéré par une augmentation du clivage en Arg506 du FVa non lié au FXa, ayant pour résultat l'épuisement de FVa libre et la dissociation des complexes de FXa/FVa (164).

Action de la protéine C activée :

La PCa clive le facteur Va et VIIIa et les inhibe via une action protéolytique qui nécessite la fixation de l'enzyme (la PCa) et ses substrats (les cofacteurs Va et VIIIa de la coagulation) sur les surfaces phospholipidiques chargées négativement, en présence de calcium, et de la PS comme cofacteur protéique de la PCa. (**Figure 22**).

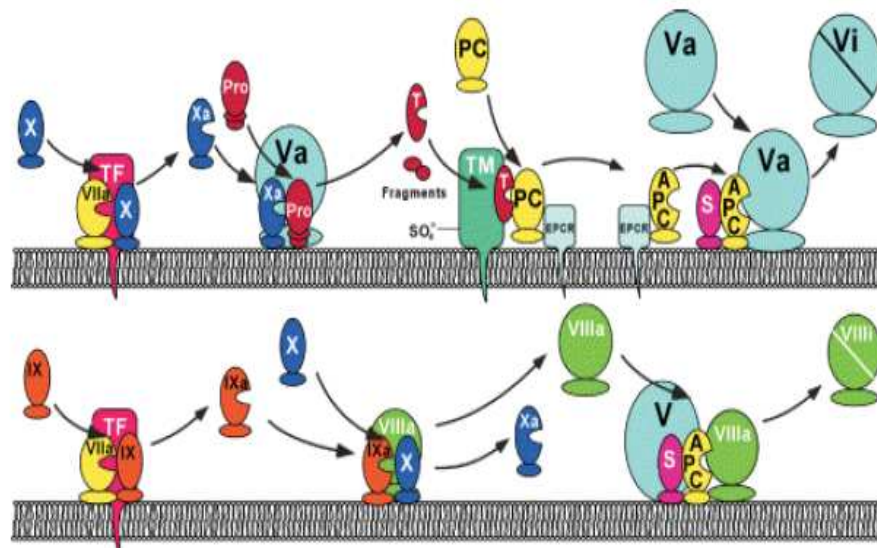


Figure 22 : Régulation de la coagulation par le système de la protéine C (167)
En haut : inhibition du FVa par la PCa et *en bas* : inactivation du FVIIIa par la PCa.

Le facteur V (**Figure 23 A**), est composé de 3 domaines A (A1, A2 et A3) reliés par une région B ainsi que de deux domaines C (C1 et C2). Le site de liaison du FV à la membrane, qui est essentiel à sa fonction, est apporté par des éléments sur les domaines C2 et A3 (et sur le domaine A3 pour le FVa) contenus dans la chaîne légère de la molécule via des interactions hydrophobes et électrostatiques (168).

Le FV est activé par la thrombine par une séquence de clivages protéolytiques en position Arginine 709, puis en Arginine 1018 et enfin en Arginine 1545 (168,169).

Ces clivages conduisent au FVa constitué de deux chaînes (une lourde et une légère) liées par une association non covalente nécessitant des ions calcium (168). Trois sites de clivage par la

PCa ont été identifiés sur le FVa situés au niveau de sa chaîne lourde en position Arg 306, Arg 506 et Arg 679 (170) (**Figure 23 B**). Lorsque le FVa est lié aux phospholipides anioniques, son inactivation par la PCa a lieu via une réaction en deux phases (170,171) : (1) une phase rapide associée à un clivage en position Arginine 506 et (2) une phase lente associée à un clivage en position Arginine 306. Le clivage en Arginine 506 permet une exposition des autres sites de clivage à la PCa (170,171). En présence de phospholipides, le clivage en Arginine 679 du FVa contribue peu à la perte de son activité cofacteur mais participe néanmoins à l'inactivation totale du FVa. La PCa se lie à la chaîne légère du facteur Va de manière compétitive avec le FXa. De plus, le facteur Xa inhibe partiellement le clivage du Va par la PCa en bloquant le clivage en Arginine 506 (168) et le FVa présent dans le complexe prothrombinase est ainsi protégé de l'inactivation (172).

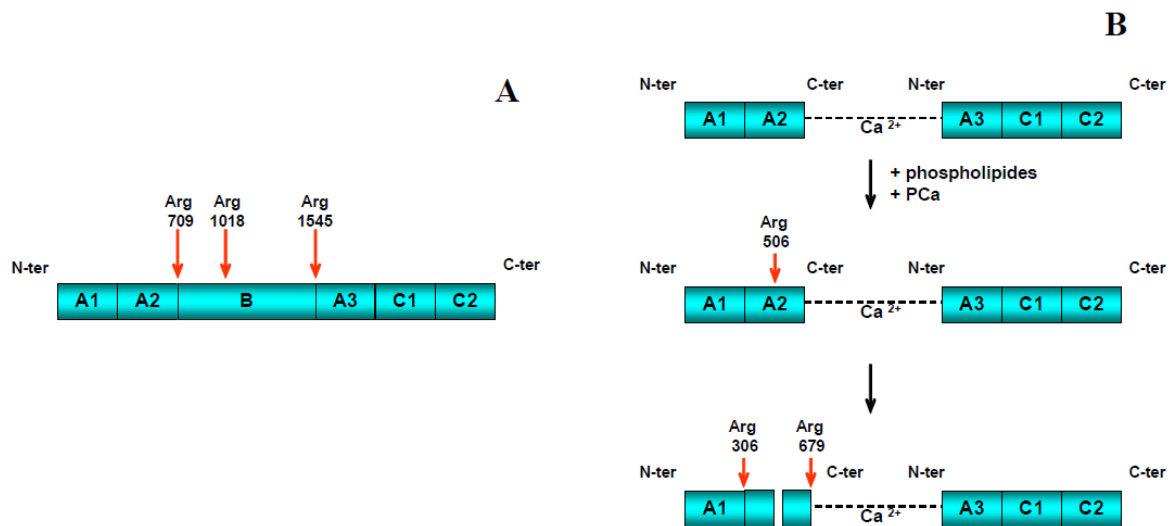


Figure 23 : Représentation schématique (A) de la structure du FV et de ses sites de clivage par la thrombine (B) de l'inactivation protéolytique du FVa par la PCa

Certains facteurs de la coagulation viennent moduler cette inactivation par la PCa (172).

Ainsi, la PS accélère environ 20 fois l'inactivation du FVa en favorisant spécifiquement le clivage en Arg 306 ; une augmentation d'un facteur 5 du clivage en Arginine 506 en présence de PS a également été montrée (173).

Le FVIII (Figure 24 A) est le précurseur inactif du FVIIIa. Comme le FV, il est composé de 3 domaines A (A1, A2 et A3) reliés par une région B ainsi que de deux domaines C (C1 et C2). De manière similaire au FV, le FVIII est activé par la thrombine par une séquence de

clivages protéolytiques en position Arginine 372, puis en Arginine 740 et enfin en Arginine 1689 (168,174). Ces clivages conduisent au FVIIIa constitué de deux chaînes (une lourde et une légère) reliées par une interaction Mn^{2+} (**Figure 24 B**). Le clivage en Arginine 740 libère la chaîne lourde tandis que le clivage en Arginine 1689 libère la chaîne légère. Le clivage en Arginine 372 permet l'exposition d'un épitope cryptique pour la liaison au FIXa (169,174). La PCa clive le FVIIIa en Arginine 336, Arginine 562 et probablement en Arginine 740 dans la chaîne lourde. La liaison du FVIIIa sur le vWF ou sur le FIXa réduit l'inactivation du FVIIIa par la PCa.

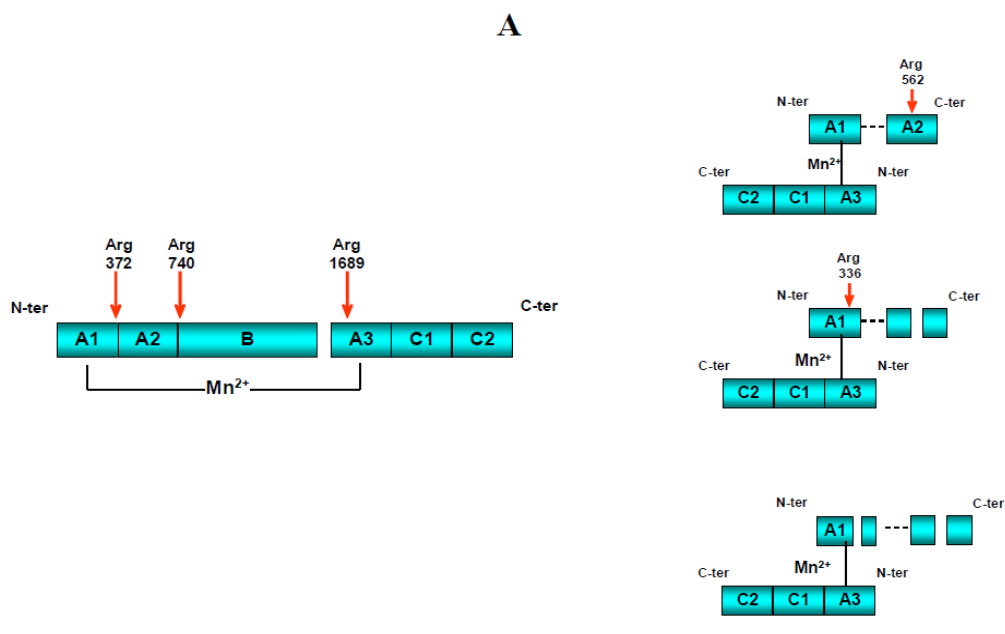


Figure 24 : Représentation schématique (A) de la structure du FVIII et de ses sites de clivage par la thrombine (B) de l'inactivation protéolytique du FVIIIa par la PCa

Le système de la PCa est également soumis à une régulation. La PCa peut être neutralisée par différents inhibiteurs de protéase dont l'inhibiteur de la protéine C (PCI), l' α_1 antitrypsine ou encore l' α_2 macroglobuline. L'inhibition observée est relativement faible car la demi-vie de la PCa dans la circulation est d'environ 20 min.

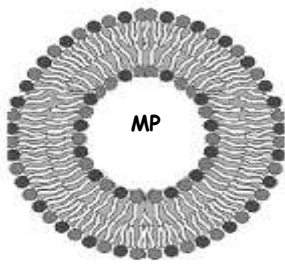
Néanmoins, le PCI est le principal inhibiteur de la PCa malgré le fait que les deux autres inhibiteurs soient présents en plus grande quantité dans le plasma. Le PCI est une glycoprotéine constituée d'une chaîne polypeptidique de 387 aa dont la masse moléculaire est de 57 kDa. Il appartient à la famille des serpins et son site actif est situé au niveau des résidus Arginine 354 et Sérine 355 (175). Synthétisé principalement dans le foie, le PCI est présent, dans le plasma à une concentration de 3,6 à 6,8 $\mu\text{g/mL}$ (175,176) et dans les granules α des plaquettes. Les deux molécules (plasmatique et plaquettaire) ont des activités

différentes. Ainsi, l'activité du PCI contenu dans les granules α est cinq fois plus importante que l'activité du PCI plasmatique (177). De plus, une partie seulement du PCI plaquettaire (30 %) est libérée lors de l'activation des plaquettes (177,178). Le PCI forme un complexe stoechiométrique avec la PCa (179). Les deux molécules possédant des sites de liaison aux GAGs, la formation des complexes PCa/PCI est facilitée par l'héparine ou les sulfates de dextran. En présence d'héparine ou de sulfates de dextran, l'inhibition de la PCa par le PCI est accélérée de 20 à 200 fois (180,181).

L'inhibition de la PCa par le PCI dépend également de la présence de PE au niveau des surfaces (178). Le PCI se lie de façon préférentielle au niveau de la PE de la membrane plaquettaire et des microvésicules (178). Outre la PCa, le PCI peut inhiber d'autres protéases comme le FXa et la thrombine mais également le FXIa.

2.5 Les Microparticules (MP)

Les MP, ce sont, par définition, des éléments membranaires de petite taille (0,1 à 1 μm) émis par plusieurs cellules (plaquettes, leucocytes, érythrocytes, endothéliales...) lors d'un phénomène d'activation ou d'apoptose cellulaire (182,183). Ces deux phénomènes vont aboutir à l'augmentation du calcium intra-cytoplasmique induisant : 1) d'une part, une régulation de l'activité enzymatique des transporteurs phospholipidiques entre les deux feuillettes membranaires (flippase ou aminotranslocase, floppase et scramblase qui résulte en une externalisation des phospholipides chargés négativement (PSer et PE). 2) et d'autre part, une protéolyse du cytosquelette suite à une activation enzymatique telle que la calpaïne et la gelsoline conduisant à un bourgeonnement membranaire et à la formation des MP cellulaires. Les MP expriment, à leur surface, des phospholipides anioniques notamment la PSer mais aussi des protéines antigéniques caractéristiques de leur origine permettant ainsi leur identification (**Figure 25**). Les MP ne contiennent pas de noyau, et elles se distinguent d'autres éléments circulants comme les exosomes et les corps apoptotiques par plusieurs points : les exosomes sont de plus petite taille (30-90 nm), d'origine endocytaire (intracellulaire), enrichis en tetraspanines et l'expression de la PSer à leur surface est controversée (184) ; Les corps apoptotiques ont une taille très variable mais plus importante que celle des MP et des exosomes et ils expriment la PSer à leur surface (184).



MP en formation

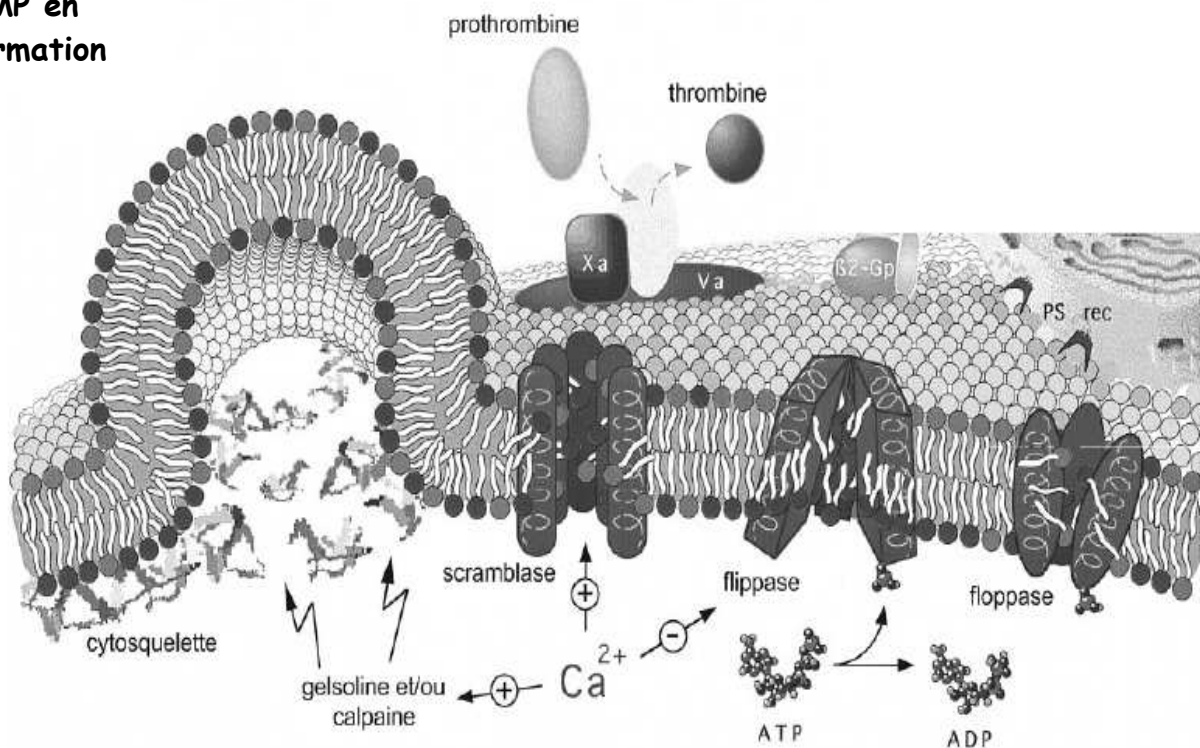


Figure 25 : Formation de microparticules (182)

Les microparticules ont été détectées chez le sujet sain (surtout celles d'origine plaquettaire et leucocytaire), les microparticules érythrocytaires et endothéliales étant plus faiblement présentes (185). Les taux plasmatiques de MP s'élèvent dans certaines maladies (cardiovasculaires, hémorragiques ou thrombotiques, infectieuses, néoplasiques et cancéreuses) où l'activation de l'hémostase participe à la physiopathologie de la maladie elle-même ou de ses complications. De plus, les MP endothéliales ont été considérées non seulement comme marqueurs pour le dysfonctionnement endothélial mais aussi comme effecteurs capables d'amplifier une dysfonction vasculaire pré-existante (186,187).

2.5.1 Les stimuli de la production des microparticules

Théoriquement, toutes les cellules peuvent libérer des MP par un mécanisme actif. De très nombreux agonistes peuvent induire la libération de MP suite à l'activation ou à l'apoptose cellulaire. Par exemple, les CE, les monocytes, les hépatocytes ou encore les CML libèrent de MP lorsque certains de leur récepteurs membranaires entrent en contact avec de médiateurs inflammatoires (dérivés lipopolysaccharidiques bactériens « LPS », histamine, cytokines), ou du complexe C5b-9 (complexe terminal du complément) (188). De même, l'activation des plaquettes via le complexe C5b-9, la thrombine, les calciums ionophores (A23187 ou ionomycine), ou des agonistes plaquettaires (ADP, collagène) génère des MP.

Les possibilités d'induction de l'apoptose sont multiples. A l'heure actuelle, trois voies de déclenchement sont identifiées mais possédant des cascades de réaction entrelacées : la voie extrinsèque dépendante de récepteurs membranaires (au TNF- α , aux interleukines), la voie intrinsèque utilisant les mitochondries (suite à la stimulation par des radiations, l'hypoxie,...) et enfin la voie cytotoxique dérivant de l'action des lymphocytes T au niveau des porforines de membrane (189,190).

Les MP libérées par des cellules en cours d'apoptose semblent être différentes au niveau de leur composition protéique et lipidique par rapport aux MP générées par activation cellulaire. L'apoptose est un processus finement régulé, caractérisée entre autre par une contraction de la cellule et une fragmentation de l'ADN. Les deux voies principales d'apoptose (extrinsèque et intrinsèque) conduisent à l'activation de la caspase 3 régulée par la protéine kinase Rho I. Cette kinase est indispensable pour la translocation de l'ADN du noyau à la membrane des vésicules, ce qui suggère que les MP induites par apoptose pourraient contenir du matériel nucléaire (191).

2.5.2 Composition des microparticules

L'expression de la P_{Ser} est une caractéristique essentielle des MP quelle que soit leur origine cellulaire. La fixation spécifique, en présence de calcium de l'annexine V sur la P_{Ser} est mise à profit pour l'analyse des MP *in vitro* et *ex vivo*. Cependant, des MP expriment des marqueurs endothéliaux ont été identifiés comme négatives (comme pour la P_{Ser}) dans le sang des patients drépanocytaires (192). Les effets biologiques des MP dépendent de leur composition protéique et lipidique qui elle même dépend de la cellule mère et du stimulus lors de leur génération. Pour des MP d'origine endothéliale, un stimulus inflammatoire donne des

MP riches en E-sélectine (nécessaire pour l'adhésion des leucocytes sur l'endothélium), alors qu'une stimulation apoptotique, engendre des MP riches en CD31 (PECAM-1 pour *platelet endothelial cell adhesion molecule*) (193,194). Les MP plaquettaires dérivées de plaquettes activées par la thrombine ou du collagène, expriment la GPIIb/IIIa (permettant la liaison des MP plaquettaires au fibrinogène) alors que les MP dérivées de plaquettes activées par le complément n'expriment pas ce marqueur (195). Ces antigènes caractéristiques des cellules d'origine peuvent être utilisés pour rechercher l'origine cellulaire de MP à l'aide d'anticorps dirigés spécifiquement contre ces épitopes. Toutefois, il a été montré que les MP issues d'un type cellulaire n'expriment pas tous les marqueurs spécifiques de leur « cellule mère », y compris les plus abondants (196). À l'inverse, à la surface des MP, une concentration plus élevée de certains antigènes par rapport à la densité notée dans la population mère peut être observée (197).

La quantification globale des MP présentes dans un échantillon, repose sur l'ajout de l'annexine V, protéine se liant spécifiquement, à la PSer. Pour la caractérisation de différentes populations de MP, au moins trois types d'analyse sont distingués : les techniques par chromatographie sur couche mince de haute affinité, celles fondées sur la cytométrie en flux et les méthodes ELISA (*pour Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). La technique de chromatographie est très peu utilisée et les deux dernières techniques sont les plus employées et se fondent sur l'utilisation d'un anticorps hautement spécifiques des antigènes présents à la surface des MP.

2.5.3 Communication intercellulaire par les microparticules

Il a été démontré que les MP peuvent entraîner la stimulation de cellules à distance. Par exemple, les MP leucocytaires activent les CE (198) ou transfèrent des antigènes leucocytaires aux cellules épithéliales (199). Les MP plaquettaires facilitent les interactions entre monocytes et CE. De plus, les MP plaquettaires stimulent la prolifération, la survie, l'adhérence, et le chimiotactisme des cellules hématopoïétiques (40). Elles peuvent également transférer la chémokine RANTES (*pour regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*) et ainsi attirer les monocytes à la surface de l'endothélium activé (200). Les MP issues de cellules embryonnaires peuvent délivrer de l'ARNm à des cellules cibles et il a été montré que cet ARN est ensuite traduit en protéines (201). Cela a été également montré pour des MP issues de tumeurs qui peuvent porter différentes molécules et ARNm des cellules tumorales et les transférer aux monocytes (202).

2.5.4 Propriétés pro-et anti-coagulantes des microparticules

L'expression de PSer est un élément clef au départ de la cascade de coagulation dans les vaisseaux sanguins. Les MP plaquettaires (et les MP d'autres types cellulaires) expriment une surface catalytique permettant la fixation du complexe prothrombinase. Comme les MP plaquettaires sont les plus présentes dans le sang, donc, une déficience en génération de MP plaquettaires entraîne des troubles de la coagulation (203,204). Un défaut dans la translocation de phospholipides membranaires entraîne une absence de libération de MP d'origine plaquettaires, érythrocytaires et lymphocytaires et donc d'expression de PSer. Ce déficit a été bien caractérisé chez des patients ayant un syndrome hémorragique (syndrome de Scott) et confirmée, ainsi le rôle physiologique des MP et de la PSer dans la réponse hémostatique (195). Au contraire, une libération excessive de MP plaquettaires augmente les surfaces phospholipidiques procoagulantes circulantes et ainsi l'activité prothrombinase induisant l'augmentation de la génération de thrombine.

Une autre activité procoagulante des MP est liée à l'expression de FT. Il a été démontré que les MP plaquettaires, les MP endothéliales, ainsi que les MP d'origine fibroblastiques, monocytaires ou leucocytaires expriment le FT. Les MP dérivées de monocytes expriment à la fois le FT et le récepteur à la P-sélectine PSGL-1 (*pour P-selectin glycoprotein ligand 1*). Les plaquettes activées expriment des molécules d'adhésion telle que la P-sélectine et sont capables ainsi de capturer les MP dérivées de monocytes exprimant le FT via le PSGL-1. Ainsi, la capture de ces MP par les plaquettes joue un rôle central dans l'initiation de la coagulation et de la formation du thrombus via le FT (205).

Les MP endothéliales possèdent donc des propriétés procoagulantes par leur expression de PSer et de FT. Il a été démontré que les MP endothéliales expriment aussi le vWF qui joue un rôle dans la formation du clou plaquettaire (193). Un taux élevé de MP endothéliales est observé lors de la rupture de la plaque d'athérome au cours du syndrome coronarien aigu (206). Ces résultats indiquent que les MP sont produites dans la plaque d'athérome et que l'apoptose qui siège au sein de la plaque d'athérome joue un rôle important dans l'amplification des événements thrombotiques lors de la rupture de la plaque via la production de MP procoagulantes. Les MP endothéliales peuvent se lier aux monocytes et moduler l'activité procoagulante de ces dernières (207). En effet, il a été montré *in vitro* qu'elles pouvaient interagir avec la lignée THP-1 (*pour human acute monocytic leukemia cell line*)

monocytaire entraînant la génération de FT à la surface des MP endothéliales, à l'origine de leur activité procoagulante.

D'autre part, pour les plaquettes, le CD36, récepteur «*scavenger*» exprimé par les plaquettes, reconnaît les phospholipides dont la PSer à la surface des MP ; les MP sont donc des ligands de CD36 exprimés à la surface des plaquettes et contribuent ainsi à l'activation des plaquettes et à la formation du thrombus (208,209).

Une composition différente en MP entre la plaque d'athérosclérose humaine et le plasma correspondant a été mise en évidence par Leroyer *et al* (210), démontrant que les MP d'origine musculaire lisse sont localisées dans la plaque et que les MP d'origine plaquettaire ne sont présentes que dans le plasma, alors que les autres types de MP (leucocytaires, érythrocytaires, et endothéliales) sont présents dans la plaque et le plasma mais avec des taux de distribution différents (200 fois plus importants dans la plaque que dans le plasma). La présence de MP dérivées de CML dans la plaque mais pas dans le plasma, qui ont une activité procoagulante plus importante (démontrée en thrombinographie) que les MP issues de cellules sanguines explique, en partie, la thrombogénicité de la plaque. Une autre étude a montré que 97% de l'activité procoagulante de MP extraites de plaques d'athérosclérose est due au FT (2). Les MP pourraient présenter également des propriétés anti-coagulantes, dues à leur expression de phospholipides anioniques qui servent également comme surfaces appropriées pour l'assemblage du système anticoagulant de la PCa, ainsi qu'à l'expression de la TM et l'EPCR qui font partie de ce complexe (211,212). De plus, il a été démontré par certains auteurs que les MP plaquettaires expriment du TFPI (213,214). Ces activités anticoagulantes dépendent également de l'expression de ces molécules par les cellules d'origine ou de transfert intercellulaire.

En plus de leur rôle dans la thrombose, les MP représentent un pool de bioeffecteurs circulants qui joue un rôle crucial dans l'inflammation (215,216), l'angiogenèse (217) et l'athérombose (218,219). Ainsi, Les microparticules circulantes constituent un réservoir régulé d'effecteurs cellulaires impliqués dans la modulation de fonctions biologiques fondamentales.

2.6 Génération de thrombine par les cellules vasculaires et les actions cellulaires de la thrombine

2.6.1 Génération de thrombine à la surface des cellules musculaires lisses vasculaires

La génération de thrombine a été longtemps étudiée avec les plaquettes comme source de surfaces cellulaires ainsi que de certains facteurs de coagulation. Cependant, plusieurs études se sont intéressées à la génération de thrombine par les cellules vasculaires qui exposent des surfaces phospholipidiques et qui sont capables de synthétiser certains facteurs pro-et anti-coagulants. Les CML peuvent synthétiser, de façon constitutive aussi bien après stimulation, des facteurs pro-coagulants (FT) et / ou anticoagulants de la coagulation (TFPI, TM, EPCR). Parmi les agents qui peuvent moduler cette synthèse, ce sont des facteurs de croissance (PDGF « pour platelet-derived growth factor », FGF « pour Fibroblast growth factor », sérum...etc), des agents mitogènes (thrombine, angiotensine II), par cytokines inflammatoires (IL1, TNF- α) et par des ionophores non physiologiques (A23187 ou ionomycine) qui permettent la mobilisation du calcium intracellulaire (220-223). D'autres études ont rapporté que les CML peuvent même exprimer certains facteurs de coagulation comme la prothrombine (224) et le FV (225). Flynn *et al* (5) ont montré une génération de thrombine à la surface des CML vasculaires apoptotiques humaines et de rat (en absence de plaquettes). Cette génération est inhibée en présence de l'annexine V, de manière concentration-dépendante, ce qui montre l'importance des phospholipides chargés négativement apportés par ces cellules pour accélérer les réactions enzymatiques. Pathak *et al* (4) ont montré que la génération de thrombine à la surface des sections artérielles (dépourvues d'adventice) de l'artère mammaire humaine est inhibée à 75% en présence d'un anticorps anti-FT et que le pic de la génération de thrombine (dans un plasma dépourvu en plaquettes) à la surface des CML aortiques humaines en présence de FT à 0,6 pM est diminué de 74% en absence de FT. Par la suite, Campbell *et al* (6), ont comparé la génération de thrombine et la formation de fibrine à la surface des CML aortiques humaines, des HUVEC (pour Human Umbilical Endothelial Cells) et des lignées de fibroblastes adhérentes, montrant que le pic de thrombine générée à la surface des fibroblastes et CML est beaucoup plus important que celui généré à la surface des HUVEC. Ce résultat suggère que la différence d'activité du FT exprimée sur les trois types cellulaires est le mécanisme dominant pour expliquer ces différences obtenues dans la quantité de thrombine générée à la surface des trois types cellulaires. Toutefois, l'ensemble

des mécanismes impliqués dans la génération-inhibition de la thrombine à la surface des CML vasculaires restent à élucider.

2.6.2 La thrombine et ses actions cellulaires

La thrombine est une glycoprotéine composée de deux chaînes polypeptidiques (A composée de 36 aa et B composée de 259 aa) reliées par un pont disulfure. La molécule de thrombine a une forme globulaire ou ellipsoïde. Le site enzymatique porté sur la chaîne B occupe une position centrale flanquée sur sa droite d'une série d'aa chargés positivement (site de liaison anionique ou « *anion binding exosite* ») qui joue un rôle important dans la reconnaissance par la thrombine de ses substrats naturels, notamment les chaînes α et β du fibrinogène, la TM, la glycoprotéine Iba plaquettaire, la glycoprotéine V plaquettaire et le récepteur cellulaire à 7 domaines transmembranaires de la thrombine (PARs). Ce domaine de la thrombine interagit également avec l'hirudine, un inhibiteur spécifique extrait de la salive de la sangsue. En plus de ces activités différentes au cours du processus de la coagulation pour activer sa propre formation, la thrombine a de plusieurs actions cellulaires qui impliquent l'activation des récepteurs (PARs). De plus, la thrombine possède un domaine RGD ; une fois les plaquettes ou les CML sont activées par la thrombine, cette dernière peut servir comme ligand pour l' $\alpha_{IIb}\beta_3$ et l' $\alpha_v\beta_3$ présentes sur les plaquettes et les CML respectivement, activant ainsi des voies de signalisation « *inside-out* » et « *outside-in* », qui vont induire un changement de conformation au niveau de ces deux intégrines. Cette modification de conformation va permettre aux plaquettes ou CML de lier d'autres ligands, amplifiant ainsi des fonctions cellulaires, dont la migration, la prolifération et l'adhésion pour les CML, et l'agrégation et la microvésiculation pour les plaquettes.

Quatre types de PARs ont été identifiés (PAR1-4), présents sur plusieurs types cellulaires : les monocytes, les CE, les plaquettes, les fibroblastes et les CML. Les PAR1, PAR3 et PAR4 servent comme récepteurs de la thrombine. PAR1 sert également comme récepteur du complexe PCa/EPCR (anti-inflammatoire). PAR2 est activé par FT/FVIIa, FT/FVIIa/FXa, FXa et la trypsine. Au niveau des CML vasculaires, la thrombine accélère la synthèse du FT via l'activation de PAR3 et PAR4 mais pas PAR1 (226). Un seul mécanisme est impliqué dans l'activation de la protéase (telle que la thrombine) par ces PARs ; c'est que la protéase peut cliver l'extrémité extracellulaire du récepteur, libérant un peptide d'activation qui, à son tour, sert aussi comme ligand pour le récepteur (PAR) et induit une signalisation

transmembranaire aboutissant ainsi à la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance (227,228) (Figure 26).

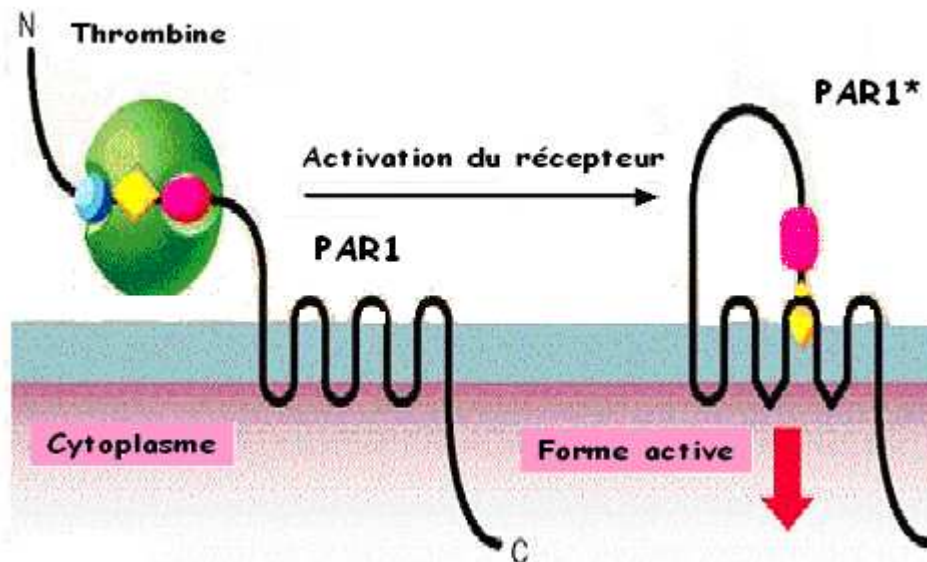


Figure 26 : Mécanisme de l'activation de PAR1 par la thrombine

Ainsi, la thrombine formée dans la paroi vasculaire exerce des effets cellulaires multiples intervenant dans l'inflammation, l'angiogenèse, et l'athérosclérose. En activant directement les plaquettes qui adhèrent, s'agrègent et libèrent le contenu de leurs granules α et de microvésicules plaquettaires, la thrombine peut être considérée comme médiateur dans la coagulation intravasculaire observée dans l'infarctus du myocarde et l'angor instable. La thrombine stimule les CE qui répondent par la libération de PGI_2 , du NO, du t-PA, de son inhibiteur (PAI) et de vWF. Elle induit la synthèse et l'expression du FT, de la P-sélectine qui favorise l'adhésion des polynucléaires (229,230). D'autres effets cellulaires de la thrombine ont été décrits, en particulier la prolifération des CE, des CML et des fibroblastes. Elle peut aussi potentialiser l'action mitogénique du facteur de croissance plaquettaire. Ainsi, la thrombine joue un rôle probable dans les phénomènes de resténose après angioplastie. Elle favorise la migration des CML participant ainsi à la formation de néo-intima (231).

3 MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1 Cellules vasculaires

Nous avons utilisé plusieurs types de CML pour vérifier que la génération de thrombine à la surface de ces cellules pouvait être influencée par l'origine et l'état des cellules. Dans un premier temps, nous avons travaillé avec des CML aortiques dérivées de deux souches de rats (âgés entre 13 et 16 semaines) : le rat Wistar et le rat Zucker avec ses 2 génotypes, contrôle « FA/FA » et obèse présentant les caractéristiques du syndrome métabolique « fa/fa ».

Dans un deuxième temps, nous avons complété notre étude en utilisant des plaquettes et des cellules aortiques humaines, endothéliales et musculaires lisses commerciales (Lonza), reçues congelées en passage 3 et décongelées selon les instructions du fournisseur. Pour établir leur phénotype (endothéliale ou musculaire lisse), les CE ont été contrôlées comme positives à un marquage par du LDL acétyle et du vWF et négatives à un marquage par le SMC α -actin (*pour smooth muscle cell α -actin*) par le fournisseur. Pour les CML, elles devaient présenter un marquage positif par le SMC α -actin et négatif par le vWF.

3.1.1 Isolement de cellules musculaires lisses aortiques du rat

Des rats Wistar, des rats Zucker obèses « fa/fa » ayant la mutation affectant le gène du récepteur à la leptine, et des rats Zucker contrôles « FA/FA » qui ne portent pas cette mutation, ont été anesthésiés avec 125 mg/kg du pentobarbital injecté par voie intrapéritoniale sous hotte à flux laminaire. L'aorte thoracique a été enlevée en évitant de toucher les parties basses et surtout les organes digestifs pour éviter les contaminations bactériennes. Après avoir enlevé l'adventice comme une chaussette, l'aorte a été ouverte pour enlever la couche de cellules endothéliales en grattant l'intérieur avec le dos d'une pince. La seule couche restante, la média, a été coupée en petits fragments. Ces derniers ont été laissés sous agitation pendant 2 heures à 37°C en présence de collagénase II (Worthington) à 1 mg/mL et élastase I (Worthington) à 0,5 mg/mL dans du tampon PBS (Invitrogen). Après 2 heures, la digestion est arrêtée en ajoutant la même quantité de milieu de culture DMEM/F-12 (*pour Dulbecco's modified eagle's medium*) avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) et des antibiotiques (100 U/mL de pénicilline-streptomycine). Ensuite, une centrifugation des cellules à 270 g pendant 10 min et un comptage à l'aide d'un hématocytomètre (Nauerber) ont été effectués pour ensemercer 4000-5000 cellules/cm² dans des flacons de culture de 75 cm² ou de 25 cm² contenant 10 mL ou 5 mL respectivement du même milieu de culture en

présence de sérum et antibiotiques. Le milieu de culture est changé tous les deux jours jusqu'à confluence des cellules. Les CML du rat sont positives à un marquage par le SMC α -actin.

3.1.2 Culture cellulaire

3.1.2.1 Milieux de culture

Pour chaque type de cellules un milieu de culture et des compléments spécifiques ont été utilisés.

- DMEM/F-12 + 10 % sérum de veau fœtal (SVF) + antibiotiques (100 U/ml de pénicilline-streptomycine) : pour la culture des CML de rat Wistar, FA/FA et fa/fa.
- Lonza : 2 milieux avec leurs compléments spécifiques :
 - ✓ EGM[®]-2 Endothelial Cell Growth Medium-2 + Complément (contenant 2 % de SVF et de facteurs de croissance : Hydrocortisone, FGF-B (*pour Fibroblast Growth Factor-B*), VEGF (*pour Vascular endothelial growth factor*), R3-IGF-1 (*pour Insulin Like Growth Factor-1*), acide ascorbique, hEGF (*pour human Epidermal Growth Factor*), héparine, GA-1000 (Gentamycine) pour la culture des CE aortiques humaines.
 - ✓ SmGM[®] Smooth Muscle Growth Medium-2 + Complément (contenant 5 % de SVF et de facteurs de croissance : hEGF (*human endothelial growth factor*), Insuline, hFGF-B (*pour human Fibroblast Growth Factor-B*), GA-1000 pour la culture des CML aortiques humaines.

3.1.2.2 Duplication des cellules

Pour des flacons de culture de 25 cm², le milieu est vidé, puis les cellules en culture ont été rincées deux fois avec 5 mL de milieu DMEM/F12 sans sérum pour éviter une inhibition du SVF sur la trypsine.

Puis 5 mL de trypsine-EDTA (à 0,05 %) «acide éthylène diamine tétracétique» (Sigma) ont été ajoutés et les boîtes ont été alors remises à l'étuve à 37°C pendant 10 min pour les CML et 5 min pour les CE.

Après vérification au microscope que les cellules sont bien décollées, le contenu des boîtes est alors transféré dans des tubes à centrifuger et 10 mL de milieu de culture (DMEM/F-12)

contenant du SVF sont ajoutés afin de neutraliser l'action de la trypsine. Ensuite, une centrifugation est effectuée à 270 g pendant 10 min à 20°C.

Le surnageant est éliminé et le culot de cellules est resuspendu dans du milieu de culture spécifique, chaque mL de cette suspension est placé dans une nouvelle boîte de culture et complété avec du milieu (10 mL pour les flacons de 75 cm², 5 mL pour les flacons de 25 cm²).

3.1.2.3 Exposition des cellules à des déformations cycliques

Les CML aortiques de rat Wistar ont étéensemencées à raison de 3×10^5 cellules par puits dans des plaques six puits à fond de silicone (revêtues de collagène de type I afin de favoriser l'adhérence des CML) dans de milieu DMEM/F12 contenant 10 % de SVF. Après confluence, elles ont été synchronisées par privation de sérum pendant 2 jours. Les cellules ont été alors soumises à l'étirement (**Figure 27**).

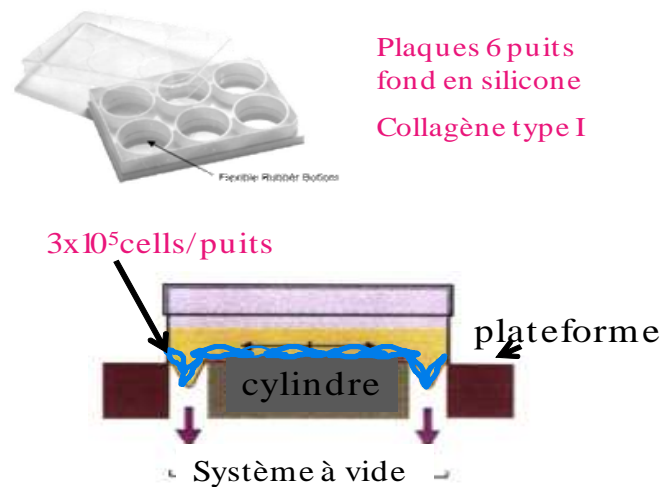


Figure 27 : Modèle du Flexcell

L'étirement dynamique a été 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. Les paramètres modulables sont le pourcentage de déformation de la membrane et la fréquence de déformation pilotés par

le logiciel FX-4000. Dans notre étude les cellules ont été soumises à 10% de déformation et 1 Hertz de fréquence.

3.1.2.4 Coloration des cellules musculaires lisses du rat Wistar au bleu de trypan

Principe :

La viabilité des CML de rat a été déterminée par coloration au bleu trypan (les cellules mortes sont colorées). Le bleu trypan a tendance à entrer dans les cellules qu'il rencontre. Les cellules vivantes, ayant une source d'énergie (l'ATP) expulseront la molécule et resteront blanches au microscope. Au contraire, des cellules mortes n'auront pas les moyens de le rejeter et deviendront bleues. Une autre explication concerne le fait que la membrane intacte des cellules vivantes, empêche l'entrée de la coloration dans le cytoplasme, alors que chez les cellules mortes, la membrane lésée laisse passer le colorant ce qui aboutit à la coloration des cellules en bleu.

Les CML de rat, détachées par la trypsine et centrifugées 2 fois à 270 g pendant 10 min ont été suspendues dans l'HBS [Hépès (acide sulfonique 4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethane) 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,35 contenant 5 g/L de BSA «albumine bovine sérique»] avec le bleu trypan (Sigma) dilué au 1/10 dans la suspension de cellules. Un comptage au microscope sur un hémacytomètre (Naueber) a été effectué et le pourcentage de cellules mortes (colorées en bleu) a été calculé.

3.2 Préparation de microparticules cellulaires dérivées des plaquettes, des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses aortiques humaines

3.2.1 Préparation de microparticules plaquettaires par l'activation des plaquettes humaines avec la ionomycine

Les microparticules plaquettaires (MP plaquettaires) ont été préparées selon la méthode de Vallar *et al* (232). Les plaquettes lavées selon la méthode de Mustard *et al* (233) ont été ajustées à 600 G/L et incubées avec de la ionomycine (Sigma, Saint Louis, USA) à 10 μ M final pendant 10 min à 37°C, puis, la suspension est centrifugée à 1500 g 15 min à 22°C pour éliminer les plaquettes activées. Le surnageant a été récupéré et centrifugé à 13000 g, 45 min

à 4°C. Le culot composé des MP plaquettaires est remis en suspension dans le tampon Tyrode (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, NaHCO₃ 12 mM, NaH₂PO₄ 0,4 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, Hépès 5 mM, Dglucose 5,5 mM ajusté à un pH de 7,4). Les MP plaquettaires ont été lavées cinq fois dans une solution tamponnée HBS-A (HBS sans BSA) par centrifugation à 13000 g, 45 min à 4°C, puis remises en suspension dans du HBS et conservées à -80°C jusqu'à utilisation. L'activité PPA a été mesurée pour ces MP plaquettaires pour avoir leur concentration molaire en équivalents de P_{Ser}.

3.2.2 Préparation de microparticules dérivées des cellules endothéliales et microparticules dérivées des cellules musculaires lisses par activation des cellules d'origine avec la ionomycine

Les microparticules cellulaires, issues des CE aortiques humaines (MP-CE) et des CML aortiques humaines (MP-CML) ont été préparées à partir de leurs cellules d'origine cultivées dans des plaques de 75 cm² dans leurs milieux spécifiques. Les cellules ont été placées dans du milieu sans SVF et facteurs de croissance 48 heures pour les CML et 24 heures pour les CE afin de garder les cellules quiescentes avant la microvésiculation. Les cellules ont ensuite été incubées avec la ionomycine à 10 µM pendant 1 heure et le surnageant a été prélevé et centrifugé 10 min à 270 g pour se débarrasser des cellules activées et des débris cellulaires. Le surnageant obtenu lors de cette centrifugation a été de nouveau centrifugé 30 min à 13000 g à 4°C et le culot obtenu (formé des microparticules cellulaires) a été resuspendu dans du HBS et congelé à -80°C.

3.2.3 Détermination de la capacité de la thrombine à activer les plaquettes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses aortiques humaines

Afin de déterminer les différentes sensibilités des plaquettes, CE et CML aortiques humaines à être activées par la thrombine, nous avons utilisé la thrombine bovine (Diamed) à 10 nM à la place de la ionomycine. Les cellules ont été soumises aux mêmes conditions de centrifugation que les plaquettes lavées (La suspension plaquettaire ou le surnageant au dessus des cellules (adhérentes) activées par 10 nM de la thrombine pendant 15 min a été centrifugée à 1500 g 15 min à 22°C pour éliminer les cellules activées. Le surnageant récupéré a été ensuite centrifugé à 13000 g, 45 min à 4°C et le culot composé des MP a été remis dans 1 mL de tampon HBS.

3.2.4 Quantification des microparticules préparées par activation de cellules parentales avec la thrombine par cytométrie en flux

3.2.4.1 Principe de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux repose sur l'étude précise de cellules isolées. Les cellules passent une à une devant un détecteur grâce à un flux liquide à grande vitesse (30 km/h). Un rayon laser est alors projeté sur ces cellules et c'est grâce à un système électronique que les données sont converties en signaux délivrés par l'ordinateur. Ce système électronique est composé d'un photomultiplicateur qui capte la lumière émise, d'un digitaliseur qui transforme l'énergie lumineuse en signaux électriques puis numériques, ces signaux sont ensuite amplifiés et envoyés vers un ordinateur. Les paramètres analysés sont la diffusion lumineuse qui permet de déterminer le forward scatter (FS) et le side scatter (SS). Le FS correspond à la lumière diffractée sous un petit angle (1 à 10°) et il est relatif à la taille des cellules ; le SS correspond à la lumière collectée à 90° de l'axe du laser et il est relatif à la granularité des cellules. Le deuxième paramètre analysé par le cytomètre est la fluorescence, ce qui permet de pouvoir marquer nos cellules avec un fluorochrome (FL) spécifique et ainsi de différencier nos différentes populations de cellules.

3.2.4.2 Quantification des microparticules

Pour la quantification des MP, une étape préalable de calibration de l'appareil est nécessaire. Elle consiste à analyser des microbilles (Megamix, Beckman) de tailles connues (0,3 µm, 0,9 µm et 3 µm), ensuite, l'appareil est paramétré pour ne compter que les particules entre 0,1 µm et 1 µm. Pour quantifier les MP, un volume de 150 µL de MP (diluées dans l'HBS) a été ajouté à 150 µL de micro-billes fluorescentes (Flowcount™ Fluorospheres Beckman) de concentration connue (954 billes/µL). Le tout a été agité puis placé dans le cytomètre (Gallios, Beckman Coulter, Villepinte, France) afin de réaliser la quantification.

3.3 Préparation de vésicules phospholipidiques moléculairement définies (VP)

Un mélange de 940 µL de phosphatidylcholine (PC) à 25 mg/mL, 750 µL de phosphatidylsérine (PSer) à 10 mg/mL et de 750 µL de phosphatidyléthanolamine (PE) à 10 mg/mL (dioleyleglycérophospholipides ; Avanti Polar lipids) dans du chloroforme a été soumis à une évaporation sous azote. Les phospholipides récupérés ont été redissous dans 10 mL

d'HBS-A et subissent une sonification dans un bain de glace (5X5 min avec une pause de 5 min entre chaque sonification). Le rapport final est 60/20/20 mole % PC/PSer/PE.

3.4 Mesure de l'activité procoagulante de phospholipides (PPA)

Cette mesure (réalisée en système purifié) repose sur la nécessité de surfaces phospholipidiques anioniques pour les réactions de la cascade de la coagulation. Le principe du test repose sur l'apport dans le milieu réactionnel des éléments du complexe prothrombinase et de calcium permettant la conversion de prothrombine en thrombine. Les facteurs de coagulation sont ajoutés en excès ce qui rend les phospholipides anioniques les facteurs limitants de la réaction et donc, l'activité de la prothrombinase est linéaire et dépendante de la quantité de PSer dans les échantillons.

Une gamme étalon est réalisée avec des VP constituées d'un mélange de PC/PSer/PE (60/20/20 mole %) dans du tampon Tris 50 mM, NaCl 175 mM, NaN₃ 0,02 %, pH 7,9 contenant de la BSA à 2 mg/mL.

Les dépôts s'effectuent en triple dans une plaque 96 puits Nunc « Polysorb » pour les CML et les MP (en suspension) ou dans une plaque de culture (MICROTESTTM⁹⁶) pour les cellules adhérentes, à raison de :

- 50 µL de VP pour les standards, 50 µl de spécimen (suspension de CML ou de MP), ou 50 µL de tampon dans les puits de cellules adhérentes.
- 50 µL d'un mélange de CaCl₂ (15 mM), FXa (1,2 nM) et FVa (2,4 nM).
- 50 µL d'un mélange de FII (6 µM) et de substrat chromogène S2238 (0,6 mM) ; (FII, FXa et FVa bovins ; Synapse B.V., Maastricht, Pays-Bas) dans du tampon Tris 50 mM, NaCl 175 mM, NaN₃ 0,02 %, pH 7,9 contenant de la BSA à 2 mg/mL, ou de substrat fluorogène (Z-Gly-Gly-Arg-AMC, Bachem) de la thrombine à 1,25 mM dans de l'Hépès 20 mM, pH 7,35 contenant de la BSA à 60 g/L.

Après une incubation de 5 min dans le noir et à température ambiante, l'absorbance dans la plaque de Polysorb est lue à 405 nm (lecture cinétique pendant 10 min avec un intervalle de mesure de 30 sec), alors que la fluorescence dans la plaque de culture (MICROTESTTM⁹⁶) est lue dans le fluorimètre Fluoroskan Ascent (Labsystems) avec le logiciel dédié (Ascent software 2.6), où elle est enregistrée pendant 30 min 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 1 min. Le protocole est résumé dans la (**Figure 28**).

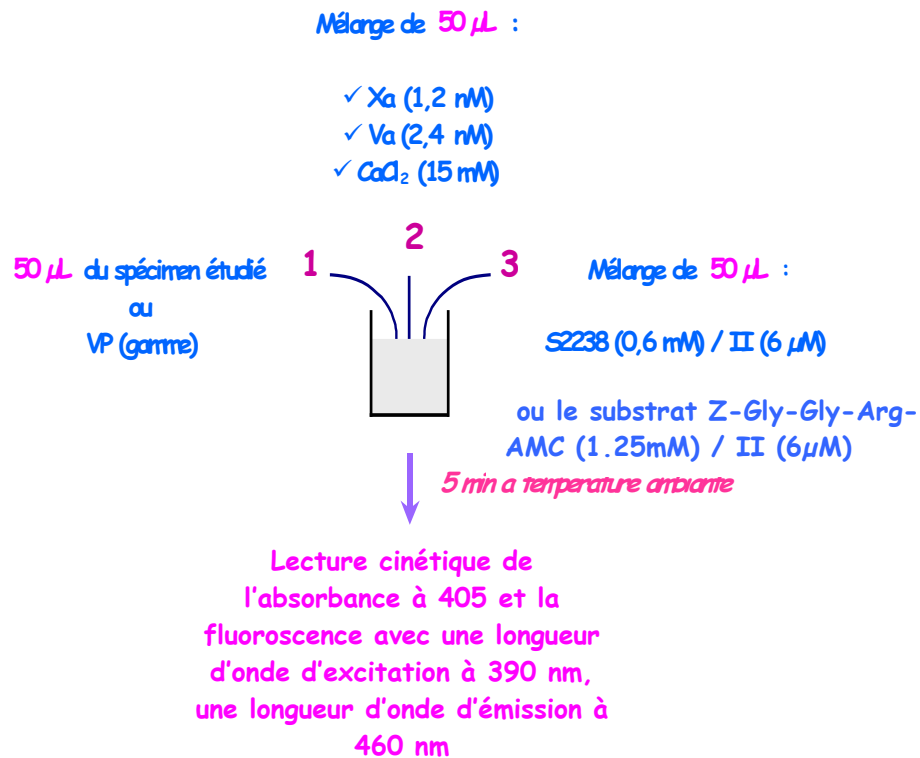


Figure 28 : Protocole de mesure de l'activité procoagulante de phospholipides (PPA)

3.5 Mesure des facteurs pro-et anti-coagulants aux cellules endothéliales et cellules musculaires lisses aortiques humaines

3.5.1 Mesure de l'activité du facteur tissulaire des cellules endothéliales, des cellules musculaires aortiques humaines, et des microparticules dérivées de ces cellules

Nous avons utilisé un test de mesure de l'activité du FT humain (Actichrome TF, American Diagnostica) avec quelques modifications, pour mesurer l'activité du FT à la surface des CE, des CML humaines aortiques et des MP dérivées de ces cellules. Le principe du test repose sur le dosage de la quantité du facteur Xa générée par l'incubation de FVIIa et de FX humains (ajoutés en excès) avec l'échantillon ou la gamme de FT (de 0 à 30 pM). Dans ces conditions, la quantité de FT est limitante pour la réaction et donc, la quantité de FXa générée est linéaire et dépend de la quantité de FT dans les échantillons.

a) Pour les CE et CML aortiques humaines (adhérentes) : Les cellules adhérentes cultivées dans une plaque de culture (MICROTEST™96) ont été lavées 2 fois avec 200 µL de HBS avant l'ajout de 75 µL de tampon (du kit) pH 7,4 dans les puits. Ensuite, 25 µL de FVIIa et 25 µL de FX humains ont été ajoutés et incubés 15 min à 37°C pour permettre la formation du complexe (FT (exprimé par les cellules) / FVIIa), capable de convertir le FX en FXa dans la plaque de culture. Cette réaction a été arrêtée par l'ajout de 25 µL d'EDTA à 25 mM. Le mélange contenu dans les puits de culture cellulaire (150 µL) a été ensuite transféré dans une plaque 96 puits Nunc «Polysorb» où les mêmes étapes ont été suivies pour les standards. Puis, un volume de 25 µL du substrat de FXa (Spectrozyme® Xa) a été ajouté.

b) Pour les MP-CE, MP-CML (en solution) : Dans une plaque 96 puits Nunc « Polysorb », 25 µL du FT (pour les standards) ou 25 µL d'échantillon ont été ajoutés à 50 µL de tampon (du kit) pH 7,4. Ensuite, 25 µL du FVIIa et 25 µL du FX humains ont été ajoutés et incubés dans le noir 15 min à 37°C pour permettre la formation du complexe (FT/FVIIa), capable de convertir le FX en FXa. Cette réaction a été arrêtée par l'ajout de 25 µL d'EDTA à 25 mM. Un volume de 25 µL du substrat chromogénique du FXa (Spectrozyme® Xa) a été ensuite ajouté et la quantité du facteur Xa générée reflétant l'activité du FT a été mesurée par sa capacité à cliver ce substrat.

La dernière étape est commune pour les MP et les cellules adhérentes où l'absorbance a été lue à 405 nm et comparée à des valeurs obtenues à partir d'une courbe étalon effectuée en utilisant des quantités connues de FT actif humain.

3.5.2 Mesure du TFPI exprimé par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses aortiques humaines

Le TFPI total (associé aux cellules) a été mesuré à l'aide d'un kit ELISA (ASSERACHROM, diagnostica stago). Cette mesure a été réalisée selon les étapes suivantes :

3.5.2.1 Extraction des protéines cellulaires

Lorsque les CE et CML aortiques humaines, cultivées dans des plaques de culture cellulaire à 6 puits (Greiner bio-one), sont arrivées à 90 % de confluence, le milieu de culture a été vidé et les cellules ont été rincées avec 1 mL de PBS (Invitrogen)/puits. Ensuite, les cellules ont été grattées dans un volume de 150 µL de tampon de lyse (« *Complet Lysis-M* » contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéase : extraction pancréatique à 20 µg/mL, thermolysine à 0,5

µg/mL, trypsine à 0,2 µg/mL, et papaine à 330 µg/mL) avec un grattoir « *Cell Scraper bio-one* », et transférées alors dans des tubes à fond conique pour les centrifuger 15 min à 9660 g. Le surnageant a été ensuite récupéré dans un tube conique de 1,5 mL et agité au vortex pendant 30 sec. Un volume de 12 µL a été alors pris pour la mesure des protéines totales extraites et congelé à -80°C à la mesure.

3.5.2.2 Dosage des protéines cellulaires

Les protéines cellulaires extraites selon la méthode décrite ci-dessous ont été dosées avec le kit (DC Protein assay Biorad) pour pouvoir ajuster les protéines extraites des CE et celles des CML à la même concentration en protéines. Le principe du dosage est basé sur la réaction des protéines avec une solution alcaline de tartrate de cuivre et de réactif de Folin. Il y a deux étapes qui conduisent au développement de la couleur : La réaction entre la protéine et le cuivre dans un milieu alcalin, et la réduction par la suite du réactif de Folin par la protéine complexée au cuivre. Le développement de la couleur est principalement dû aux acides aminés tyrosine et tryptophane, et dans une moindre mesure, la cystine, la cystéine et l'histidine. Les protéines induisent une réduction du réactif Folin par une perte de 1, 2 ou 3 atomes d'oxygène, produisant ainsi un ou plusieurs espèces possibles réduites qui ont une couleur bleue caractéristique avec un maximum d'absorbance à 750 nm et une absorbance minimale à 405 nm. Avec ce kit, la mesure s'est effectuée dans une plaque de microtitration selon les étapes suivantes :

- (1) Un volume de 5 µL de standard (IgG à 1,49 mg/mL diluées de 1/2 en 1/2 ; 5 dilutions) ou 5 µL d'échantillon (protéines décongelées à température ambiante) a été déposé dans la plaque.
- (2) Un volume de 25 µL du réactif A' composé de [1 mL du réactif A (solution alcaline de tartrate de cuivre) + 20 µL de réactif S (du kit)] ont été ensuite ajoutés.
- (3) Un volume de 300 µL du réactif B (réactif de Folin) a été alors ajouté.
- (4) Une lecture de l'absorbance à 750 nm a été effectuée après une incubation de la plaque pour 15 min à l'obscurité.

3.5.2.3 Mesure du TFPI en ELISA

3.5.2.3.1 Principe du test

Dans les puits d'une barrette plastique recouverte d'anticorps monoclonal de souris anti-TFPI humain, est ajouté l'anticorps secondaire monoclonal de souris anti-TFPI humain couplé à la peroxydase ainsi que l'échantillon contenant le TFPI total à doser. Celui-là est capté simultanément par les deux anticorps spécifiques de deux déterminants antigéniques

différents du TFPI total. Il est ainsi fixé et marqué en une seule étape. Le taux de peroxydase liée est mesuré par son activité sur le substrat ortho-phénylènediamine (OPD) en présence de peroxyde d'urée. L'intensité de la coloration déterminée par la mesure de l'absorbance à 492 nm, après arrêt de la réaction par un acide fort, est fonction de la quantité de TFPI total présente initialement dans le milieu.

3.5.2.3.2 Protocole

Les standards (plasma humain lyophilisé) contenant une quantité connue de TFPI (environ 200 ng/mL) ont été dilués (5 dilutions à partir d'une solution mère au 1/20) dans le tampon de dilution. Les échantillons (protéines totales des CE et CML) ont été dilués dans le tampon de dilution du kit à raison de 100 µg/mL. Les dépôts ont été effectués en double. Le protocole est détaillé dans le (Tableau III)

Fixation de l'antigène et de l'immunoconjugué	Anticorps secondaire monoclonal de souris anti-TFPI humain couplé à la peroxydase	50 µL
	Echantillon (Protéines cellulaires à 100 µg/mL)	200 µL
	Couvrir les puits et maintenir 2 heures à température ambiante (18-25°C)	
Laver 5 fois en solution de lavage, puis ajouter :		
Coloration	Substrat OPD/ peroxyde d'urée préparé juste avant l'emploi	200 µL
	Attendre 8 min, puis ajouter	
	H₂SO₄ 3M	50 µL
30 min à 2 heures après l'arrêt de la réaction, mesurer l'absorbance à 492 nm (ajuster le 0 sur le blanc réactif « tampon de dilution »)		

Tableau III : Protocole ELISA du dosage du TFPI total des CE et CML aortiques humaine

3.5.3 Mesure de l'EPCR à la surface des CE et CML aortiques humaines

La quantification de l'EPCR à la surface des CE et des CML aortiques humaines a été réalisée par cytométrie en flux (cytomètre Gallios, Beckman Coulter, Villepinte, France). Les cellules ont été décollées de leur support (boîtes de culture à 25 cm²) par 2,5 mL de trypsine et comptées à l'aide d'un hématocytomètre (Naueber). Un nombre de 1x10⁶ de cellules a été incubé pendant 1 heure avec 10 µg d'un anticorps «primaire» de rat anti-EPCR humain

(RCR-252, Sanbio, Allemagne). Les cellules ont été ensuite lavées avec un tampon PBS, et puis incubées avec un anticorps de chèvre anti-rat «anticorps secondaire couplé à l'isothiocyanate fluoresceine» (Sc-2011, Santa Cruz) à 0,5 µg/mL pendant 30 min. La spécificité de l'immunomarquage a été déterminée en comparaison avec des résultats obtenus avec l'anticorps fluorescent secondaire seul.

3.6 Préparation de spécimens plasmatiques

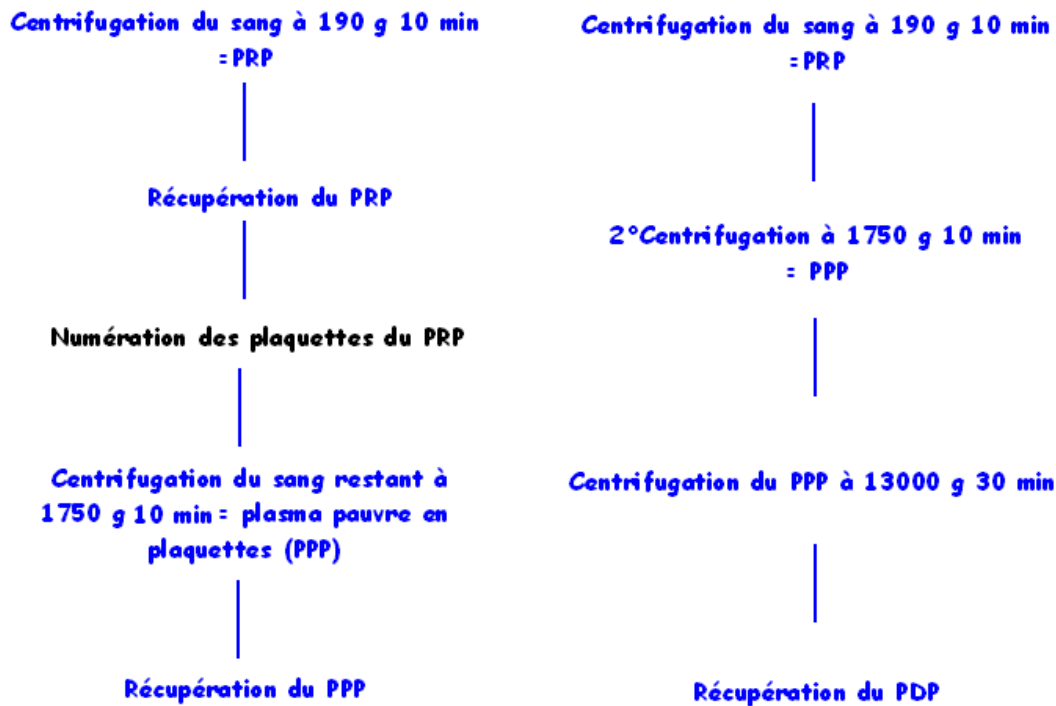
Le sang des donneurs est recueilli dans des tubes monovette® (Sarstedt) contenant une solution de citrate 106 mM à raison de : 1 volume de citrate pour 9 volumes de sang. La préparation des différents spécimens plasmatiques a été réalisée selon les protocoles suivants et résumés sur la **Figure 29** :

3.6.1 Plasma riche en plaquettes (PRP)

Le PRP a été préparé par centrifugation du sang à 190 g pendant 10 min à 20°C. Le PRP a été récupéré et ajusté à 150 G/L en plaquettes par addition de plasma pauvre en plaquettes (PPP) autologue obtenu par centrifugation du sang restant à 1750 g pendant 10 min à 20°C. Le PRP a été ensuite étudié dans les 30 min qui suivent la fin de sa préparation.

3.6.2 Plasma dépourvu en plaquettes (PDP)

Le PDP a été préparé par centrifugation du sang à 190 g pendant 10 min à 20°C puis à 1750 g pendant 10 min. Le PPP a été ensuite centrifugé à 13000 g pendant 30 min à 4°C et congelé à -80°C. La décongélation a été effectuée à 37° C pendant 15 min.



A) Préparation du PRP

B) Préparation du PDP

Figure 29 : préparation de plasma riche en plaquettes et plasma dépourvu en plaquettes à partir de sang humain de sujets sains

3.7 La Thrombinographie

3.7.1 Définition générale de la technique

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

3.7.2 Conditions de réalisation du test

Les mesures thrombinographiques ont été réalisées dans le fluorimètre Fluoroskan Ascent (Labsystems) avec le logiciel dédié Thrombinoscope® version 2.106 (Synapse, Maastricht, Pays-Bas) selon des protocoles adaptés de (9).

Un substrat fluorogène de la thrombine (Z-Gly-Gly-Arg-AMC, Bachem) a été utilisé. La fluorescence a été 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 sec.

Un calibrant (mélange d'un complexe α_2 -macroglobuline / thrombine humaine) a été ajouté dans 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 le calcul de la quantité de thrombine humaine générée par conversion des unités de fluorescence obtenues en molarité de thrombine active par le logiciel Thrombinoscope®. Un puits contenant 20 μ L de calibrant (Synapse B.V., Maastricht, Pays-Bas) et 80 μ L de spécimen plasmatique a été inclus dans la plaque pour chaque plasma étudié. La plaque a été placée dans le fluorimètre 5 min avant l'addition par cet appareil de 20 μ L d'un mélange de substrat fluorogène et de CaCl₂ (100 mM).

Les mesures ont été réalisées en triple dans des microplaques 96 puits en polypropylène fond rond (Greiner) pour les cellules en suspension et dans des plaques de culture à 96 puits (MICROTESTTM⁹⁶) pour les cellules adhérentes. La coagulation a été déclenchée par recalcification en présence de FT recombinant humain (rTF). Les protocoles pour une étude en thrombinographie sont résumés dans la **Figure 30** pour les cellules en suspension, les VP, les MP, ainsi que pour les cellules adhérentes.

Les cellules ont été utilisées pour trois types d'expériences :

a) Génération de thrombine à la surface des cellules en suspension

Les CML de rat ont été détachées, le culot obtenu après centrifugation à 270 g pendant 10 min à 20°C est resuspendu dans 5 mL de DMEM/F-12 sans SVF. Un comptage a été effectué, puis, une deuxième centrifugation a été réalisée à 270 g pendant 10 min. Les cellules ont été alors remises en suspension dans du tampon HBS (Hépès 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,35 contenant 5 g/L de BSA) avant de les utiliser en thrombinographie ou pour la mesure de l'activité procoagulante de phospholipides (PPA). Pour ces expériences, elles ont été ajustées à une concentration de 3×10^6 cellules/mL dans du HBS. En prenant 5 μ L de cette dernière suspension (de cellules), nous avons obtenu une concentration finale de $1,3 \times 10^5$ cellules/mL dans les puits de la plaque de thrombinographie et de 1×10^5 cellules/mL dans les puits de la plaque de l'activité PPA.

b) Génération de thrombine à la surface des cellules adhérentes

Les cellules aortiques humaines (CE et CML) ont étéensemencées dans des plaques de culture de 96 puits (MICROTESTTM⁹⁶) à raison de 7500 cellules/puits. Deux jours après, les cellules sont arrivées à 90 % de confluence environ, et ont été utilisées pour les expériences.

c) Génération de thrombine à la surface des cellules ayant subi des déformations mécaniques

Les CML aortiques de rat Wistar subies à des déformations cycliques comme décrit dans la Figure 27 (dans des plaques à fond de silicium revêtues de collagène type I), ont été détachées par la trypsine (1mL/puits). Ensuite, les cellules ont été centrifugées 2 fois à 270 g pendant 10 min, et ajustées à 3×10^6 cellules /mL dans du HBS.


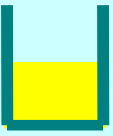
<p>Pour les cellules en suspension, VP et MP ①</p> <p style="text-align: center;">20 μL de mélange de :</p> <p style="text-align: center;">ou</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ 10 μL d'HBS + 5 μL de rFT + 5 μL de CML, VP, ou MP <p style="text-align: center;">ou</p> ➤ 15 μL d'HBS + 5 μL de CML, VP ou MP <p style="text-align: center;">ou</p> ➤ 10 μL de PCa + 5 μL de rFT + 5 μL de CML, VP, ou MP 	<p>Pour les cellules adhérentes</p> <p style="text-align: center;">20 μL de mélange de :</p> <p style="text-align: center;">ou</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ 20 μL d'HBS <p style="text-align: center;">ou</p> ➤ 15 μL d'HBS + 5 μL de rFT <p style="text-align: center;">ou</p> ➤ 10 μL d'HBS + 10 μL de PCa <p style="text-align: center;">ou</p> ➤ 5 μL d'HBS + 5 μL de rFT + 10 μL de PCa
<p>②</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>plasma (80 μL) 5 min à 37°C</p> </div> <div style="text-align: center;">  </div> </div> <p style="text-align: center;">ou</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>Dans une microplaque 96 puits en polypropylène) fond rond (Greiner) pour les cellules en suspension, VP et MP</p> </div> <div style="width: 45%; background-color: #e0ffe0; padding: 5px;"> <p>dans une plaque de culture à 96 puits (MICROTEST™96) pour les cellules adhérentes</p> </div> </div>	
<p>③</p> <p>mélange (20 μL) contenant un substrat fluorogène Z-GGR-AMC (2.5 mM) et du CaCl₂ (100 mM)</p> <p><i>agitation 10 s à 1200 rpm</i></p> <p>Enregistrement automatique de la cinétique de fluorescence ; analyse avec la version Thrombinoscope 3.0.1.0.55</p>	

Figure 30 : Protocole pour une étude en thrombinographie des cellules en suspension (CML de rat, VP et MP) et cellules adhérentes (CE et CML humaines)

3.7.3 Les paramètres thrombinographiques

La cinétique de génération de thrombine enregistrée est appelée thrombinogramme (**Figure 31**) et se décompose schématiquement en trois phases : initiation, propagation et terminaison décrites dans la page 40.

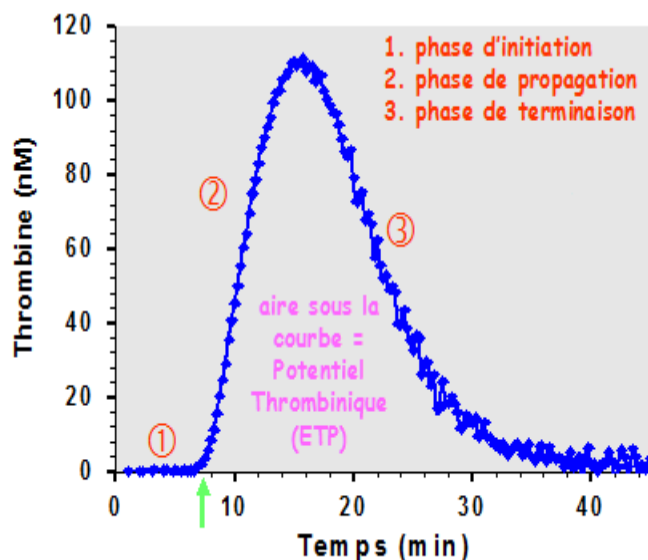


Figure 31: Thrombinogramme typique obtenu en présence d'un plasma riche en plaquettes

Le thrombogramme donne accès à plusieurs paramètres calculés (**Figure 32**) :

- Le temps de latence de génération de thrombine ; il correspond à la durée de la phase d'initiation (min).
- Le pic qui exprime la concentration maximale de thrombine (nM).
- Le temps pour atteindre le pic (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 le plus intégratif en thrombinographie, il représente la quantité totale de travail enzymatique que la thrombine est capable d'accomplir. Il est exprimé en nM.min.

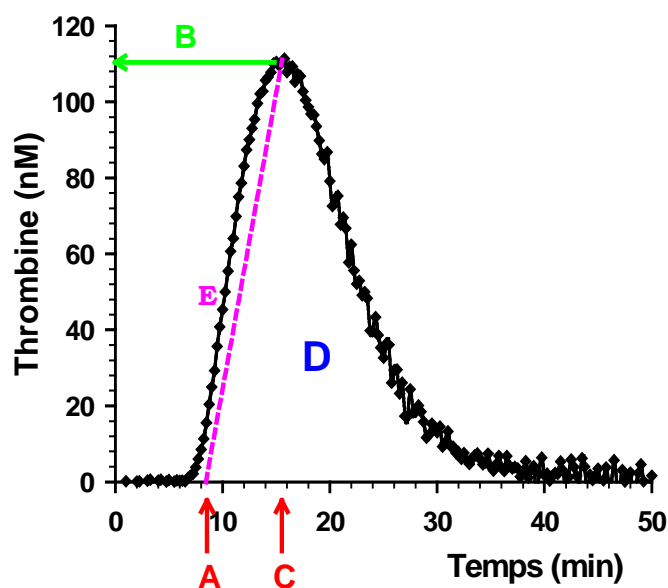


Figure 32 : Paramètres du thrombinogramme

(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).

3.7.4 Etude de systèmes anticoagulants à la surface des cellules endothéliales et cellules musculaires aortiques humaines en thrombinographie

3.7.4.1 Etude du rôle du TFPI associé à la surface de cellules

Nous avons étudié l'effet du TFPI exprimé par les CE et CML sur la génération de thrombine (étudiée en thrombinographie) à la surface de ces cellules par l'incubation des CE et des CML adhérentes avec un anticorps de lapin anti-TFPI humain (American diagnostica). Nous avons dilué l'anticorps dans les 20 μ L de tampon HBS ajoutés aux cellules adhérentes pour la thrombinographie et il a été incubé avec les cellules en présence de 80 μ L de plasma PDP déficient en TFPI (American diagnostica) pendant 30 min (à température ambiante) avant l'expérience de thrombinographie et durant sa progression.

3.7.4.2 Etude du système de la protéine C activée

a) Protéine C activée exogène : Sensibilité à la protéine C activée ajoutée à des concentrations croissantes

Pour étudier la réponse à la PCa exogène, la PCa préparée au laboratoire (234) a été utilisée à des concentrations croissantes en thrombinographie pour obtenir des valeurs décroissantes d'ETP. Nous avons utilisé un paramètre quantitatif : l'IC50-PCa qui correspond à la

concentration en PCa induisant une réduction de 50% de l'ETP (**Figure 33**). Cette valeur peut être considérée comme un bon indicateur de la sensibilité globale à la PCa. Nous aurions pu choisir une seule concentration en PCa, comme dans la très grande majorité des tests actuels pour rendre compte de cette sensibilité mais cela aurait été arbitraire.

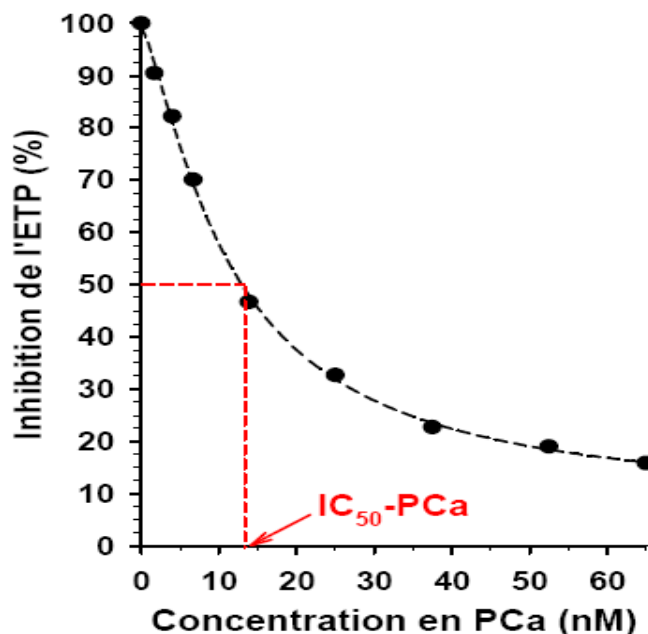


Figure 33 : Détermination de la concentration en PCa induisant une réduction de 50 % de l'ETP : IC₅₀-PCa

b) Protéine C activée endogène : Inhibition de la Protéine C activée formée dans le milieu réactionnel de la thrombinographie avec un anticorps anti-TM

Nous avons étudié l'effet de la PCa endogène générée à la surface des CE et des CML dans le milieu de thrombinographie suite à l'activation de la protéine C plasmatique à la surface des CE et des CML exprimant la TM et l'EPCR, (deux protéines nécessaires pour accélérer l'activation de la protéine C en PCa) sur la génération de thrombine à la surface de ces cellules. Les CE et les CML adhérentes ont été incubées avec un anticorps de chèvre anti-TM humaine (American diagnostica). Nous avons dilué l'anticorps dans les 20 µL du tampon HBS ajoutés aux cellules adhérentes à utiliser en thrombinographie et puis l'avons incubé avec les cellules en présence de 80 µL dans un PDP du pool normal pendant 30 min (à température ambiante) avant l'expérience de thrombinographie et durant sa progression.

3.8 Mesure de la protéine C activée formée à la surface des cellules endothéliales et cellules musculaires lisses aortiques humaines adhérentes en présence de la protéine C et de la thrombine

Les CE et les CML ont été lavées avec un tampon contenant de l'Hèpès 20 mM, 150 mM NaCl, CaCl₂ 2 mM, pH 7,4. Un volume de 50 µL de la protéine C (purifiée au laboratoire) à 65 nM a été ajouté avec 50 µL de thrombine bovine (DiaThrombin, DiaMed) à des concentrations croissantes (de 0 à 40 nM préparées dans le tampon de lavage) aux cellules adhérentes à 37°C. Après 1 heure, la thrombine a été inhibée avec 10 µL d'hirudine à 500 nM (ajoutée en excès pour inhiber la thrombine et arrêter la réaction). Les surnageants (100 µL) ont été prélevés et transférés dans une plaque 96 puits Nunc « Polysorb » et l'activité de la PCa a été déterminée par l'ajout de 50 µL du substrat de la PCa (S2366 à 0,4 mM). L'absorbance a été lue à 405 nm sur une cinétique de 30 min et la concentration en PCa formée est déterminée par référence à une courbe étalon formée de concentrations croissantes en PCa purifiée de 0 à 5 nM.

3.9 Inactivation du facteur Va par la protéine C activée

Le principe du test repose sur la détermination de l'activité résiduelle du FVa (résultant de l'inhibition du FVa par la PCa), comme cofacteur dans l'activation du FII par le FXa. Cette activité résiduelle du FVa a été déterminée dans un système purifié, basée sur la conversion de prothrombine en thrombine par la prothrombinase (**Figure 34**). Cette mesure a été réalisée à partir de facteurs purifiés humains en plusieurs étapes :

(1) Un mélange de 200 µL de tampon Hépès 25 mM, NaCl 175 mM, CaCl₂ 3 mM, pH 7,35 contenant de la BSA à 5 mg/mL et du FVa en quantité limitée (1 nM ; Synapse BV, Maastricht) a été incubé à 37°C pendant 10 min à 37°C en présence ou non de PS (490 nM), dans un puit d'une plaque de culture (MICROTESTTM⁹⁶) où les CE ou les CML étaient à 90% de confluence et ont été rincées avec de l'HBS juste avant l'expérience. L'inactivation du FVa a débuté lors de l'ajout de la PCa (5 nM) au mélange.

(2) En parallèle, des mélanges de 230 µL de tampon Tris 50 mM, NaCl 175 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 7,9 contenant de la BSA à 0,5 mg/mL, des VP à 100 µM (PC/PSer/PE : 60/20/20mole %) et du FII « prothrombine » (0,5 µM ; Synapse BV, Maastricht) ont été préchauffés à 37°C. Du FXa (Synapse BV, Maastricht) à 5 nM, 10 µL ont été ajoutés 15 sec avant l'ajout de 10 µL de FVa du mélange de l'étape (1) déclenchant ainsi l'activation du FII.

L'activité du FVa a été déterminée à des temps différents (0 ; 1 ; 2 ; 3 ; 5 ; 7 ; 9 ; 11 ; 13 ; 15 ; 17 ; 19 ; 21 ; 23 ; 25 ; 27 et 29 min.

(3) Après 1 min d'incubation, 750 μ L de tampon Tris 50 mM, NaCl 175 mM, EDTA 100 mM, pH 7,9 contenant de la BSA à 0,5 mg/mL ont été ajoutés de manière à stopper la réaction de formation de la thrombine. Après une rapide agitation au vortex, 25 μ L de ce dernier mélange ont été déposés dans les puits d'une plaque de 96 puits Nunc «Polysorb». Les dépôts ont été effectués en triple.

(4) Le FVa résiduel a été déterminé par mesure de la quantité de thrombine formée 1 min après l'ajout de 50 μ L de substrat S2238 à 0,2 mM dans chaque puit.

L'absorbance a été lue à 405 nm (lecture cinétique pendant 15 min avec un intervalle de mesure de 30 sec). Les résultats ont été exprimés en % d'inactivation du FVa en fonction du temps de manière à s'affranchir des variabilités de valeurs d'absorbance inter-expériences.

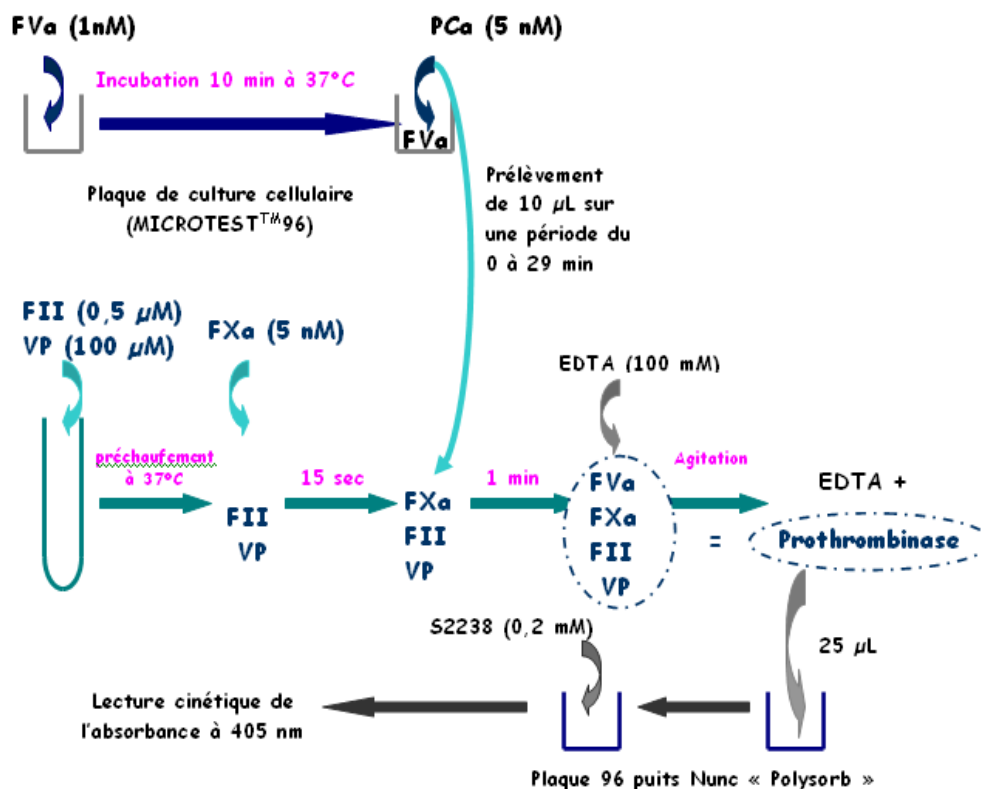


Figure 34 : Mesure de l'inactivation du FVa par la PCa à la surface des CE et CML aortiques humaines

3.10 Etude du rôle de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans la génération de thrombine à la surface des cellules musculaires lisses aortiques de rat Wistar

3.10.1 Incubation des cellules musculaires lisses avec des peptides RGD avant les expériences de coagulation

Nous avons utilisés 3 peptides (Bachem, Bubendorf, Switzerland) : le peptide RGD linéaire, (-Arginine-Glycine-Acide aspartique-), le peptide RGD cyclique, cRGDPV « Cyclo (-Arginine-Glycine-Acide aspartique-Proline-Valine) », et le peptide contrôle cRADPV, «Cyclo (-Arginine-Alanine- Acide aspartique -Proline-Valine) ». Les CML de rat Wistar ont été ensemencées à raison de 3×10^5 cellules par puits dans des plaques de six puits (Greiner bio-one, cell star® pour les cellules non soumises à des déformations cycliques) ou dans les plaques à fond de silicone revêtue par du collagène (BioFlex pour les cellules qui ont été soumises plus tard à des déformations cycliques) dans du milieu DMEM/F12 contenant 10% de sérum. Après confluence, les cellules ont été synchronisées par diminution du sérum de 10% à 0,5% pendant 2 jours. Le jour des expériences :

(a) Pour l'étude sans application de déformations cycliques aux cellules : Après les étapes de détachement par la trypsine, comptage et centrifugation, les cellules ont été incubées avec les peptides à raison d'une concentration finale variante entre 0.005 mM et 2 mM. Les cellules ont été ajustées à 3×10^6 cellules/mL avec de l'HBS et 5 μ L de cette dernière suspension cellulaire ont été pris pour la thrombinographie (concentration finale de $1,3 \times 10^5$ cellules/mL) ou la mesure de l'activité PPA (concentration finale de 1×10^5 cellules/mL).

(b) Pour l'étude après l'application des déformations cycliques aux cellules : les cellules ont été incubées 30 min avec les peptides (dissous dans du diméthylsulfoxyde «DMSO») à raison d'une concentration finale variante entre 0.005 mM et 2 mM, soumises à un étirement cyclique (en Flexcell) à différents temps. Ensuite, les cellules ont été détachées par la trypsine, comptées et centrifugées 2 fois à 270 g pour 10 min avant d'être ajustées à 3×10^6 cellules/mL avec de l'HBS et 5 μ L de cette dernière suspension cellulaire ont été pris pour la thrombinographie (où nous avons obtenu une concentration finale de $1,3 \times 10^5$ cellules/mL).

3.10.2 Transfection des cellules musculaires lisses aortiques du rat Wistar avec un siARN α_v , siARN α_5 ou siARN contrôle avant les expériences de coagulation

Principe : Les ARN interférents (siARN), ce sont des oligonucléotides comportantes de séquences spécifiques des molécules d'ARN qui se lient à une séquence complémentaire d'un ARNm cible, bloquant ainsi la traduction de cet ARNm cible, et entamant sa dégradation. Par conséquent, la synthèse de la protéine d'intérêt est empêchée. Ces si-ARN sont mélangés avec un réactif spécifique (Matra-si) qui contient des nanoparticules magnétiques optimisées pour lier efficacement et stabiliser le siARN.

Les CML de rat Wistar ont étéensemencées à la concentration de 8×10^5 cellules par puit dans un milieu DMEM/F12 à 10% de SVF. Le milieu est changé au bout de 24 heures et la transfection a lieu 1 heure après. Une quantité de 3 μg de siARN α_v (pour inhiber l'expression de la sous-unité α_v), siARN α_5 (pour inhiber l'expression de la sous-unité α_5) ou siARN contrôle (Silencer® siRNA Starter Kit, Luxembourg) a été préparé dans 200 μL de milieu DMEM sans supplément, sérum et antibiotiques. Un volume de 200 μL de ce dernier (siARN) a été ensuite ajouté à 3 μL de MATra-si dans un autre tube. Le mélange a été agité doucement au vortex et incubé pendant 15 à 20 min à température ambiante. Le mélange siARN–MATra-si a été distribué sur les cellules et agité par des allers-retours. La plaque a été mise sur un support « MAGnet plate » et incubée 15 min à 37°C. Les cellules ont été mises dans du milieu DMEM/F12 à 0.5% de SVF 24h après la transfection avant d'être utilisées en thrombinographie ou PPA.

3.11 Statistiques

L'ensemble des résultats est exprimé en moyenne \pm SEM. Dans la majorité des cas, les résultats ont été comparés en utilisant un test t de Student au seuil de risque 5%. Lorsqu'un autre test a été utilisé (analyse de tendance, analyse de variance), celui-ci a été précisé dans le tableau des résultats correspondant. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel StatView.

4 RESULTATS

4.1 Génération de thrombine à la surface des cellules musculaires lisses aortiques de rat Wistar

Nos premières expériences de la génération de thrombine à la surface des CML ont consisté à incuber les CML de rat Wistar détachées par la trypsine ou adhérentes (dans certaines expériences) avec un plasma PDP humain (préparé à partir de sujets sains) citraté recalcifié, en présence ou non de FT recombinant humain. Les cellules en suspension ont été ajustées, afin de travailler dans des conditions expérimentales homogènes, à une concentration de 3×10^6 dans l'HBS. De cette dernière suspension, nous avons pris 5 μ L (de cellules en suspension) pour obtenir une concentration finale de $1,3 \times 10^5$ cellules/mL dans les puits de la plaque de thrombinographie et de 1×10^5 cellules/mL dans les puits de la plaque de l'activité PPA.

4.1.1 Profil du thrombinogramme

Dans un premier temps, nous avons étudié les CML aortiques de rats Wistar en thrombinographie. Nous avons obtenu de thrombinogrammes similaires, au cours de différents passages (entre 3 et 12), avec les CML de rat Wistar détachées par la trypsine ; un de ces thrombinogrammes est montré dans la **Figure 35**. La forme typique de la courbe (composée de trois phases : initiation, propagation et terminaison) obtenue en présence de CML de rat, montre que ces CML peuvent servir de support approprié pour la génération de thrombine *in vitro*.

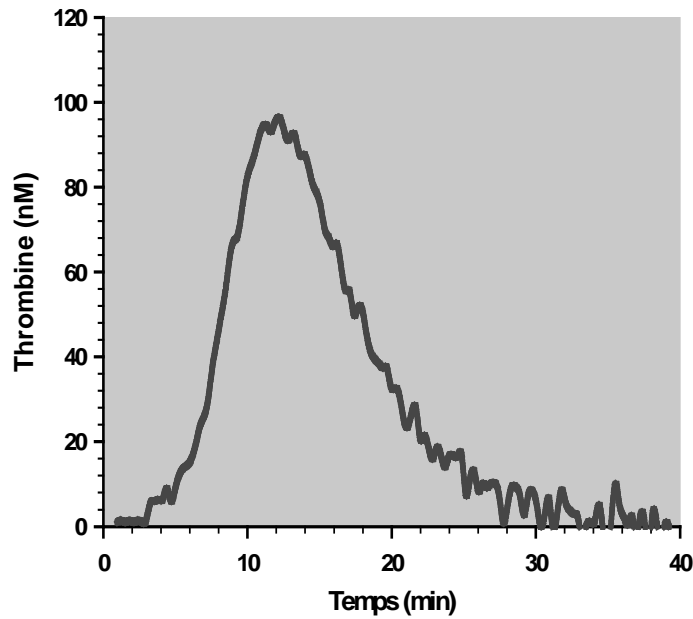


Figure 35 : Génération de thrombine en présence de CML aortiques de rat Wistar. Les CML ont été détachées par la trypsine, ajustées à $1,3 \times 10^5$ cellules/mL et incubées avec du PDP et du FT à 0,5 pM.

4.1.2 Effets de la protéine C activée

Pour étudier la réponse à la PCa par des CML de rat Wistar, nous avons ajouté la PCa à des concentrations croissantes (**Figure 36**). Nous avons observé une réponse à la PCa (diminution de la génération de thrombine de façon concentration-dépendante jusqu'à l'inhibition complète de la génération de thrombine en présence de 65 nM de PCa ajoutée dans le test). Cela montre que les CML de rat pourraient servir comme surfaces appropriées non seulement pour la génération de thrombine mais aussi pour l'inhibition de la thrombine par le système anticoagulant de la PCa (**Figure 36**).

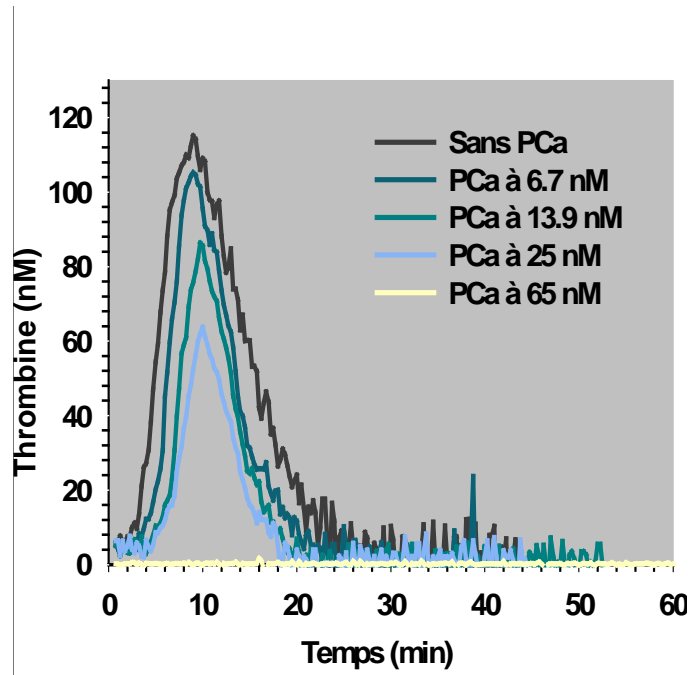


Figure 36 : Influence de l'ajout de PCa sur la génération de thrombine à la surface des CML de rat Wistar. Les CML ont été détachées par la trypsine, et incubées avec du PDP à concentration finale de $1,3 \times 10^5$ cellules/mL, du FT à 0,5 pM et de la PCa à 4 concentrations différentes.

4.1.3 Effet du nombre des cellules

En thrombinographie, nous avons utilisé plusieurs concentrations de CML de rats Wistar en suspension. Nous avons observé des modifications pour tous les paramètres du thrombinographie : une augmentation de valeurs de l'ETP, du pic, et de la vélocité ainsi qu'un raccourcissement du temps de latence et du temps au pic qui est dépendante de la concentration (**Figure 37**). Cette augmentation de l'ETP et du pic n'est pas linéaire mais évolue selon une équation fonction exponentielle.

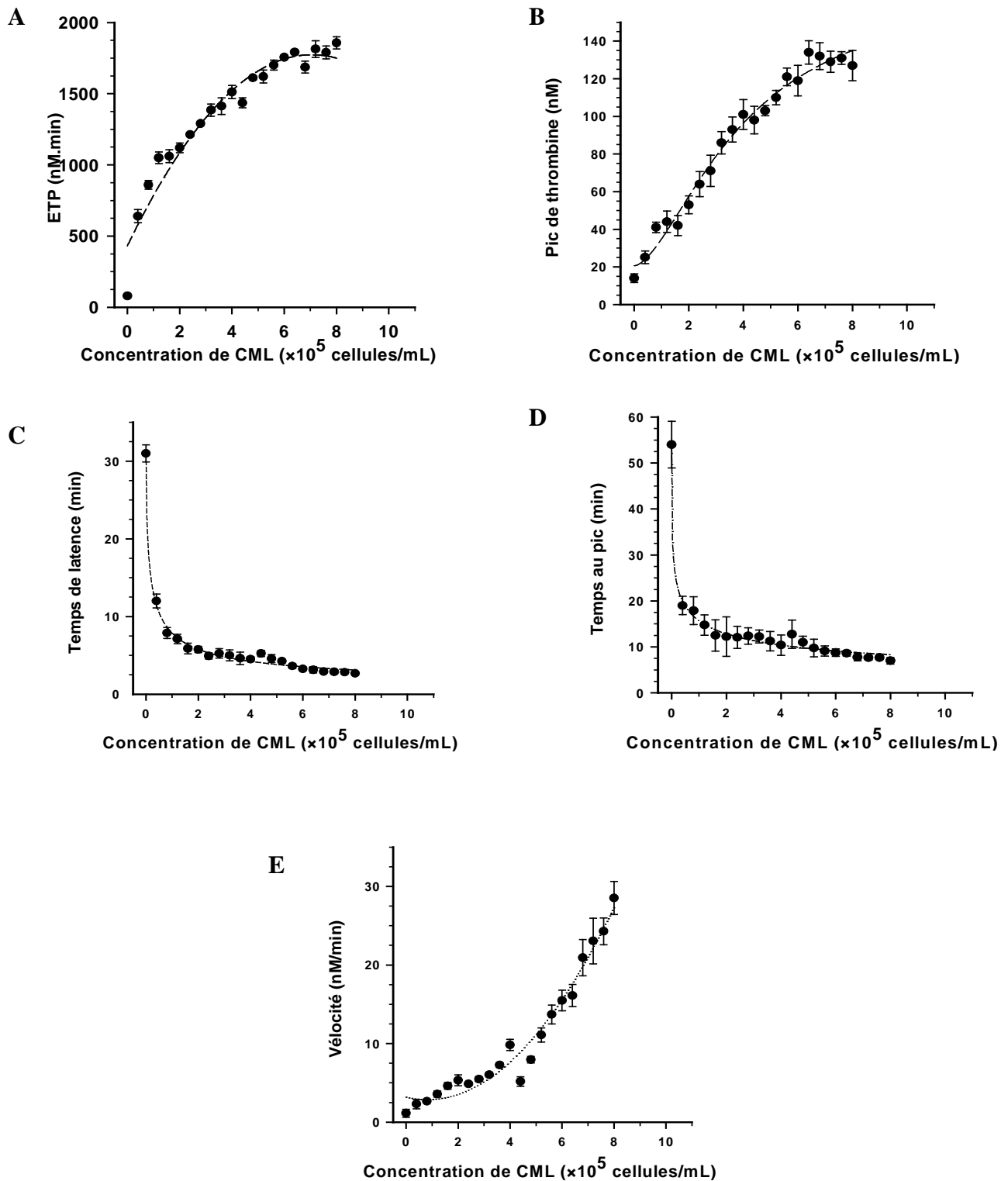


Figure 37 : Influence de la concentration de CML de rats Wistar sur les paramètres du thrombinogramme. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM (n=3).

Dans la courbe représentant les valeurs de l'ETP en fonction de la concentration finale de CML, nous avons choisi la concentration de $1,3 \times 10^5$ cellules/mL de CML qui correspond à une valeur de l'ETP dans la partie ascendante de la courbe (avant qu'elle n'atteigne la saturation). Nous avons ajusté les CML à cette dernière concentration pour toutes les expériences de génération de thrombine sur les CML de rat détachées par la trypsine afin de travailler avec un nombre précis de CML au cours des expériences de thrombinographie.

4.1.4 Effet de l'ajout de FT exogène

La thrombinographie a été réalisée en présence de CML aortiques de rats Wistar à une concentration finale de $1,3 \times 10^5$ cellules/mL, de PDP et de FT à différentes concentrations (de 0 à 50 pM). Nous n'avons pas observé de modifications des différents paramètres des thrombinogrammes en présence de différentes concentrations en FT (**Tableau IV**).

FT (pM)	ETP (nM.min)	Pic (nM)	Temps de latence (min)	Temps au pic (min)	Vélocité (nM/min)
0	1106 ± 85	75 ± 5	2,7 ± 0,2	7,1 ± 0,5	16 ± 0,3
0,125	1186 ± 54	82 ± 1	2,4 ± 0,2	8,0 ± 0,9	14,9 ± 0,3
0,5	1220 ± 146	74 ± 4	2,6 ± 0,3	7,6 ± 0,4	15,1 ± 0,3
1,25	1129 ± 147	77 ± 8	2,8 ± 0,1	7,9 ± 0,4	15,2 ± 0,7
2,5	1185 ± 134	83 ± 9	2,5 ± 0,3	7,1 ± 0,3	17,0 ± 2,0
5	1269 ± 61	82 ± 4	2,0 ± 0,5	7,5 ± 0,3	15,8 ± 0,3
50	1258 ± 24	88 ± 6	1,8 ± 0,2	5,6 ± 0,8	18,2 ± 0,8

Tableau IV : Effet de l'ajout de FT à différentes concentrations sur la génération de thrombine à la surface des CML de rats Wistar. Les résultats représentent les paramètres de thrombinogrammes obtenus en présence de CML de rat Wistar (détachées et ajustées à $1,3 \times 10^5$ cellules/mL), de PDP, et de différentes concentrations de FT. Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM (n=3).

4.1.5 Effet de la conservation des cellules avant la thrombinographie

Nous avons étudié l'effet du temps entre le détachement des CML de rat Wistar par la trypsine et l'étude en thrombinographie. Nous avons séparé les cellules détachées en deux lots, un lot qui a été passé aussitôt en thrombinographie et l'autre lot conservé 2 heures à température ambiante avant la thrombinographie. Nous avons remarqué que les paramètres des thrombogrammes obtenus avec les deux lots étaient similaires, ce qui montre qu'un écart de deux heures entre le détachement de cellules et la thrombinographie n'a pas d'effet sur la génération de thrombine à la surface de CML.

	ETP (nM.min)	Pic (nM)	Temps de latence (min)	Temps au pic (min)	Vélocité (nM/min)
CML sans conservation	1141 ± 50	75 ± 6	2,9 ± 0,1	8,2 ± 0,4	15,8 ± 0,5
CML conservées 2 heures	1137 ± 71	73 ± 7	2,8 ± 0,2	8 ± 0,3	16,5 ± 1,2

Tableau V : Effet de conservation après détachement des CML de rat Wistar par la trypsine sur la génération de thrombine à leur surface. Les résultats représentent les paramètres de thrombinogrammes obtenus en présence de CML de rat Wistar passées en thrombinographie juste après le détachement et après deux heures (les CML ont été ajustées à $1,3 \times 10^5$ cellules/mL). Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM (n=3).

Nous avons étudié la viabilité des CML par la coloration au bleu trypan par détermination du pourcentage des cellules mortes dans les deux parties de CML. Nous avons constaté que le pourcentage des cellules colorées (au microscope) s'élève de $4,0 \pm 0,4$ % pour les cellules sans conservation et de $7,5 \pm 0,8$ % (pour les cellules conservées pendant 2 heures à température ambiante).

4.1.6 Effet du détachement des cellules par la trypsine

Nous avons étudié l'effet de détachement de CML de rat Wistar de leur support par la trypsine sur la génération de thrombine par ces cellules en comparant la génération de thrombine avec de CML détachées par la trypsine à celle de cellules adhérentes après les avoir ajustées au même nombre « 15000 cellules ». La **Figure 38 A** montre les deux thrombinogrammes obtenus avec les CML détachées et adhérentes. Le **Tableau VI** montre les valeurs des paramètres thrombinographiques pour les CML détachées et adhérentes. Ces paramètres sont significativement différents pour les valeurs d'ETP, de Pic et de vélocité mais similaires pour le temps de latence et le temps au pic. La différence significative du travail thrombinique entre les CML détachées et adhérentes, représenté par les valeurs d'ETP, est montrée dans la (**Figure 38 B**). Cette différence au niveau du travail thrombinique s'accompagne par une différence significative dans les valeurs de PPA entre les cellules détachées et adhérentes où elles sont significativement plus élevées pour les cellules détachées (**Figure 38 C**).

A

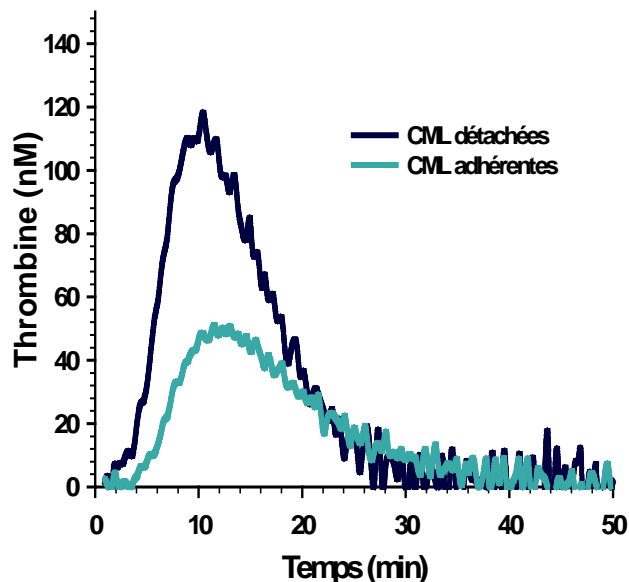


Figure 38 A : Thrombinogrammes obtenus avec des CML du rat Wistar détachées par la trypsine ou adhérentes. Les cellules ont été ajustées au même nombre « 15000 cellules ».

	ETP (nM.min)	Pic (nM)	Temps de latence (min)	Temps au pic (min)	Vélocité (nM/min)
CML détachées	1094 ± 86*	74 ± 10*	3,8 ± 0,1	11,1 ± 0,3	15,8 ± 0,5*
CML adhérentes	712 ± 45	42 ± 3	4,4 ± 0,4	12,6 ± 0,8	10,6 ± 1,2

Tableau VI : Effet du détachement des CML de rat Wistar par la trypsine sur les paramètres de génération de thrombine à leur surface. Les résultats représentent les paramètres de thrombinogrammes obtenus en présence de CML de rat Wistar détachées par la trypsine et adhérentes (ajustées au même nombre de 15000 cellules), de PDP humain, et de FT à 0,5 pM. Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM (n=5). * $p < 0,05$ versus CML adhérentes.

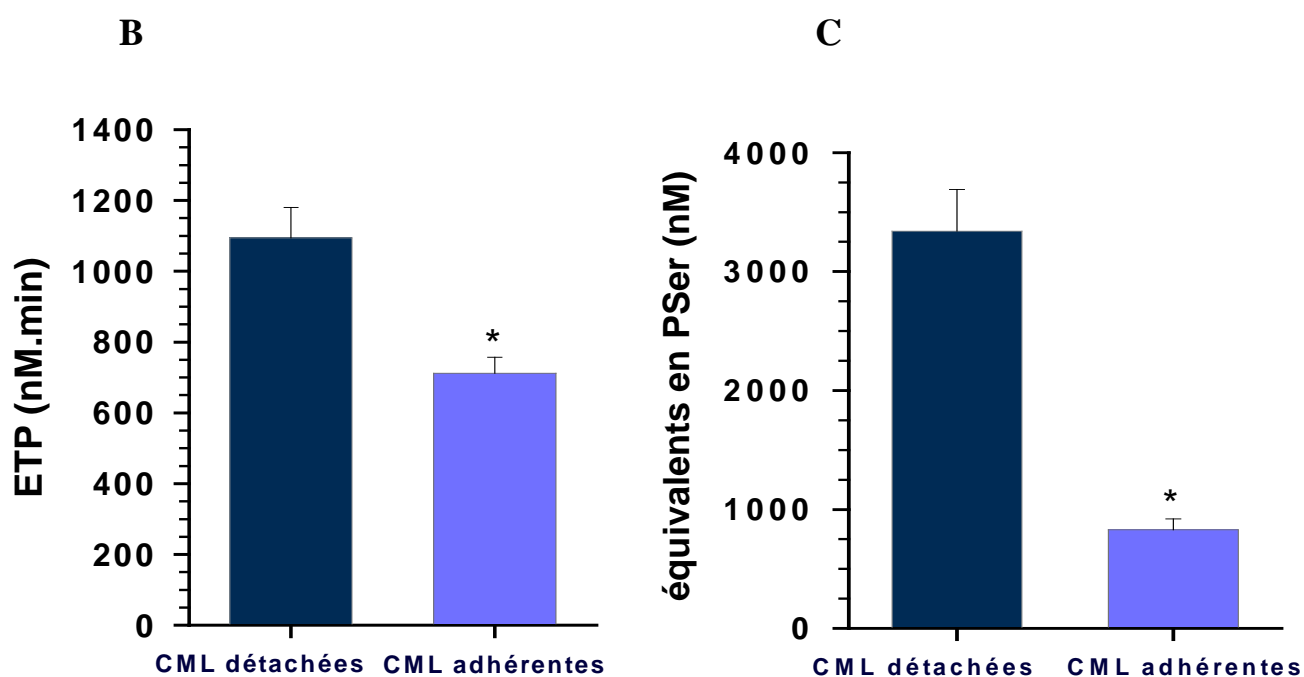


Figure 38 B, 38 C : Génération de thrombine et activité PPA à la surface des CML de rat Wistar détachées par la trypsine ou adhérentes ajustées au même nombre de 15000 cellules. Les résultats sont exprimés en moyennes d'ETP ± SEM (pour la thrombine générée) et d'équivalents PSer ± SEM (pour la PPA) (n=5). * $p < 0,05$ versus CML détachées.

4.1.7 La sensibilité des CML à la PCa ajoutée en thrombinographie

Nous avons étudié l'effet de la PCa exogène humaine ajoutée à des concentrations croissantes en thrombinographie dans l'inhibition de la thrombine formée à la surface des CML détachées par la trypsine ou adhérentes, ajustées au même nombre (15000 cellules) en présence de PDP et de FT à 0,5 pM. La **Figure 39** montre les courbes d'inhibition par la PCa des valeurs d'ETP obtenues avec les CML détachées ou adhérentes. A partir de ces courbes nous avons exprimé la sensibilité de ces cellules à la PCa par la valeur d' IC_{50} -PCa qui représente la concentration en PCa nécessaire pour diminuer la valeur d'ETP (en absence de PCa) de 50%. A droite, les valeurs moyennes d' IC_{50} -PCa de 5 expériences différentes ont été comparées pour les CML détachées par la trypsine et les CML adhérentes, indiquant des sensibilités similaires de ces cellules à la PCa exogène ajoutée.

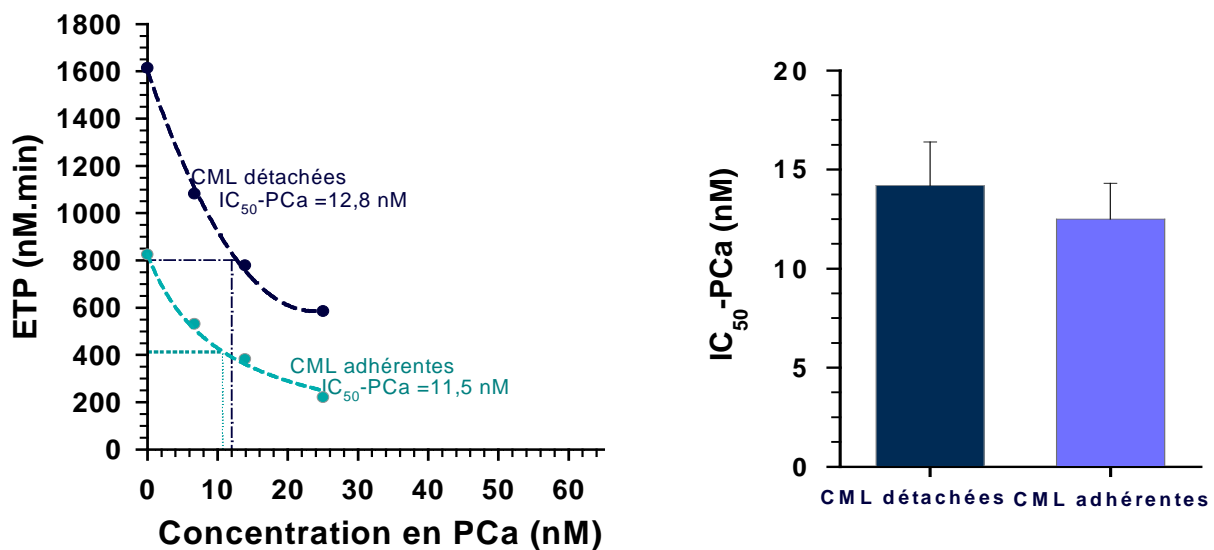


Figure 39 : Sensibilité à la PCa des CML de rat Wistar détachées par la trypsine ou adhérentes ajustées au même nombre de 15000 cellules. Les résultats des histogrammes sont exprimés en valeurs moyennes d' IC_{50} -PCa \pm SEM (n=5).

4.2 Comparaison de la génération de thrombine à la surface des cellules musculaires lisses aortiques issues de rats Zucker contrôles et obèses

Nous avons comparé la génération de thrombine à la surface des CML aortiques issues de deux génotypes du rat Zucker, FA/FA et fa/fa. Les expériences ont été réalisées sur les cellules entre les passages 3 et 12. Les CML ont été détachées de leur support de culture par la trypsine, centrifugées avec de l'HBS avant d'être utilisées en thrombinographie à concentration finale de $1,3 \times 10^5$ cellules/mL en présence de PDP humain, de FT recombinant humain à 0,5 pM, sans ou avec PCa humaine à différentes concentrations.

Dans la mesure de l'activité PPA à la surface de ces CML, les cellules ont été ajustées à une concentration finale de 1×10^5 cellules/mL. Dans ces conditions, nous avons observé que le travail thrombinique généré à la surface des CML du rat fa/fa est significativement moins important que celui généré à la surface des CML du rat FA/FA ou du rat Wistar (**Figure 40**). Les CML de rat Wistar et de rat FA/FA montrent des valeurs similaires de travail thrombinique. Les autres paramètres thrombinographiques, montrent des valeurs similaires d'ETP et de pic pour les CML de rat Wistar et les CML de rat FA/FA, et un pic significativement moins important pour les CML de rat fa/fa comparées aux CML de rat FA/FA (**Tableau VII**). Le temps de latence et le temps au pic étaient significativement différents entre les CML issues des trois types de rats (**Tableau VII**).

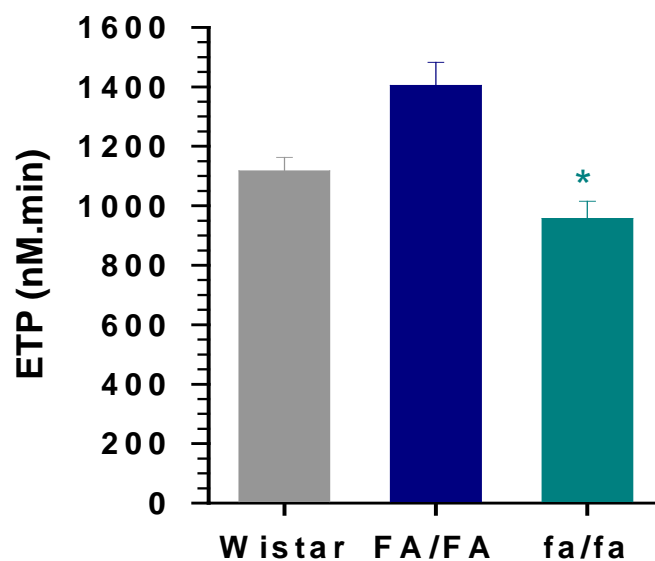


Figure 40 : Travail thrombinique réalisé à la surface des CML de rat Wistar, FA/FA et fa/fa. Les cellules ont été détachées par la trypsine et ajustées à $1,3 \times 10^5$ cellules/mL en présence de PDP, et de FT à 0,5 pM. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes d'ETP \pm SEM (n=8) ; * $p < 0,05$ versus CML de rat FA/FA ou Wistar.

	ETP (nM.min)	Pic (nM)	Temps de latence (min)	Temps au pic (min)	Vélocité (nM/min)
CML de rat Wistar	1151 ± 122*	86 ± 13,5	5,3 ± 0,3*	11,7 ± 0,9*	13 ± 3,8
CML de rat FA/FA	1358 ± 115*	112 ± 12,1*	4,5 ± 0,4* [#]	9,7 ± 0,9* [#]	17 ± 1,9*
CML de rat fa/fa	1077 ± 113	68 ± 9,7	6,7 ± 0,5	13,6 ± 0,8	11 ± 2,1

Tableau VII : Paramètres thrombinographiques obtenus avec les CML de rat Wistar, FA/FA et fa/fa. Les cellules ont été détachées par la trypsine et ajustées à $1,3 \times 10^5$ cellules/mL en présence de PDP, et FT à 0,5 pM. Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM (n=8). * $p < 0,05$ versus CML de rat fa/fa. [#] $p < 0,05$ versus CML de rat Wistar.

Nous avons également observé des valeurs de PPA moins importantes avec les CML de rat fa/fa qu'avec les CML de rat FA/FA ou de rat Wistar (**Figure 41**).

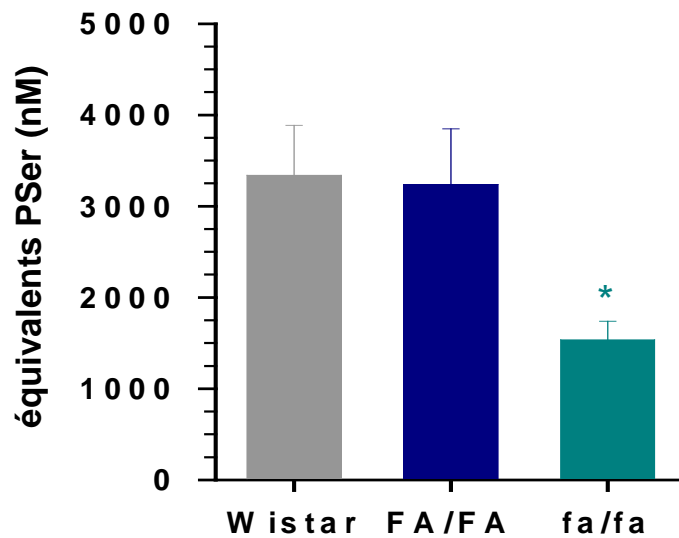


Figure 41 : Valeurs de l'activité PPA exprimées en équivalents Pser à la surface de CML de rat Wistar, FA/FA et fa/fa. Les cellules ont été détachées par la trypsine et ajustées à une concentration finale de 1×10^6 cellules/mL. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes d'équivalents Pser \pm SEM (n=8) ; * $p < 0,05$ versus CML de rats FA/FA ou Wistar.

De plus, la sensibilité à la PCa est plus élevée pour les CML de rat fa/fa que pour les CML de rat FA/FA ou de rat Wistar puisque les valeurs d'IC₅₀-PCa sont significativement moins élevées pour les CML de rat fa/fa que pour les CML de rat FA/FA ou de rat Wistar (Figure 42).

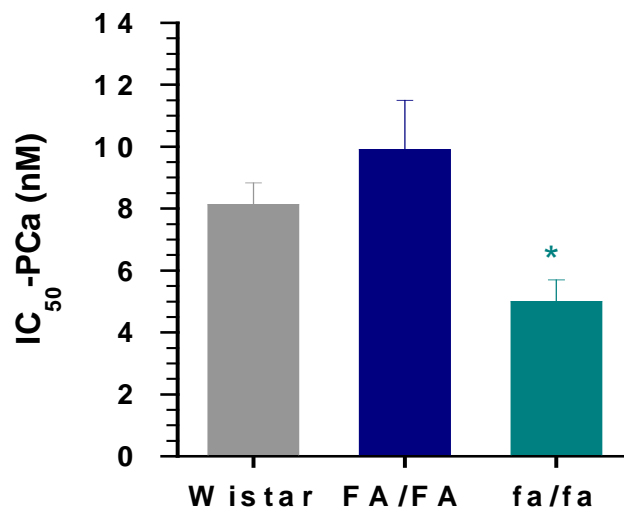


Figure 42 : Sensibilité à la PCa exogène des CML de rat Wistar, FA/FA et fa/fa. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes d'IC₅₀-PCa \pm SEM (n=8); * $p < 0,05$ versus FA/FA et Wistar.

4.3 Etude de la génération de thrombine à la surface des cellules musculaires lisses de rat Wistar soumises ou non à des contraintes mécaniques

Nous avons étudié la génération de thrombine et l'activité PPA en présence de CML de rat Wistar cultivées dans des plaques six puits à fond de silicone (**Figure 27**) dans de milieu DMEM/F-12 contenant 10% de sérum. Après confluence, elles ont été synchronisées par privation de sérum pendant 2 jours. Les cellules ont été alors soumises (ou non) à des déformations mécaniques cycliques (10% de déformation et 1 Hertz de fréquence) pendant 5, 10, 15, 30, 60 et 360 min. Ces temps d'étirement cyclique ont été choisis parce qu'ils correspondent aux temps nécessaires pour déclencher les voies de signalisation induites par l'activation des intégrines qui jouent le rôle de mécanosenseurs. Les expériences de génération de thrombine ont été réalisées avec de CML détachées par la trypsine après l'étirement en raison d'un problème technique (impossibilité de faire rentrer les plaques six puits où les cellules ont été cultivées dans le fluorimètre). Les cellules ont été ajustées avec de l'HBS à $1,3 \times 10^5$ cellules/mL (concentration finale en thrombinographie), et à 1×10^5 cellules/mL (concentration finale pour l'activité PPA). En thrombinographie, les cellules ont été incubées avec du PDP humain et du FT recombinant humain à 0,5 pM.

4.3.1 Effet d'étirement cyclique appliqué aux cellules sur l'activité procoagulante de phospholipides, la génération de thrombine à la surface des cellules musculaires lisses et sur leur sensibilité à la PCa

La (**Figure 43**) montre l'évolution de l'activité PPA en fonction de la durée des déformations mécaniques cycliques.

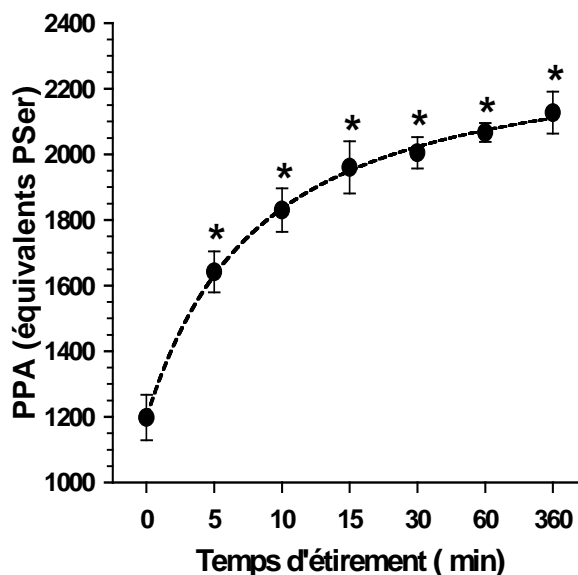


Figure 43 : Augmentation de l'activité PPA des CML de rat Wistar en fonction du temps d'étirement cyclique. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes de PSer équivalents \pm SEM (n=3) ; * p <0,05 versus CML non soumises à l'étirement.

Cette figure montre que la valeur de PPA des CML de rat Wistar augmente avec la durée de l'étirement cyclique, et que cette augmentation est significative dès la cinquième minute.

La **Figure 44 A**, montre le profil thrombinographique à la surface des CML de rat Wistar soumises ou non à des déformations mécaniques cycliques pendant 6 heures, et la **Figure 44 B** montre l'augmentation de l'ETP avec le temps de stretch. Les résultats dans la **Figure 44 B** sont exprimés en rapport : ETP des cellules ayant subi l'étirement/ETP sans étirement cyclique pour ne pas tenir compte des variations journalières liées à l'utilisation de différents plasmas. L'ETP n'est pas significativement modifié pour les temps 5, 10 et 15 min d'étirement. Une augmentation variable mais non significative est observée à 30 min et devient significative aux temps 60 min et 360 min. L'ETP a été choisi comme paramètre pour mettre en évidence les effets du temps de stretch sur la génération de thrombine.

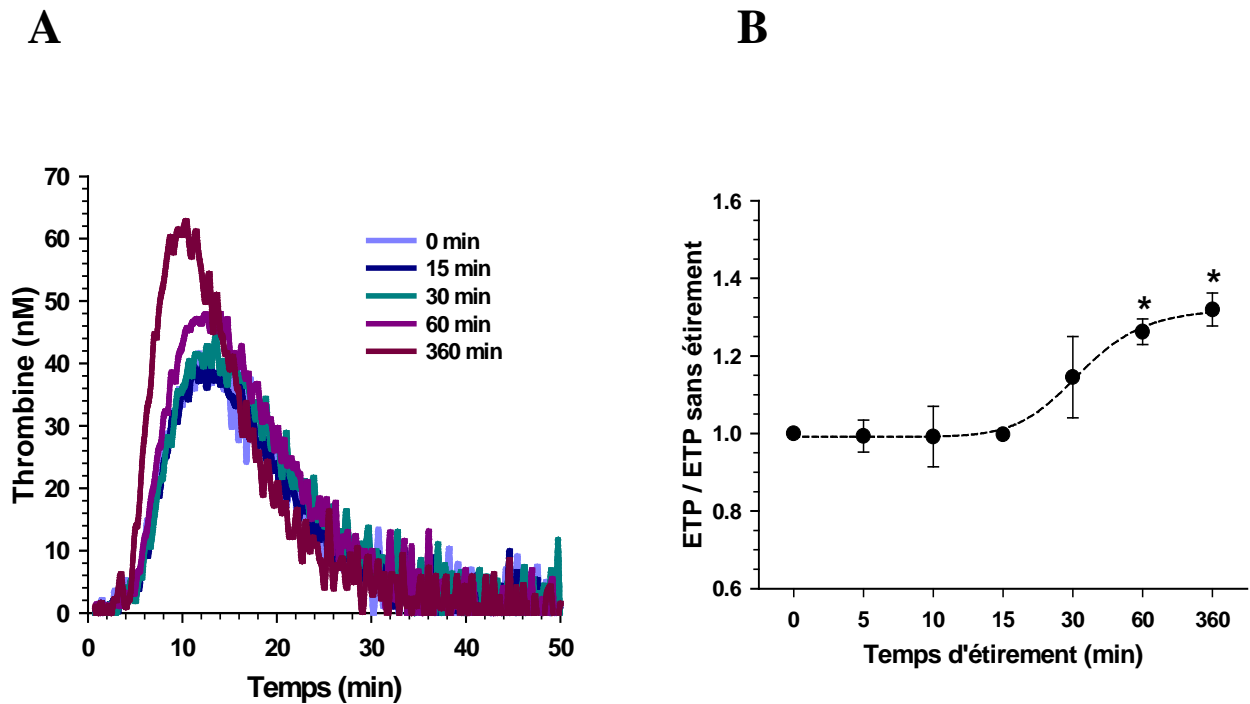


Figure 44 : A) Profils thrombinographiques et B) Travail thrombinique obtenu à la surface des CML soumises à différents temps de déformations mécaniques. Les cellules ont été soumises à 10% de déformation et 1 Hertz de fréquence. Les résultats de (B) sont exprimés en ratios d' (ETP/ETP sans étirement) représentés sous la forme de moyennes \pm SEM (n=3).

Nous avons également étudié l'effet de déformations cycliques sur la sensibilité des CML à la PCa. Comme le montre la **Figure 45**, nous avons obtenu des valeurs similaires d'IC₅₀-PCa avec les CML soumises ou non à des déformations cycliques pendant 6 heures. Au contraire de leur effet d'augmenter la génération de thrombine à la surface des CML, les déformations cycliques (à différents temps pendant 6 heures) ne modifient pas la sensibilité des CML à la PCa (**Figure 45**).

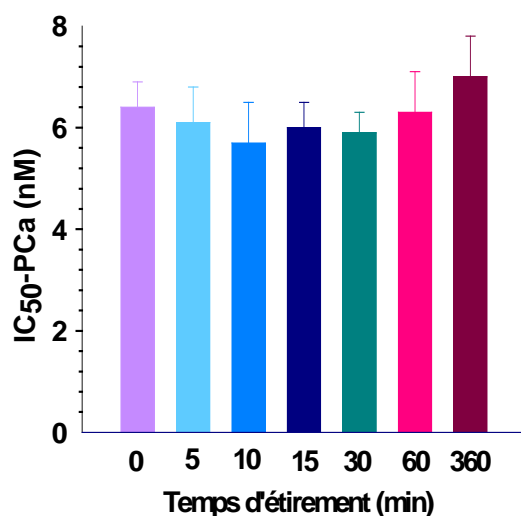


Figure 45 : Sensibilité à la PCa des CML soumises à des temps différents de déformations mécaniques. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes d'IC₅₀-PCa ± SEM (n=3).

4.3.2 Effet de peptides RGD sur l'activité procoagulante de phospholipides et la génération de thrombine à la surface des CML de rat Wistar

Pour étudier l'effet de l'inhibition de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, exprimée par les CML vasculaires comme récepteur de la prothrombine dans la génération de thrombine à la surface des CML, nous avons utilisé des peptides RGD (cyclique ou linéaire). Ces peptides jouent le rôle des peptides mimétiques du site de liaison de l' $\alpha_v\beta_3$ sur la prothrombine représenté par un RGD aussi. Les cellules ont été détachées par la trypsine, centrifugées 2 fois à 270 g pendant 10 min, et puis incubées avec des peptides RGD «cRGDPV ou RGD linéaire» et contrôle «cRADPV» pendant 10 min à 20°C. Les peptides ont été ajoutés à des concentrations croissantes variantes de 0,005 et à 2 mM (finale en thrombinographie ou PPA). Ensuite, les CML ont été ajustées à une numération finale de $1,3 \times 10^5$ cellules/mL en thrombinographie ou à 1×10^5 cellules/mL dans la mesure de l'activité PPA.

4.3.2.1 Influence des peptides sur l'activité procoagulante de phospholipides

La **Figure 46** montre les effets des peptides RGD «cRGDPV ou RGD linéaire» et contrôle «cRADPV» sur l'activité PPA des CML de rat Wistar.

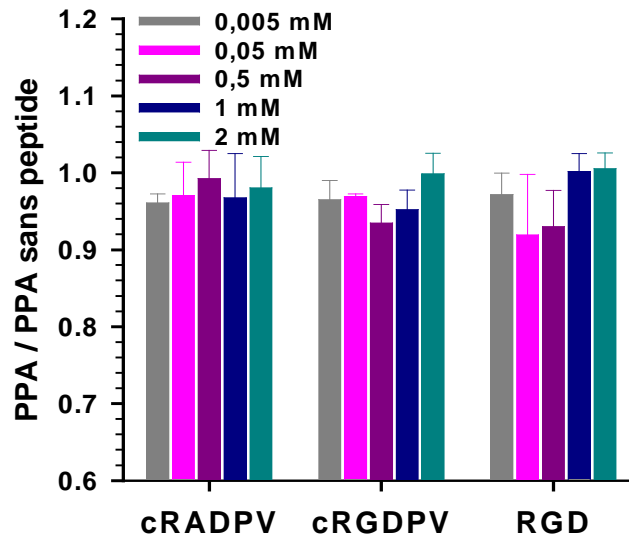


Figure 46 : Effet des peptides RGD sur l'activité PPA des CML de rat Wistar non soumises à des déformations cycliques. L'activité PPA en PSer équivalents est mesurée après avoir incubé les CML avec les peptides cRADPV (contrôle), cRGDPV ou RGD (inhibiteurs de l' $\alpha_v\beta_3$). Les résultats sont exprimés en ratios (PPA avec peptide/PPA sans peptide) présentés sous la forme de moyennes \pm SEM (n=3).

En l'absence de déformation cyclique, nous avons obtenu des valeurs similaires de PPA avec les CML, traitées avec un peptide contrôle (cRADPV) ou avec des peptides spécifiques de l' $\alpha_v\beta_3$ comme le cRGDPV ou le RGD.

4.3.2.2 Influence des peptides sur la génération de thrombine

La **Figure 47** montre que l'incubation des CML du rat Wistar avec des peptides RGD induit une diminution concentration-dépendante du travail thrombinique obtenu à la surface des CML, ce qui n'est pas observé avec le peptide contrôle (cRADPV).

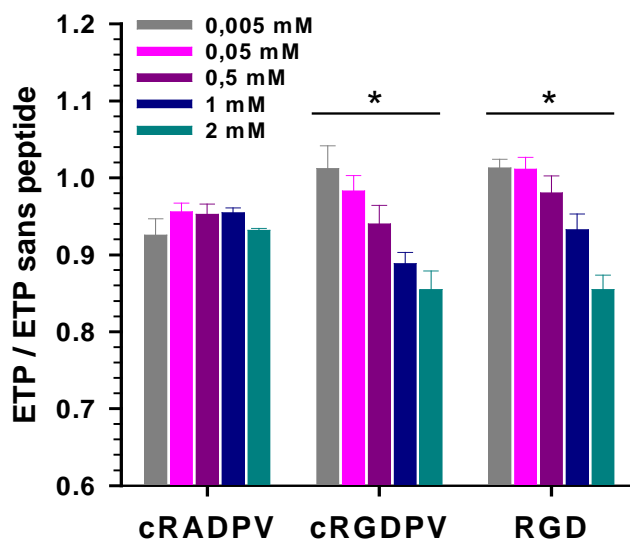


Figure 47 : Effet des peptides RGD sur la génération de thrombine à la surface des CML de rat Wistar non soumises à des déformations cycliques. Les résultats sont exprimés en ratios (ETP avec peptide / ETP sans peptide) et présentés sous la forme de moyennes \pm SEM (n=3). * $p < 0,05$ versus CML incubées avec peptide contrôle (cRADPV) selon le test statistique «TREND ANOVA».

4.3.3 Effet d'un ARN interférant ciblant la sous-unité α_v (siARN α_v) sur l'activité PPA et la génération de thrombine à la surface des cellules musculaires lisses de rat Wistar non soumises à des déformations cycliques

Comme l' $\alpha_v\beta_3$ est exprimé à la surface des CML, nous nous sommes intéressées à l'effet de l'expression de ce récepteur sur la génération de thrombine à la surface des CML. Les CML ont été transfectées avec un siARN α_v ou siARN contrôle. La **Figure 48 A** montre les profils thrombinographiques obtenus avec les CML transfectées avec un siARN α_v (qui va inhiber l'expression de la sous-unité α_v par les CML) ou siARN contrôle. Les CML transfectées avec le siARN α_v ont une génération de thrombine significativement diminuée (diminution de 20% pour la valeur d'ETP). Aucune modification au niveau des valeurs de PPA n'a été observée pour les CML transfectées avec le siARN α_v (**Figure 48 B**).

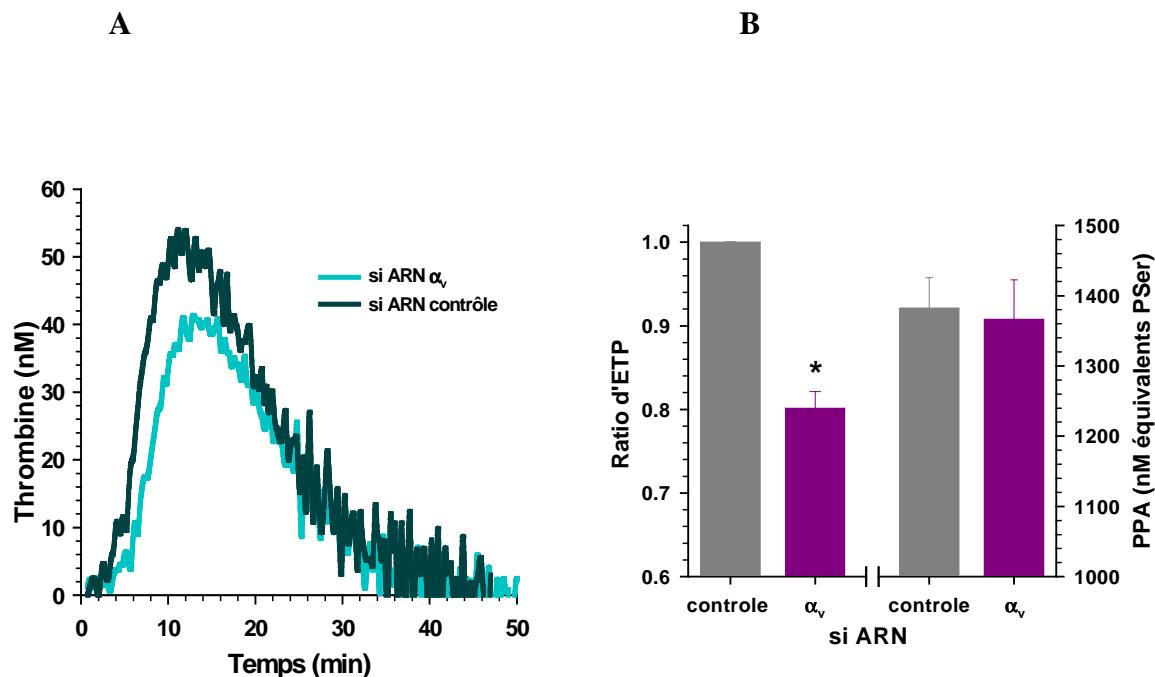


Figure 48 : Effet de la transfection des CML par le siARN ciblant la sous-unité α_v sur la génération de thrombine à leur surface. A) Les thrombinogrammes obtenues avec les CML transfectées avec le siARN α_v ou le siARN contrôle. B) Le travail thrombinique et l'activité PPA à la surface des CML transfectées. Les résultats sont exprimés en ratios ($ETP_{CML\ transfectées\ avec\ siARN\ \alpha_v} / ETP_{CML\ transfectées\ avec\ siARN\ contrôle}$) et présentés sous la forme de moyennes \pm SEM pour le travail thrombinique et en ratios de ($PPA_{CML\ transfectées\ avec\ siARN\ \alpha_v} / PPA_{CML\ transfectées\ avec\ siARN\ contrôle}$) et présentés sous la forme de moyennes \pm SEM pour l'activité PPA (n=3). * $p < 0,05$ versus 1.

4.3.4 Effet d'un peptide RGD cyclique ou d'un siARN α_v sur la génération de thrombine à la surface des cellules musculaires lisses aortiques de rat Wistar soumises à des déformations cycliques

Pour étudier l'effet de l'inhibition de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (par un peptide RGD cyclique) sur l'activité PPA et la génération de thrombine à la surface des CML soumises à des déformations cycliques, nous avons incubé les CML avec le peptide (cRGDPV) ou le peptide (cRADPV) à 0,05 mM pendant 30 min à 37°C avant de les soumettre pendant 360 min à des déformations cycliques (10%, 1 Hertz).

D'autre part, des CML de rat Wistarensemencées à 8×10^5 cellules/puits ont été transfectées avec un siARN α_v ou un siARN contrôle pendant 48 heures avant de les soumettre à des déformations cycliques. Nous avons également utilisé comme contrôle un siARN α_5

(l'intégrine α_5 est exprimée par les CML, et elle partage beaucoup de ligands et de voies de signalisation avec l'intégrine α_v mais n'est pas un récepteur de la prothrombine.

La **Figure 49** montre que les déformations cycliques augmentent significativement le travail thrombinique obtenu à la surface des CML traitées avec le peptide contrôle (cRADPV) alors qu'aucune augmentation n'est observée avec le peptide (cRGDPV) spécifique de l' $\alpha_v\beta_3$.

De plus, ces déformations cycliques augmentent également et de manière significative la génération de thrombine à la surface des CML transfectées avec le siARN contrôle ou le siARN α_5 et pas à la surface de celles transfectées avec le siARN α_v . Ainsi, l'augmentation de la génération de thrombine à la surface des CML soumises à des déformations cycliques est due à l'augmentation de l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dont l'inhibition (par un peptide RGD ou un siARN α_v) a empêché l'augmentation de génération de thrombine résultante de soumettre les CML à des déformations cycliques.

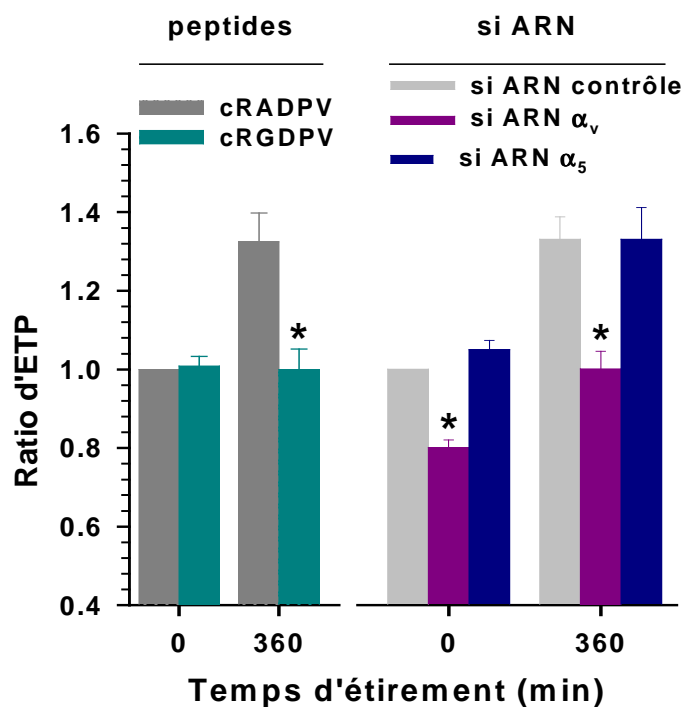


Figure 49 : Effet de l'inhibition de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (par un peptide RGD ou un siARN α_v) sur la génération de thrombine à la surface des CML soumises à des déformations cycliques. Les résultats sont exprimés en ratio d' (ETP avec étirement/ETP sans étirement) et présentés sous la forme de moyennes \pm SEM (n=3) obtenues avec des CML soumises à des déformations cycliques pour 360 min.* $p < 0,05$ versus CML incubées avec le peptide cRADPV ou le si ARN contrôle.

4.4 Génération et inhibition de la thrombine à la surface des plaquettes, des cellules endothéliales, et des cellules musculaires lisses humaines

4.4.1 Thrombinographie réalisée avec les trois types cellulaires (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses aortiques humaines adhérentes et plaquettes humaines en suspension)

Les thrombinogrammes obtenus avec les trois types cellulaires sont présentés dans la **Figure 50** et les paramètres thrombinographiques de ces courbes sont montrés dans le **Tableau VIII**. Nous avons observé des valeurs similaires d'ETP et de pic de thrombine avec les cellules vasculaires (CE et CML) mais significativement moins élevées que celles obtenues avec les plaquettes. Le temps de latence et le temps au pic étaient significativement différents entre les trois types cellulaires avec un ordre de grandeur croissant : CML, CE et plaquettes.

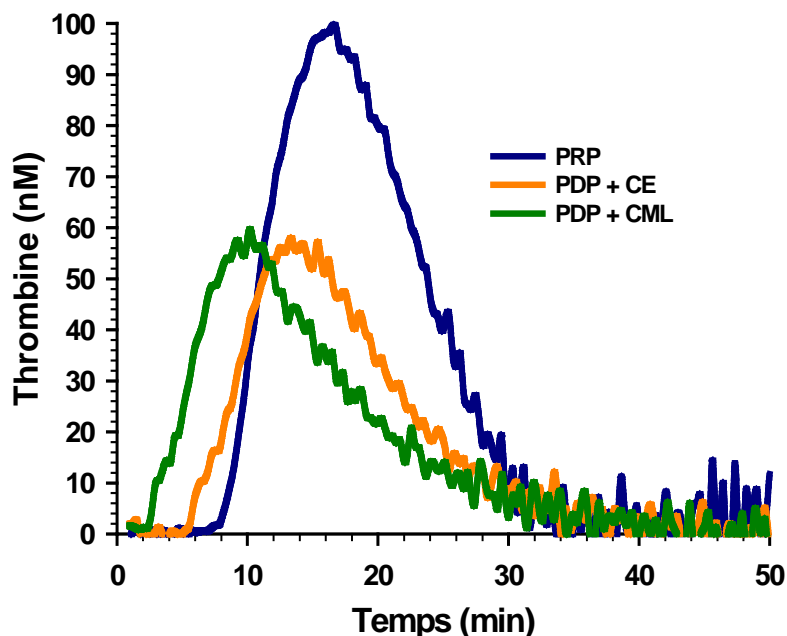


Figure 50 : Génération de thrombine à la surface des CE, CML adhérentes et plaquettes humaines en suspension. Les courbes représentent les thrombinogrammes obtenus avec des CE, CML aortiques humaines adhérentes (de nombre de 15000 cellules) en présence de PDP et de FT à 0,5 pM et avec de plaquettes humaines contenues dans un PRP humain (ajustées à 150 G/L) en présence de FT à 0,5 pM.

	PDP + CE	PDP + CML	PRP
ETP (nM.min)	832 ± 47*	828 ± 45*	1561 ± 20
Temps de latence (min)	5,5 ± 0,2*	3,1 ± 0,3* [#]	10,2 ± 0,3
Pic (nM)	59 ± 4,0*	61 ± 4,0*	101 ± 3,0
Temps au pic (min)	12,8 ± 0,4*	9,5 ± 0,4* [#]	18,9 ± 0,5
Vélocité (nM/min)	8,6 ± 0,8*	9,1 ± 0,7*	12,2 ± 0,4

Tableau VIII : Paramètres des thrombinogrammes obtenus à la surface des plaquettes, CE et CML humaines. Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM (n=12 expériences au moins réalisées en triple). * $p < 0,05$ versus PRP, [#] $p < 0,05$ versus CE.

4.4.2 Caractérisation des propriétés pro- et anti- coagulantes des plaquettes, des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses

4.4.2.1 Rôle des phospholipides anioniques exposés à la surface membranaire

Nous avons d'abord confirmé, en thrombinographie, le rôle des phospholipides anioniques sur la génération de thrombine en utilisant des VP synthétiques à composition moléculaire définie (PC/PSer/PE : 60/20/20 mole%). Nous avons obtenu une augmentation de l'ETP dépendante des concentrations des VP ((**Figure 51**). Cette augmentation des valeurs d'ETP en fonction des concentrations de VP n'est pas linéaire et évolue selon une équation fonction exponentielle éteignant le plateau pour une concentration de 4 µM de VP.

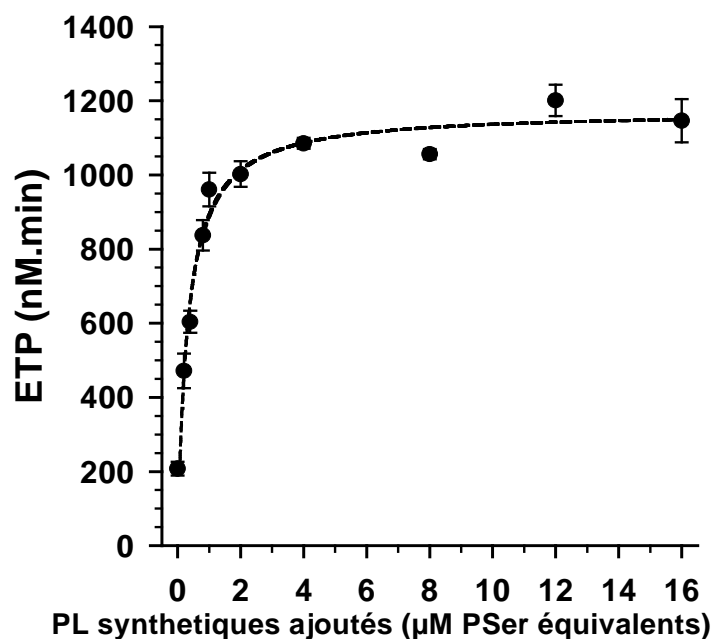


Figure 51 : Travail thrombinique à la surface des VP synthétiques (PC/PSer/PE : 60/20/20 mole%) en fonction de leur concentration finale en thrombinographie. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes d'ETP \pm SEM (n=4).

Ensuite, nous avons mesuré l'activité PPA à la surface des CE, CML adhérentes (15000 cellules/puits) et à la surface des plaquettes d'un PRP humain ajusté à 150 G/L. Nous avons trouvé des valeurs similaires d'activité PPA pour les CE et CML mais significativement beaucoup plus importantes que celle observée avec le PRP humain (**Figure 52**).

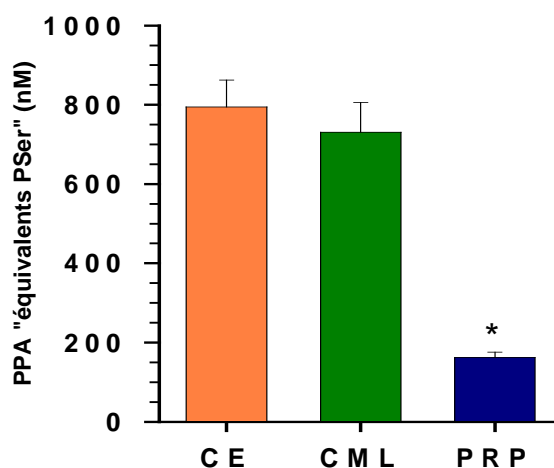


Figure 52 : Mesure de l'activité PPA à la surface des CE, CML aortiques humaines adhérentes et des plaquettes humaines en suspension. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes d'équivalents PSer \pm SEM (n=64 puits des CE ou CML répartis sur 4 plaques différentes «pour 15000 cellules/puits» et n=3 donneurs différents «étudiés à 3 reprises différentes» pour le PRP). * $p < 0,05$ versus CE et CML.

Nous avons ensuite recherché si les premières traces de thrombine formées lors de la génération de thrombine à la surface des cellules pourraient favoriser l'externalisation des PSer des feuillettes internes aux feuillettes externes de la membrane cellulaire. Pour répondre à cette question, nous avons comparé la capacité de la thrombine à activer ces trois types cellulaires. Cette comparaison sera détaillée dans le paragraphe **4.4.3.2.1.1**.

4.4.2.2 Activité du facteur tissulaire exprimée à la surface des cellules endothéliales et cellules musculaires lisses humaines adhérentes

Sans ajout de FT exogène, nous avons trouvé des valeurs d'ETP pour les CE (703 ± 34 nM.min) similaires de celles des CML (694 ± 18 nM.min). Toutefois, le temps de latence pour les CE ($8,2 \pm 0,6$ min) est significativement plus long que pour les CML ($3,9 \pm 0,5$ min). Nous avons mesuré l'activité du FT exprimée par ces cellules adhérentes dans leurs plaques de culture de 96 puits après les avoir lavées deux fois avec 200 μ L de l'HBS. Cette mesure a reposé sur le dosage de la quantité du facteur Xa générée par l'incubation du FVIIa et du FX humains (ajoutés en excès) avec les CE et CML adhérentes. Nous avons observé que les CML expriment une activité FT 30 fois plus importante que celle exprimée par les CE (**Figure 53**). Nous n'avons pas mesuré l'activité FT à la surface des plaquettes car il a été montré que les plaquettes non activées ne peuvent pas exprimer une activité FT (235). De plus, c'était difficile d'obtenir des plaquettes lavées non activées pour mesurer l'activité FT.

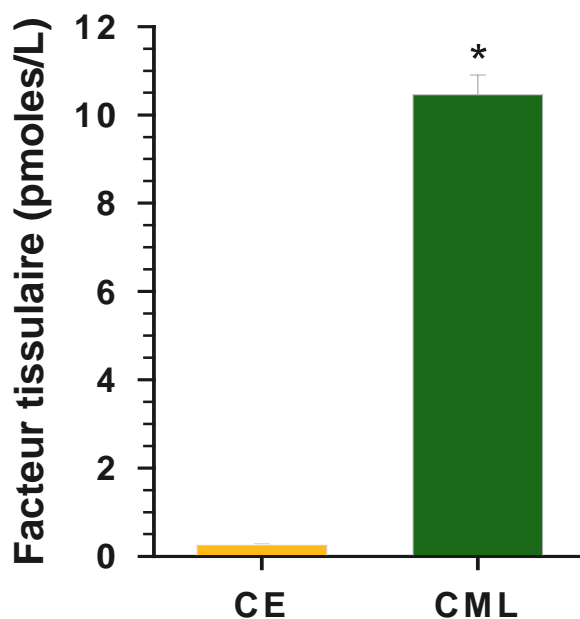


Figure 53 : Mesure de l'activité du FT à la surface des CE et CML aortiques humaines. Les résultats sont exprimés en concentration moyenne en FT (pM) \pm SEM (n=32 puits pour CE ou CML répartis sur 2 plaques différentes «pour 15000 cellules/puits»). * $p < 0,05$ versus CE.

Parmi les trois types cellulaires, les CML expriment le plus d'activité FT (12,5 pM). En faisant l'hypothèse que les plaquettes expriment 0 pM de FT endogène, nous avons ajusté la concentration en FT à 12,5 pM (exogène + endogène) pour les trois types cellulaires. Pour cela, la thrombinographie a été réalisée en ajoutant 12,5 pM de FT avec les plaquettes et les CE et 0 pM de FT avec les CML). En présence de FT ajusté à 12,5 pM avec les trois types cellulaires, le travail thrombinique obtenu à la surface des CE devient plus important que celui obtenu à la surface des CML mais reste supérieur à la surface des plaquettes (**Figure 54**).

Les autres paramètres thrombinographiques obtenus à la surface des trois types cellulaires sont montrés dans le **Tableau VIII**. De manière similaire au travail thrombinique, en présence de quantités égales de FT, la valeur de pic de thrombine obtenue avec les CE est significativement plus élevée que celle obtenue avec les CML et reste supérieure avec les plaquettes par rapport aux CE et CML. De plus, le temps de latence et le temps au pic deviennent similaires avec les CE et CML en présence de quantité égale de FT, mais restent plus courts qu'avec les plaquettes (**Tableau IX**). La vélocité est similaire avec les trois types cellulaires en présence de FT ajusté à 12,5 pM.

	PDP + CE		PDP + CML		PRP	
	FT ajouté à 0,5 pM	FT ajusté à 12,5 pM	FT ajouté à 0,5 pM	FT ajusté à 12,5 pM	FT ajouté à 0,5 pM	FT ajusté à 12,5 pM
ETP (nM×min)	831,0 ± 47,0*	1343,0 ± 48*	827,0 ± 45,0*	828,0 ± 45,0*#	1561,0 ± 20,0	1847,0 ± 73,0
Temps de latence (min)	5,5 ± 0,2 [†]	2,4 ± 0,3*	3,4 ± 0,5*#	2,3 ± 0,2*	8,9 ± 0,1	3,9 ± 0,2
Pic (nM)	58,5 ± 2,5 [†]	94,7 ± 3,5*	59,7 ± 6,3 [†]	74,2 ± 2,8*#	86 ± 3,6	131 ± 4,9
Temps au pic (min)	13,0 ± 0,3 [†]	8,5 ± 0,4*	9,7 ± 0,9*#	8,1 ± 0,4*	16,7 ± 0,6	13,7 ± 0,2
Vélocité (nM/min)	8,6 ± 0,8*	15,5 ± 0,7*	9,1 ± 0,7*	13,5 ± 1,1	11,2 ± 0,8	14,1 ± 0,7

Tableau IX : Paramètres des thrombinogrammes obtenus à la surface des plaquettes humaines, CE ou CML aortiques humaines en présence de FT ajouté à 0,5 pM et ajusté (exprimé +ajouté) à une concentration finale de 12,5 pM. Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM (n=9 expériences indépendantes réalisées en triple). * $p < 0,05$ versus plaquettes, # $p < 0,05$ versus CE.

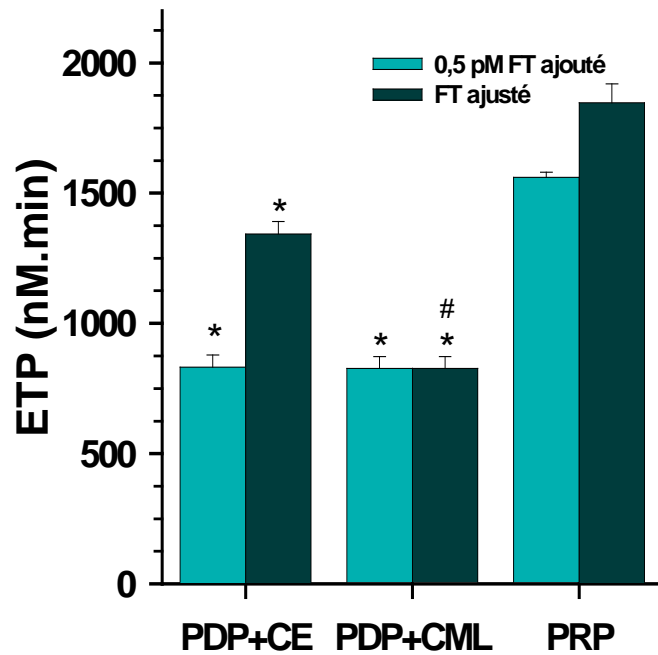


Figure 54 : Génération de thrombine à la surface des plaquettes humaines, CE ou CML aortiques humaines en présence de FT ajouté à 0,5 pM et ajusté (exprimé+ajouté) à une concentration finale de 12,5 pM. Les résultats sont exprimés en moyennes d'ETP \pm SEM (n=9 expériences indépendantes réalisées en triple). * $p < 0,05$ versus plaquettes, # $p < 0,05$ versus CE.

4.4.2.3 Rôle du TFPI exprimé à la surface des cellules endothéliales et cellules musculaires lisses adhérentes dans l'inhibition de la génération de thrombine

Il est établi que le TFPI (l'inhibiteur de la voie du FT) est exprimé par les CE, et les CML. Pour cette raison, nous avons étudié le rôle anticoagulant possible du TFPI cellulaire dans le processus de génération de thrombine à la surface de ces cellules.

Afin d'étudier l'implication du TFPI exprimé par les CE et CML dans l'inhibition de la génération de thrombine à la surface de ces cellules, nous avons incubé des CE et CML adhérentes avec un anticorps anti-TFPI inhibiteur du TFPI (anticorps monoclonal de souris anti-TFPI humain) à des concentrations différentes et du PDP déficient en TFPI pendant 30 min la thrombinographie. Le PDP déficient en TFPI est utilisé dans cette expérience pour éviter que l'anticorps reconnaisse le TFPI présent dans le plasma humain normal. La **Figure 55** montre l'impact de l'anticorps anti-TFPI sur le travail thrombinique effectué à la surface des CE et CML. L'anticorps augmente l'ETP significativement et de manière concentration-dépendante.

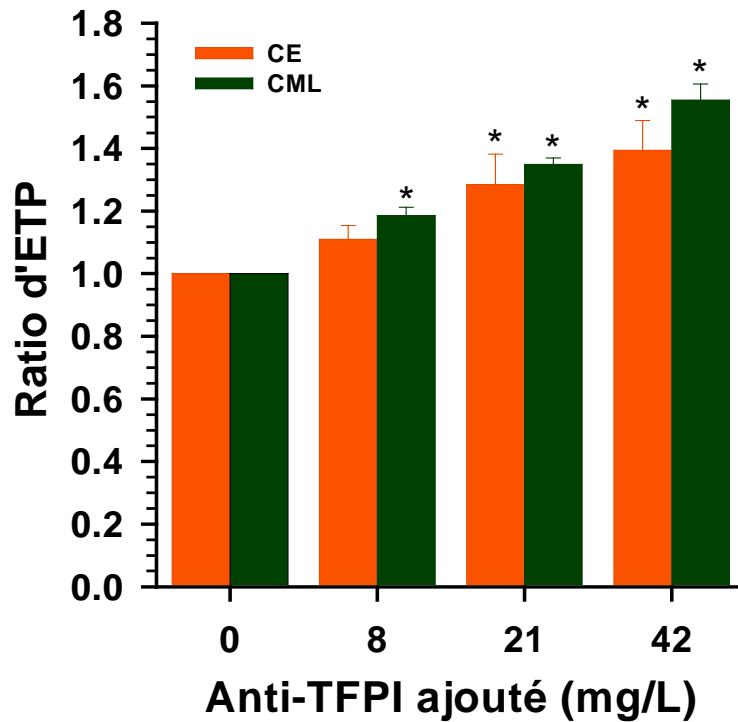


Figure 55 : Génération de thrombine à la surface des CE ou CML aortiques humaines en présence de concentrations croissantes d'anticorps anti-TFPI. Les cellules ont été incubées avec l'anticorps dans un PDP déficient en TFPI. Les résultats sont exprimés en ratios d' (ETP en présence d'anticorps anti-TFPI / ETP sans anticorps) et présentés sous forme de moyennes \pm SEM (n=3). * $p < 0,05$ versus CE, CML sans ajout d'anticorps anti-TFPI.

Le **Tableau X** montre les paramètres thrombinographiques obtenus avec les CE et les CML en présence de concentrations différentes en anticorps anti-TFPI. Non seulement le travail thrombinique augmente en présence d'anticorps anti-TFPI de façon concentration-dépendante, mais l'anticorps induit également un raccourcissement du temps de latence et du temps au pic avec les deux types cellulaires. Pour le pic de génération de thrombine, il n'est affecté qu'avec les CML en présence de la concentration de l'anticorps la plus élevée. De plus, aucune modification n'est observée sur la vélocité avec les deux types cellulaires.

	PDP+CE				PDP+CML			
	sans anti-TFPI	anti-TFPI à 8 mg/L	anti-TFPI à 21 mg/L	anti-TFPI à 42 mg/L	sans anti-TFPI	anti-TFPI à 8 mg/L	anti-TFPI à 21 mg/L	anti-TFPI à 42 mg/L
ETP (nM.min)	605,0±22,0	663,0 ± 33,0	756,0 ± 28,0*	836,0 ± 42,0*	765,0 ± 52,0	910,0 ± 36,0*	1087,0 ± 21,0*	1195,0 ± 24*
Temps de latence (min)	4,3 ± 0,5	3,2 ± 0,1*	3 ± 0,6*	1,9 ± 0,4*	3,2 ± 0,2*	2,1 ± 0,6*	1,9 ± 0,4*	1,4 ± 0,3*
Pic (nM)	50 ± 2,4	47 ± 3,1	44 ± 2,1	46 ± 5,2	58 ± 3,2	68 ± 4,1	69 ± 5,2	77 ± 4,8*
Temps au pic (min)	8,8 ± 0,3	8,3 ± 0,4	7,6 ± 0,3*	6,7 ± 0,1*	9,2 ± 0,2	6,7 ± 0,3*	8,3 ± 0,6*	7,6 ± 0,9*
Vélocité (nM/min)	5,9 ± 0,2	5,5 ± 0,1	5,6 ± 0,2	5,9 ± 0,7	9,7 ± 0,2	9,7 ± 0,4	10,7 ± 0,8	12,6 ± 0,6*

Tableau X : Paramètres des thrombinogrammes obtenus avec les CE et les CML aortiques humaines en présence de concentrations croissantes d'anticorps anti-TFPI. Les cellules ont été incubées avec l'anticorps dans un PDP déficient en TFPI. Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM (n=3). * $p < 0,05$ versus CE ou CML sans ajout d'anticorps anti-TFPI.

4.4.2.4 Rôle de la PCa formée à la surface des cellules endothéliales et cellules musculaires lisses dans l'inhibition de la thrombine générée à leur surface

Il est établi que les CE et CML expriment la TM et l'EPCR, deux protéines membranaires nécessaires pour accélérer l'activation de la protéine C par la thrombine pour former la PCa anticoagulante. Lors de l'incubation du plasma humain contenant la protéine C avec les CE ou CML, la protéine C plasmatique peut être activée.

Pour étudier le rôle de la PCa formée à la surface des cellules dans l'inhibition de la génération de thrombine en thrombinographie, nous avons inhibé sa formation en incubant les CE et les CML adhérentes avec un anticorps anti-TM (anticorps de chèvre anti-TM humaine) à des concentrations croissantes pendant 30 min avant l'expérience de

thrombinographie. Cette incubation augmente significativement et de manière concentration-dépendante le travail thrombinique obtenu avec les CE et les CML (**Figure 56**).

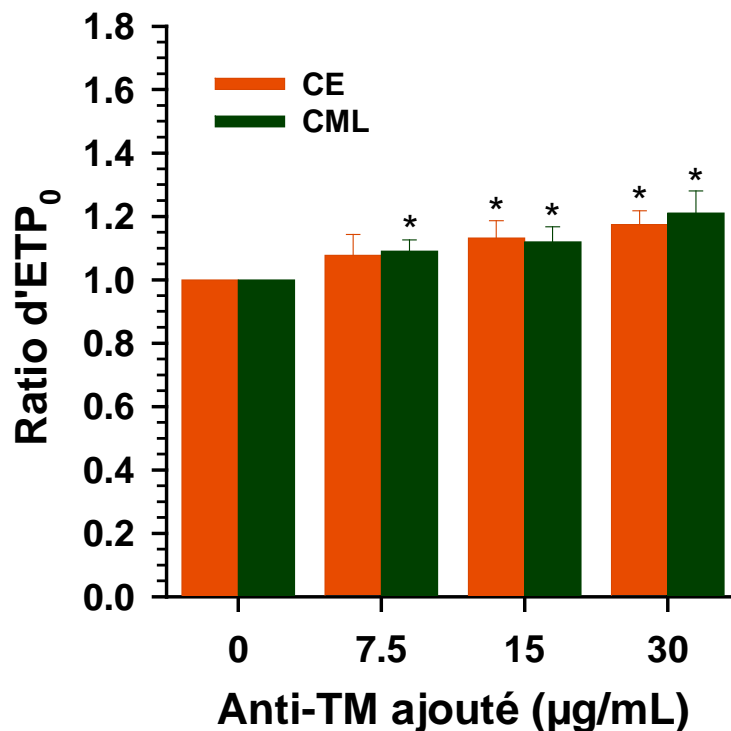


Figure 56 : Génération de thrombine à la surface des CE ou CML aortiques humaines en présence de concentrations croissantes d'anticorps anti-TM. Les résultats sont exprimés en ratio d' (ETP en présence d'anticorps anti-TFPI / ETP sans anticorps) et présentés sous forme de moyennes \pm SEM (n=4). * $p < 0,05$ versus CE, CML sans l'ajout de l'anti-TM.

Les paramètres thrombinographiques obtenus avec les CE et les CML en présence de concentrations croissantes d'un anticorps anti-TM sont montrés dans le **Tableau XI**. Nous avons remarqué une augmentation des valeurs d'ETP en présence de l'anticorps de façon concentration-dépendante. Cependant, l'augmentation des valeurs d'ETP dans le tableau n'est pas significative comme le montre le ratio présenté dans la **Figure 56**. Cela peut être dû à la variation entre les valeurs d'ETP entre les expériences. Toutefois, les autres paramètres thrombinographiques ne sont pas modifiés (**Tableau XI**).

	PDP+CE				PDP+CML			
	sans anti-TM	anti-TM à 7,5 µg/mL	anti-TM à 15 µg/mL	anti-TM à 30 µg/mL	sans anti-TM	anti-TM à 7,5 µg/mL	anti-TM à 15 µg/mL	anti-TM à 30 µg/mL
ETP (nM.min)	505,0 ± 24,0	613,0 ± 76,0	621,0 ± 87,0	668,0 ± 89,0	691,0 ± 79,0	757,0 ± 88,0	762,0 ± 84,0	768,0 ± 78,0
Temps de latence (min)	13,5 ± 0,5	13,6 ± 0,7	13,9 ± 0,4	13,3 ± 0,2	2,3 ± 0,4	2,2 ± 0,3	2,2 ± 0,1	2,3 ± 0,5
Pic (nM)	31 ± 3,1	35 ± 2,4	33 ± 5,6	38 ± 7,2	64 ± 3,2	67 ± 5,1	65 ± 6,9	64 ± 4,8
Temps au pic (min)	23,0 ± 0,1	23,4 ± 1,0	24,5 ± 1,1	22,9 ± 0,8	7,1 ± 0,6	7,4 ± 0,4	7,6 ± 0,9	7,7 ± 0,8
Vélocité (nM/min)	3,3 ± 0,6	3,8 ± 0,7	3,2 ± 0,8	4,2 ± 0,9	13,9 ± 0,2	13,5 ± 0,4	12,5 ± 0,4	12,5 ± 0,8

Tableau XI : Paramètres des thrombinogrammes obtenus avec les CE et les CML aortiques humaines en présence de concentrations croissantes d'anticorps anti-TM. Les cellules ont été incubées avec l'anticorps dans un PDP humain. Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM (n=4).

4.4.3 Etude de la sensibilité des trois types cellulaires (plaquettes, cellules endothéliales, et cellules musculaires lisses humaines) à la PCa exogène

Il a été établi que la sensibilité à la PCa est un paramètre important dans la détermination du travail thrombinique total obtenu à une surface cellulaire. Pour cela, et dans l'objectif de caractériser les propriétés anticoagulantes des trois types cellulaires utilisées dans cette étude (plaquettes humaines, CE et CML aortiques humaines), nous avons comparé, en thrombinographie, la sensibilité des trois types cellulaires à la PCa ajoutée à différentes concentrations. Ensuite, nous avons essayé d'étudier les mécanismes impliqués pour expliquer la différence de sensibilité à la PCa obtenue entre les CE et CML.

4.4.3.1 Comparaison, en thrombinographie, de la sensibilité à la PCa à la surface des cellules endothéliales, et cellules musculaires lisses et plaquettes

Les courbes d'inhibition des valeurs d'ETP obtenues avec les trois types cellulaires (**Figure 57**) démontrent qu'avec les trois types cellulaires, la génération de thrombine a été inhibée de façon concentration-dépendante en présence de concentrations croissantes de la PCa. Cependant, ces courbes d'inhibition des valeurs d'ETP en fonction des concentrations de la PCa étaient différentes entre les trois types cellulaires. Ainsi, les trois types cellulaires servent de support non seulement pour la génération, mais aussi pour l'inhibition de la thrombine par la PCa.

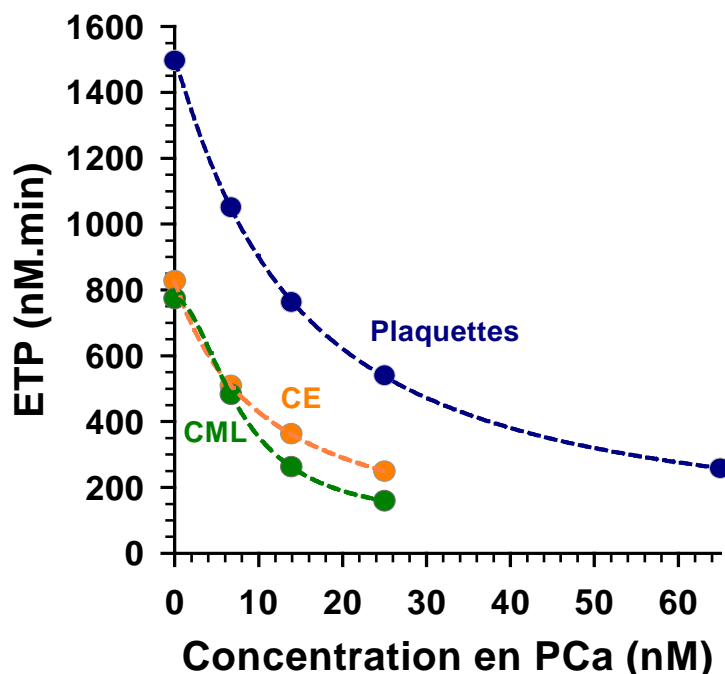


Figure 57 : Courbes d'inhibition du travail thrombinique à la surface des plaquettes, CE ou CML humaines en présence de concentrations croissantes en PCa exogène

Nous avons évalué la sensibilité à la PCa en calculant la valeur de l'IC₅₀-PCa, qui représente la concentration en PCa nécessaire pour réduire la valeur de l'ETP₀ (sans l'ajout de PCa) de 50%. Plus cette valeur est élevée, plus la sensibilité à la PCa est faible. La **Figure 58** montre que les valeurs d'IC₅₀-PCa obtenues avec les trois types cellulaires, sont significativement différentes ; inférieure avec les CML et supérieure avec sur les plaquettes, c'est à dire que les

CML représentent les surfaces cellulaires les plus sensibles à la PCa et les plaquettes les surfaces les moins sensibles.

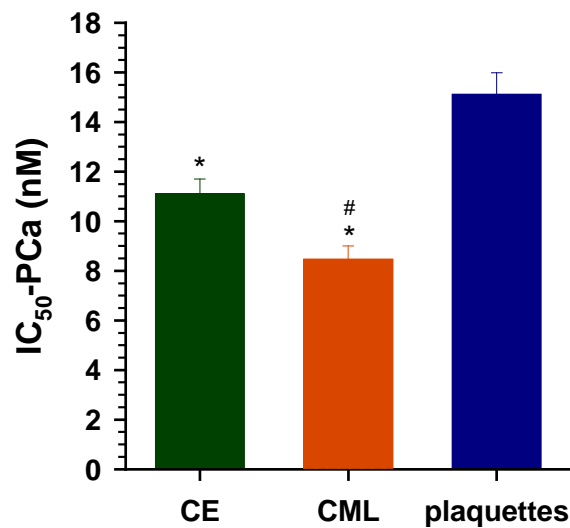


Figure 58 : Sensibilité à la PCa exogène à la surface des plaquettes, CE ou CML aortiques humaines. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes d'IC₅₀-PCa ± SEM calculées à partir des courbes d'inhibition de la génération de thrombine par des concentrations croissantes en PCa (n=9 expériences réalisées en triple). **p*<0,05 versus plaquettes, # *p*<0,05 versus CE.

La thrombogénicité se détermine non seulement par les propriétés procoagulantes, mais aussi par les propriétés anticoagulantes. Pour cela, nous avons comparé la thrombogénicité des trois types cellulaires en prenant deux paramètres : un qui reflète l'activité procoagulante sans PCa exogène (ETP₀), et l'autre qui reflète la sensibilité à la PCa comme une propriété anticoagulante.

Ainsi, en prenant un paramètre qui combine les deux valeurs : ETP₀ × IC₅₀-PCa, nous pouvons observer que ces trois paramètres sont différents entre les trois types cellulaires. Donc, nous pouvons dire que les plaquettes représentent les surfaces cellulaires les plus thrombogènes et les CML les moins thrombogènes (**Tableau XII**).

	PRP	PDP + CE	PDP + CML
ETP₀ (nM.min)	1561 ± 20	832 ± 47*	828 ± 45*
IC₅₀-PCa (nM)	15,1 ± 0.9	11,1 ± 0,6*	8,5 ± 0,5* #
ETP₀ x IC₅₀-PCa (nM.min.nM)	23662 ± 1487	9446 ± 652*	7135 ± 777* #

Tableau XII : Thrombogénicité des plaquettes, CE et CML aortiques humaines. Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM (n=9 expériences réalisées en triple). * $p < 0,05$ versus plaquettes, # $p < 0,05$ versus CE.

4.4.3.2 Mécanismes impliqués dans les propriétés pro-et anti-coagulantes des cellules endothéliales, et cellules musculaires lisses et plaquettes humaines

4.4.3.2.1 Propriétés pro-coagulantes

Nous avons voulu expliquer les données thrombinographiques obtenues avec les trois types cellulaires (CE, CML et plaquettes humaines) obtenues en présence de FT à 0,5 pM montrées dans le **Tableau VIII**. Nous avons proposé un rôle possible des premières traces de thrombine formées qui pourraient activer les trois types cellulaires de manière différente aboutissant à l'externalisation de P_{Ser} à leurs surfaces et/ou une microvésiculation cellulaire participant ainsi à la génération explosive de thrombine à la surface de ces cellules. Pour cela, nous avons activé les CE, ou les CML adhérentes, ou les plaquettes lavées ajustées à 150 G/L avec 10 nM de thrombine à 37°C pendant 15 min. Nous avons récupéré les milieux réactionnels, et puis, ils ont été centrifugés pour éliminer les cellules, et le culot a été lavé (remis en suspension + centrifugé) à plusieurs reprises par HBS avant d'être suspendu dans 1 mL d'HBS. Ensuite, nous avons évalué la capacité de la thrombine à activer et à microvésiculer les trois types cellulaires par :

- L'activité PPA à la surface des CE et CML adhérentes (dans des puits d'une plaque de 96 puits) activées par la thrombine.
- L'activité PPA dans les culots récupérés après les incubations des CE, CML et plaquettes avec la thrombine et contenant des MP-CE, MP-CML et MP plaquettaires respectivement.

- La quantification des MP formées avec les trois types cellulaires en cytométrie en flux.

4.4.3.2.1.1 Mesure de l'activité PPA à la surface des cellules endothéliales, et cellules musculaires lisses activées par la thrombine

Des CE et CML adhérentes et confluentes ont été mises dans un milieu de culture sans sérum et facteurs de croissance pendant 24 heures. Le milieu a été changé en y ajoutant la thrombine (ou non pour les puits contrôles) à 10 nM. Après une incubation de 15 min à 37°C, les cellules ont été lavées deux fois avec la solution tamponnée de PPA. Nous avons exprimé les résultats en ratio : équivalents P_{Ser} avec les cellules incubées avec la thrombine / équivalents P_{Ser} avec les cellules non incubées avec la thrombine. Nous avons remarqué que ce ratio est proche d'une valeur de 1 pour les deux types cellulaires, ce qui montre que l'activité PPA n'est pas augmentée à leur surface suite à leur incubation avec la thrombine (**Figure 59**).

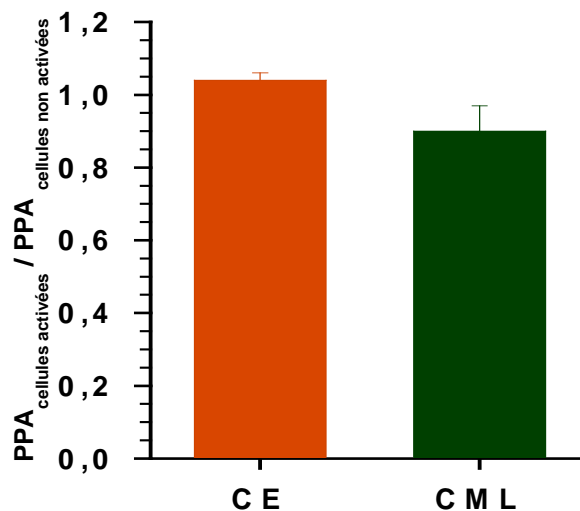


Figure 59 : Mesure de l'activité PPA à la surface des CE ou CML adhérentes incubées avec 10 nM de thrombine pendant 15 min à 37°C. Les résultats sont exprimés en ratio d' (équivalents P_{Ser} pour les cellules incubées avec la thrombine / équivalents P_{Ser} pour les cellules non incubées avec la thrombine) et sont présentés sous formes de moyennes ± SEM (n=48 puits de CE et CML répartis sur 2 plaques différentes).

4.4.3.2.1.2 Mesure de l'activité PPA dans les culots récupérés après l'incubation des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses et des plaquettes avec la thrombine, contenant des MP-CE, MP-CML et MP plaquettaires respectivement

L'activité PPA a été mesurée dans les culots resuspendus avec de l'HBS (contenant des MP) préparé à partir des CE, CML adhérentes (dans des plaques de cultures à 75 cm²) et à partir des plaquettes lavées ajustées à 150 G/L, incubées ou non (pour les contrôles) avec 10 nM de thrombine après plusieurs étapes de centrifugation (pour éliminer les cellules) et lavage avec l'HBS. Les résultats ont été exprimés en ratio : équivalents PSer dans le culot résultant des cellules incubées avec la thrombine / équivalents PSer dans le culot des cellules non incubées avec la thrombine. Nous avons constaté que l'activité PPA augmente d'un facteur de 9,5 avec le culot résultant des plaquettes et contenant des MP plaquettaires (significative versus les valeurs obtenus avec les culots résultants des CE ou CML et contenant des MP-CE ou MP-CML respectivement). Pour les culots résultant des CE et CML incubées avec la thrombine, nous avons observé une augmentation significative de ce ratio (versus une valeur égale à 1) indiquant une augmentation de l'activité PPA dans le culot des cellules incubées avec la thrombine. De plus, cette augmentation était significativement plus élevée pour les CE que pour les CML (**Figure 60**).

Ce résultat indique qu'une formation de MP (exprimant la PSer) beaucoup plus importante est survenue avec les plaquettes lors de leur incubation par la thrombine que celle survenue avec les CE et les CML (**Figure 60**).

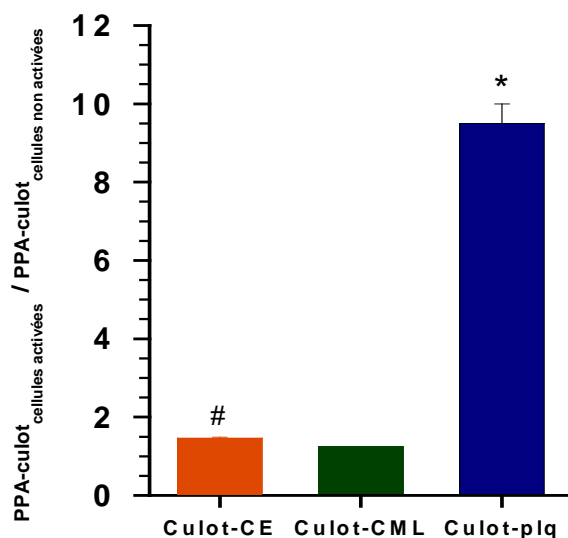


Figure 60 : Mesure de l'activité PPA dans les culots récupérés des CE, CML ou plaquettes incubées avec 10 nM de thrombine pendant 15 min à 37°C et contenant des MP-CE, MP-CML et MP plaquettaires respectivement. Les résultats sont exprimés en ratio d' (équivalents PSer dans le culot des cellules incubées avec la thrombine / équivalents PSer dans le culot des cellules non incubées avec la thrombine) et présentés sous forme de moyennes \pm SEM (n=4 boîtes de culture différentes de CE ou CML et n=3 donneurs différents «étudiés à 3 reprises différentes » pour le PRP). * p <0,05 versus CE et CML, # p <0,05 versus CML.

4.4.3.2.1.3 Quantification en cytométrie en flux des MP formées par les trois types cellulaires activés par la thrombine

Nous avons confirmé les résultats obtenus en PPA avec ceux obtenus en cytométrie en flux quantifiant les MP contenues dans les culots récupérés après l'incubation des trois types cellulaires avec la thrombine. La sélection d'événements en cytométrie en flux se fait sur la taille. Les résultats ont été exprimés en ratio : nombre des événements comptés dans le culot récupéré des cellules incubées avec la thrombine / nombre des événements comptés dans le culot récupéré des cellules non incubées avec la thrombine. Le ratio dans le culot récupéré des plaquettes (et contenant des MP plaquettaires) est élevé d'un facteur équivalent à celui observé pour l'activité PPA (9,45) et ce nombre des événements dans le culot récupéré des plaquettes est significativement supérieur à celui obtenu dans le culot récupéré des CE et CML pour lesquels le ratio n'est pas différent de de 1 (**Figure 61**).

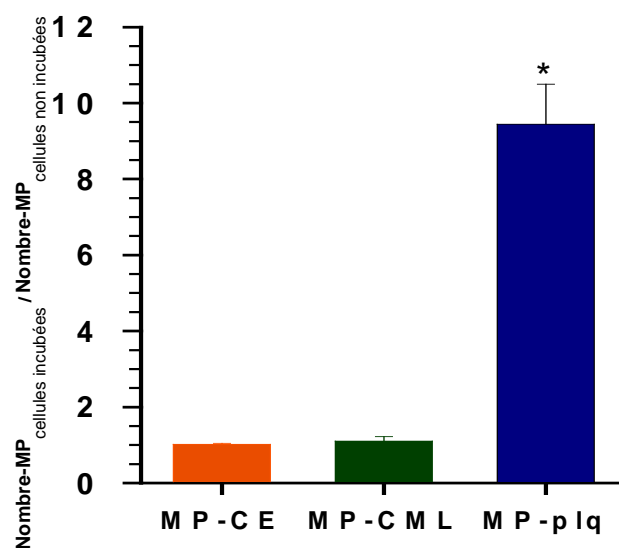


Figure 61 : Quantification en cytométrie en flux de MP-CE, MP-CML ou MP plaquettaires (MP-Plq) obtenues en incubant les cellules avec 10 nM de thrombine pendant 15 min à 37°C. Les résultats sont exprimés en ratio de (nombre des MP dans le culot récupéré des cellules incubées avec la thrombine / nombre des MP dans le culot récupéré des cellules non incubées avec la thrombine \pm SEM (n=4 boîtes différentes de CE ou CML et n=3 donneurs différents « étudiés à 3 reprises différentes » pour le PRP). * $p < 0,05$ versus CE et CML.

Ainsi, même si la valeur de PPA dans le PRP (contenant des plaquettes non activées) est beaucoup moins importante que celle obtenue avec les CE et les CML à l'état de base (**Figure 52**), la formation de premières traces de thrombine, en thrombinographie, serait probablement capable d'augmenter l'activité PPA à la surface des trois types cellulaires. Cette augmentation d'activité PPA est beaucoup plus importante avec les plaquettes qu'avec les CE et les CML.

4.4.3.2 Propriétés anti-coagulantes associées aux cellules endothéliales et cellules musculaires lisses vasculaires

4.4.3.2.1 Formation de la PCa à la surface des cellules endothéliales et cellules musculaires lisses

Comme les CE et CML expriment la TM et l'EPCR, deux protéines membranaires nécessaires pour accélérer l'activation de la protéine C, donc, la PCa peut se former à la surface de ces cellules dans un milieu contenant la protéine C. En thrombinographie réalisée en présence de CE et CML, la PCa se forme à la surface de ces cellules (PCa endogène) suite à l'activation de la protéine C plasmatique. Nous avons montré un rôle de cette PCa endogène

formée à la surface des CE et CML dans l'inhibition de la génération de thrombine (**Figure 56**) où l'ajout d'un anticorps anti-TM a augmenté le travail thrombinique réalisé à la surface de ces cellules de façon concentration-dépendante. Nous avons également montré que les CML sont plus sensibles à la PCa ajoutée (exogène) en thrombinographie. Cet effet de la PCa endogène peut s'ajouter à la PCa exogène, participant peut-être, en partie, à expliquer la différence de sensibilité à la PCa entre les CE et les CML.

Dans un système purifié, nous avons étudié la cinétique de formation de la PCa à la surface des CE et CML en fonction du temps (en présence de concentrations fixes de la thrombine et la protéine C). De plus, nous avons également étudié la formation de la PCa à la surface des CE et CML en fonction de concentration de thrombine (en présence d'une concentration fixe de la protéine C et de concentrations croissantes de la thrombine).

➤ **Cinétique de formation de la PCa (endogène) à la surface des cellules endothéliales et cellules musculaires lisses**

Nous avons obtenu des courbes identiques de cinétique de la PCa formée en fonction du temps à la surface des CE et CML (**Figure 62**) où le maximum de formation de la PCa formée survient dès la deuxième minute d'incubation).

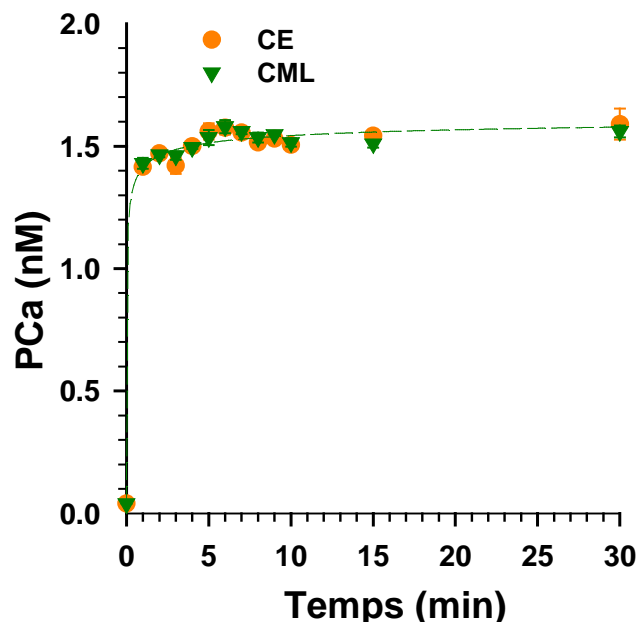


Figure 62 : Cinétique de la conversion de la protéine C en PCa à la surface des CE ou CML humaines dans un système purifié en fonction du temps. Les cellules adhérentes ont été incubées avec la thrombine (40 nM) et la protéine C (65 nM) pour différents temps. Les résultats sont exprimés en concentration en PCa \pm SEM (n=3 expériences réalisées en double).

➤ **Formation de la PCa (endogène) à la surface des cellules endothéliales et cellules musculaires lisses en fonction des concentrations de thrombine**

Nous avons effectué la même procédure mais en incubant les CE, et CML adhérentes avec la protéine C et la thrombine (à différentes concentrations : de 0 à 40 nM) pendant une heure avant de bloquer la thrombine par l'hirudine.

La **Figure 63** montre des cinétiques similaires de la conversion de la protéine C en PCa à la surface des CE et CML humaines adhérentes en présence de concentrations croissantes de thrombine.

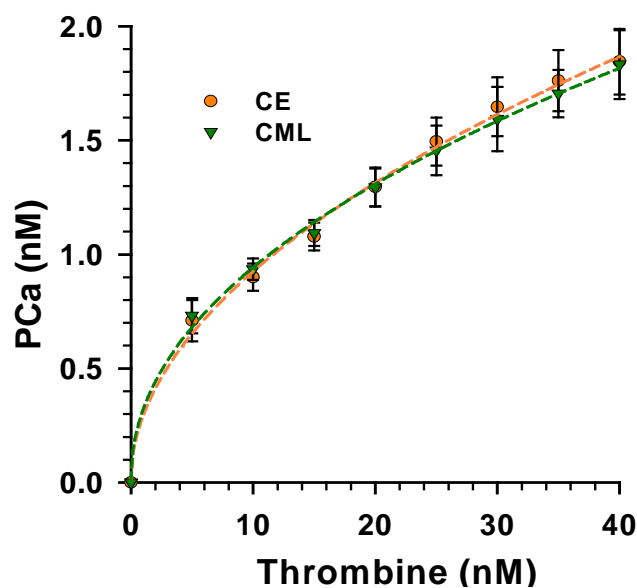


Figure 63 : Formation de la PCa à la surface des CE ou CML aortiques humaines dans un système purifié en fonction de la concentration en thrombine. Les résultats sont exprimés en concentration de la PCa \pm SEM formée à la surface des cellules en présence de la protéine C à 65 nM et de thrombine à des concentrations croissantes (de 0 à 40 nM) après incubation à 37°C pendant une heure (n=3 expériences réalisées en double).

Dans ces expériences, les CE et CML se comportent de façon identique au niveau de la formation de la PCa à leur surface dans un système purifié (en terme de la vitesse de formation et de quantité de PCa).

4.4.3.2.2 Cinétique d'inactivation du FVa par la PCa à la surface des cellules endothéliales et cellules musculaires lisses

Un autre mécanisme proposé pour expliquer le fait que les CML sont plus sensibles à la PCa que les CE en thrombinographie ; c'est une différence entre les surfaces phospholipidiques des deux types cellulaires, à servir de support pour que la PCa exerce son effet anticoagulant en inactivant les cofacteurs Va et VIIIa de la coagulation

Nous avons étudié la cinétique d'inactivation de FVa par la PCa à la surface des CE et CML dans un système purifié. Les expériences ont été réalisées sans ou avec PS qui joue le rôle de cofacteur de la PCa dans l'inactivation du FVa. La PS a été ajoutée aux cellules adhérentes à la concentration finale de 490 nM avec le FVa dans la première étape de l'expérience.

❖ Sans Protéine S

La comparaison entre les courbes d'inactivation du FVa par la PCa à la surface des CE et CML adhérentes (**Figure 64**) montre une différence statistiquement significative entre les deux courbes où l'inactivation est plus importante à la surface des CE qu'à celle des CML. Ces résultats montrent que, dans un système purifié, les surfaces cellulaires se comportent de manière différente en terme de support pour l'effet anticoagulant de la PCa dans l'inactivation du FVa sans ajout de PS.

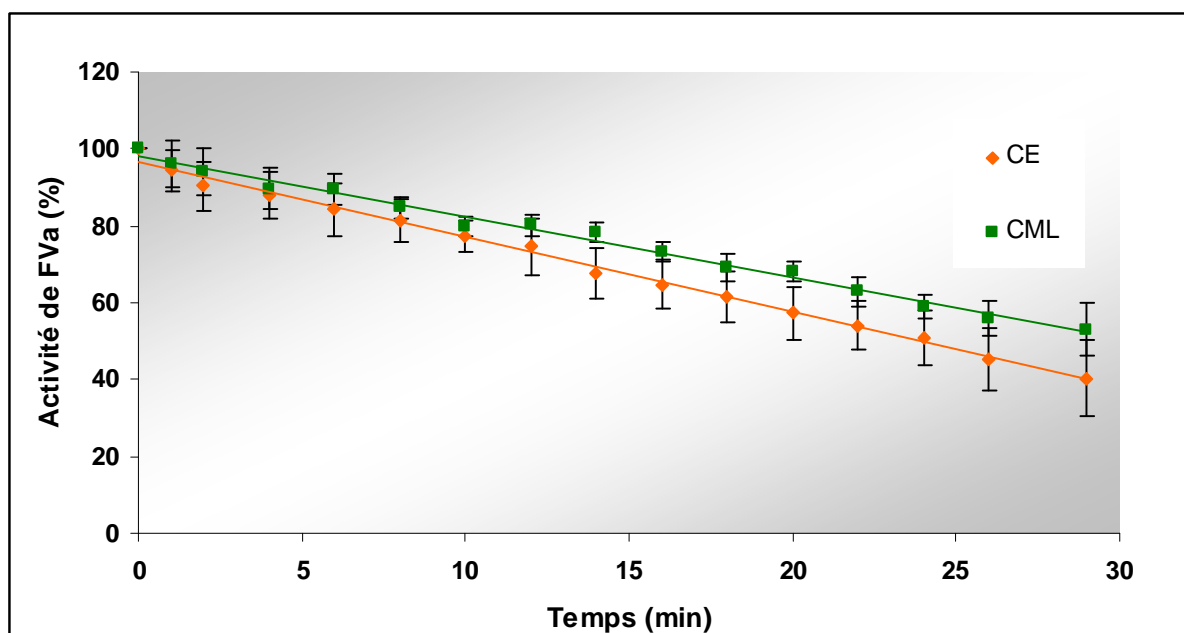


Figure 64 : Inactivation du FVa par la PCa en fonction du temps en présence des CE ou CML aortiques humaines adhérentes dans un système purifié. Les courbes obtenues à la surface des CE et des CML sont significativement différentes ($p < 0,026$) selon le test « ANOVA COVARIANCE ». Les résultats sont exprimés en activité FVa résiduelle \pm SEM en présence de PCa à 5 nM et de FVa à 1 nM sans ajout de PS (n=3).

❖ Avec Protéine S

La **Figure 65** montre la comparaison entre l'inactivation du FVa par la PCa en présence des CE, CML adhérentes (en présence de PS à 490 nM). Comme sans ajout de la PS, la comparaison statistique entre les deux courbes (à la surface des CE et CML) montre une différence significative indiquant que l'inactivation est plus efficace à la surface des CE qu'à celle des CML. Nous avons observé que l'ajout de PS n'a aucun effet sur la réaction d'inactivation de FVa par la PCa car aucune modification de la cinétique d'inactivation n'a été observée pour chaque type cellulaire en ajoutant la PS à la réaction. A 30 min du début de l'inactivation, nous avons obtenu des activités résiduelles de FVa similaires à celles obtenues sans PS.

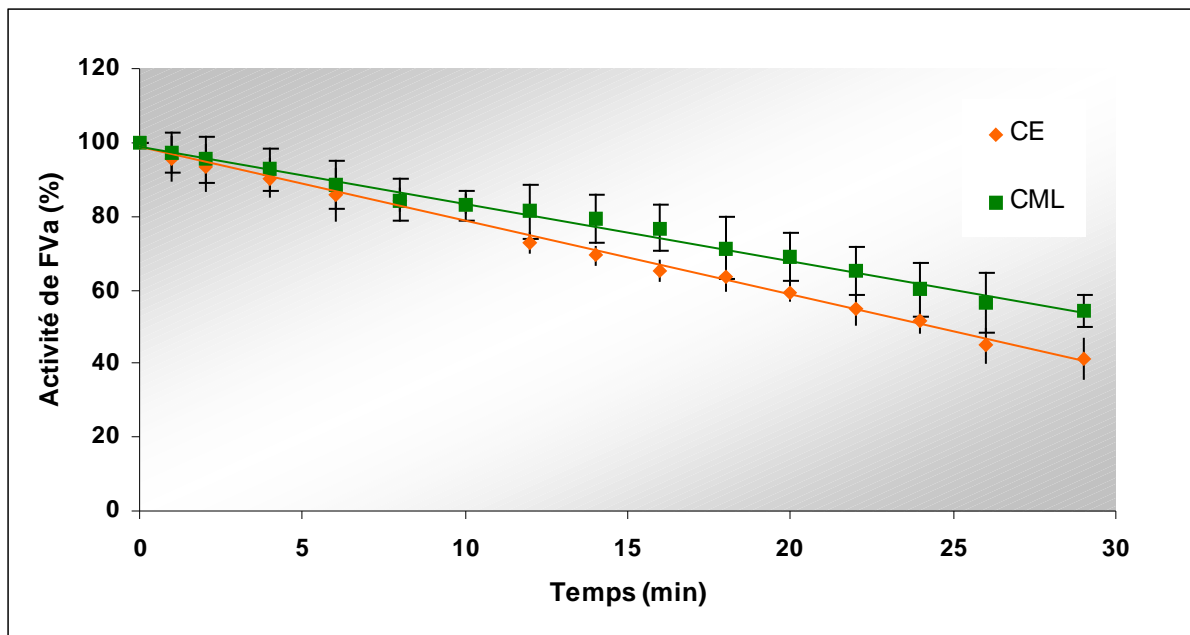


Figure 65 : Inactivation du FVa par la PCa en fonction du temps en présence de CE ou CML aortiques humaines adhérentes dans un système purifié. Les courbes obtenues à la surface des CE et des CML sont significativement différentes ($p < 0,026$) selon le test « ANOVA COVARIANCE ». Les résultats sont exprimés en activité FVa résiduelle \pm SEM en présence de PCa à 5 nM, le FVa à 1 nM et PS à 490 nM (n=3).

Au total, la sensibilité à la PCa exogène plus importante pour les CML que pour les CE observée en thrombinographie, ne peut pas être expliquée par la cinétique d'inactivation du FVa par la PCa. Dans un système purifié, cette inactivation du FVa par la PCa est plus efficace avec les CE qu'avec les CML. De plus, et inversement à ce qui a été établi par d'autres équipes avec les surfaces phospholipidiques synthétiques (172), la PS ajoutée à la réaction n'a pas d'effet accélérateur de la réaction d'inactivation.

4.4.3.2.3 Rôle de l'EPCR cellulaire exprimé à la surface des cellules endothéliales et cellules musculaires lisses dans la sensibilité de ces cellules à la PCa exogène

Nous avons quantifié par cytométrie en flux l'expression de l'EPCR à la surface des CE et CML (Figure 66). Nous avons observé des quantités similaires d'EPCR exprimé à la surface de ces cellules.

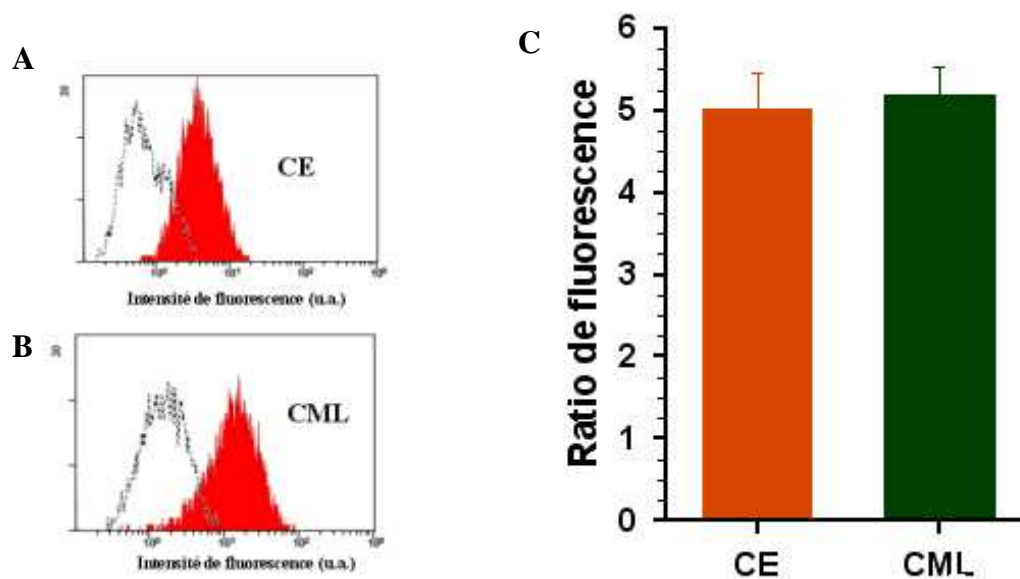


Figure 66 : Quantification par cytométrie en flux de l'expression de l'EPCR à la surface des CE et CML. A) CE, B) CML ; Blanc : contrôles (sans anticorps anti-EPCR primaire), rouge : EPCR. C) expression de l'EPCR à la surface des CE ou CML exprimée en ratio d' (intensité de fluorescence avec les cellules EPCR-positives/intensité de fluorescence en présence des cellules contrôles «sans anticorps anti-EPCR primaire») présentées sous la forme de moyennes \pm SEM (n=4).

Vue la propriété de l'EPCR à se lier à la PCa aussi qu'à la protéine C (236). Nous avons ensuite étudié l'effet d'une liaison possible entre la PCa exogène ajoutée en thrombinographie avec l'EPCR des CE et CML adhérentes sur la sensibilité de ces cellules à la PCa. Les cellules adhérentes ont été incubées avec un anticorps de rat anti-EPCR humain (inhibiteur) à 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. L'anticorps a été ajouté aux cellules adhérentes 30 min avant la thrombinographie. Compte tenu de la présence d'EPCR libre à faible concentration dans le plasma, nous avons utilisé de VP synthétiques comme contrôle ajusté à 1 μM en PPA (concentration équivalente de l'activité PPA à la surface des CE et CML adhérentes) incubées avec l'anticorps anti-EPCR dans les mêmes conditions que les cellules. L'utilisation des VP comme contrôle négatif, c'était pour bien vérifier que l'effet obtenu avec les cellules en thrombinographie est dû au blocage de la PCa par l'EPCR cellulaire et non pas par l'EPCR du plasma. Nous avons observé une diminution du ratio d' $\text{IC}_{50}\text{-PCa} : \text{IC}_{50}\text{-PCa}$ en présence de l'anti-EPCR / $\text{IC}_{50}\text{-PCa}$ sans ajout de l'anticorps anti-EPCR < 1 avec les CE et les CML et de manière significative par rapport aux VP (où le rapport est équivalent à 1). Cette diminution est du même ordre de grandeur à la surface des CE et CML et signifie que la sensibilité à la PCa est augmentée en présence d'anticorps anti-EPCR (**Figure 67**). L'EPCR plasmatique ne joue pas un rôle

puisque la sensibilité à la PCa ne change pas (rapport équivalent à 1) en présence ou non de l'anticorps anti-EPCR avec de surfaces phospholipidiques qui n'expriment pas l'EPCR (VP).

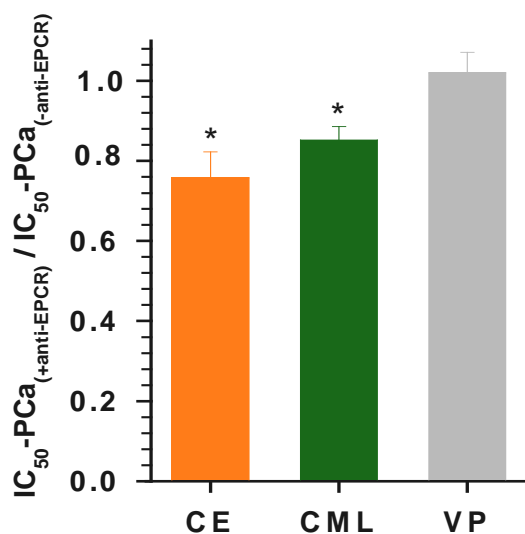


Figure 67 : Effet de l'EPCR cellulaire sur la sensibilité à la PCa à la surface des CE ou des CML aortiques humaines. Les résultats sont exprimés en ratio d' ($IC_{50-PCa (+anti-EPCR)} / IC_{50-PCa (-anti-EPCR)}$) présentés sous formes de moyennes \pm SEM (n=4 expériences réalisées en triple). * $p < 0,05$ versus VP.

4.4.3.2.2.4 Effet du TFPI exprimé à la surface des cellules endothéliales et cellules musculaires lisses et la PCa exogène sur l'inhibition de la génération de thrombine par la PCa à la surface de ces cellules

Nous avons montré par ELISA que des quantités similaires de TFPI sont exprimées par les CE et les CML (Figure 68).

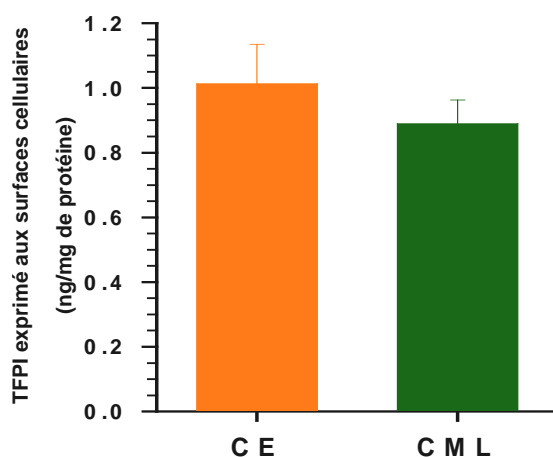


Figure 68 : Quantification en ELISA de l'expression du TFPI par les CE ou CML aortiques humaines. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM (n=3).

De plus, nous avons recherché un rôle synergique entre la PCa et le TFPI exprimé par les CE et CML qui pourrait être différent entre les CE et les CML.

Pour exprimer les résultats, nous avons utilisé un ratio : $IC_{50}\text{-PCa}$ en présence d'un anticorps anti-TFPI / $IC_{50}\text{-PCa}$ sans l'anticorps. Lorsque ce ratio est supérieur à 1, cela signifie qu'en présence d'un anticorps anti-TFPI les cellules deviennent moins sensibles à la PCa et donc que le TFPI exprimé par les CE ou les CML peut renforcer l'effet anticoagulant de la PCa.

Nous avons observé que ce ratio était supérieur à 1 avec les CE et les CML et significativement plus élevé avec les CML par rapport aux CE (**Figure 69**). Cela veut dire que le rôle synergique du TFPI cellulaire avec la PCa pour inhiber la génération de thrombine à la surface des cellules est plus important avec les CML qu'avec les CE.

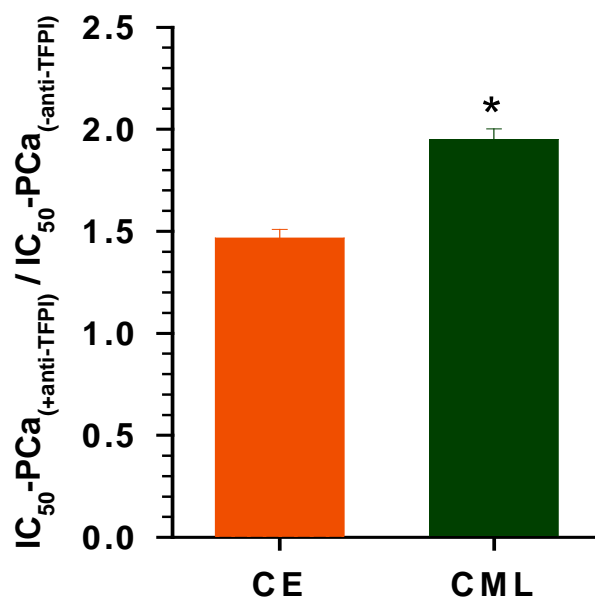


Figure 69 : Effet du TFPI cellulaire sur la sensibilité des CE et des CML aortiques humaines à la PCa. Les résultats sont exprimés en ratio d' ($IC_{50-PCa (+anti-TFPI)} / IC_{50-PCa (-anti-TFPI)}$) et présentés sous forme de moyennes \pm SEM (n=3 expériences réalisées en triple). * $p < 0,05$ versus CE.

Une autre façon d'étudier l'effet du TFPI cellulaire sur la sensibilité de CE et CML à la PCa exogène a été d'ajouter du FT qui va se lier au TFPI (dans le complexe quaternaire avec le FVIIa et le FXa) et empêcher son action synergique avec la PCa.

Nous avons constaté que sans ajout de FT ou en présence de FT exogène à faible concentration (0,5 pM), les CML sont significativement plus sensibles à la PCa que les CE, alors qu'en présence de concentrations plus importantes en FT (5 et 12,5 pM) la sensibilité à la PCa est similaire pour les CE et les CML. De plus, la sensibilité à la PCa pour les CML est statistiquement plus importante en présence de FT exogène à faibles concentrations (0 et 0,5 pM) par rapport à hautes concentrations (5 et 12,5 pM). Au contraire, les CE montrent des sensibilités similaires à la PCa en présence de toutes les concentrations FT utilisées (**Figure 70**). Ce résultat suggère un effet plus important du TFPI exprimé par les CML que le TFPI exprimé par les CE pour jouer un rôle synergique avec la PCa dans l'inhibition de la génération de thrombine à la surface des cellules.

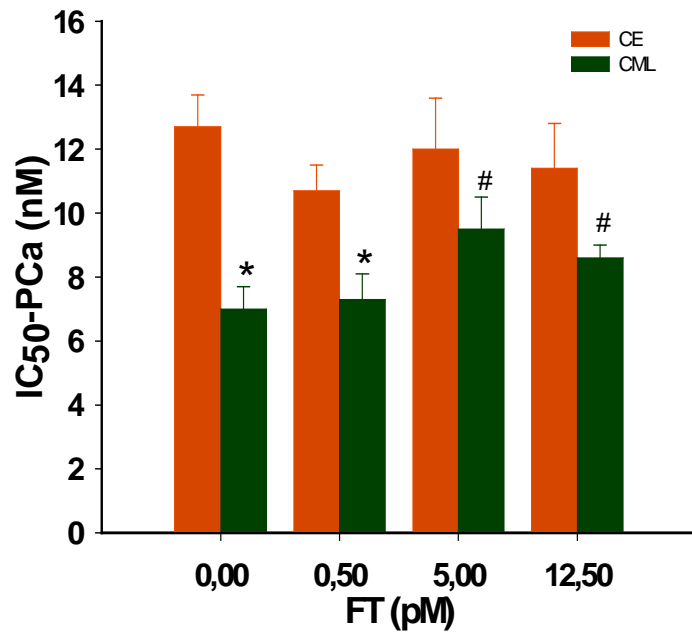


Figure 70 : La sensibilité à la PCa avec les CE ou CML humaines adhérentes en présence de différentes concentrations en FT. Les résultats sont exprimés en moyenne d'IC₅₀-PCa ± SEM (n= 4 expériences réalisées en triple). **p*<0,05 versus CE, # *p*<0,05 versus CML en présence 0 et 0,5 pM en FT.

4.5 Etude de la génération-inhibition de thrombine à la surface des microparticules dérivées des plaquettes, des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses humaines

4.5.1 Génération de thrombine à la surface des microparticules dérivées des plaquettes, des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses

L'activité PPA a été mesurée pour les MP dérivées des trois types cellulaires pour les ajuster à la même concentration en équivalents Pser en thrombinographie.

Nous avons étudié la génération de thrombine à la surface des MP plaquettaires, MP-CE et MP-CML ajustées à 1 μ M en activité PPA en présence de PDP humain et de FT à 0,5 pM. La (Figure 71) montre les thrombinogrammes obtenus avec les MP comparés à leurs cellules d'origine.

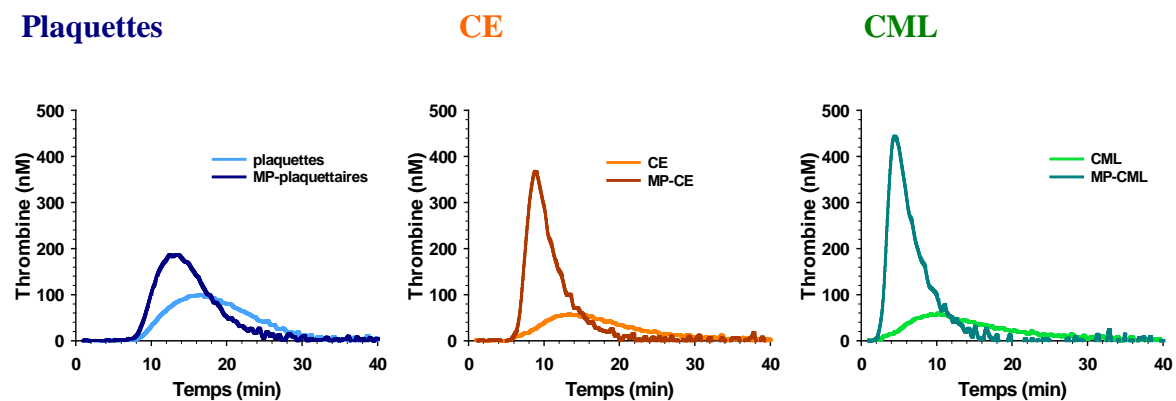


Figure 71 : Thrombinogrammes obtenus avec les trois types de MP comparées avec leurs cellules d'origine

Nous avons comparé le travail thrombinique obtenu à la surface des MP de différentes origines cellulaires entre eux ainsi qu'avec leurs cellules d'origine (Figure 72). Le travail thrombinique est significativement plus important à la surface des MP d'origine vasculaire (MP-CE et MP-CML) que leurs cellules d'origine. Les MP plaquettaires et les plaquettes ont un travail thrombinique similaire à leur surface. La comparaison de la génération de

thrombine entre les MP de différentes origines montre que la quantité de thrombine générée à la surface des MP-CML est la plus importante alors que celle formée à la surface des MP plaquettaires est la moins importante.

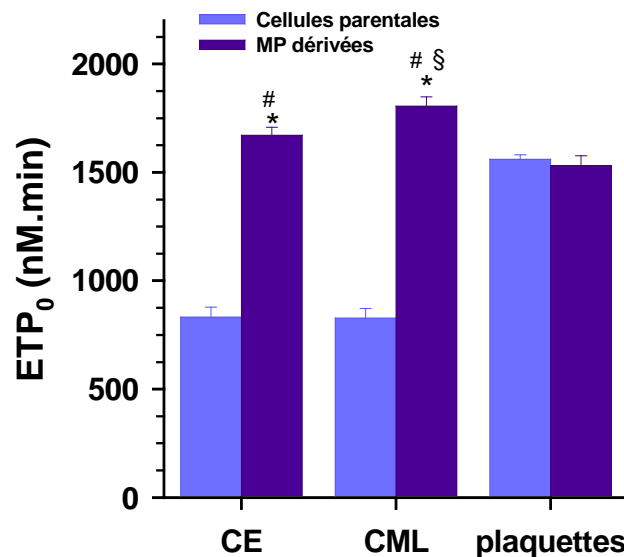


Figure 72 : Le travail thrombinique à la surface des MP plaquettaires, MP-CE ou MP-CML ou leurs cellules d'origine. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes d'ETP \pm SEM (n=9 expériences réalisées en triple). * $p < 0,05$ versus CE, CML respectivement, # $p < 0,05$ versus MP plaquettaires, § $p < 0,05$ versus MP-CML.

4.5.2 Mesure de l'activité FT à la surface des microparticules dérivées des cellules endothéliales et cellules musculaires lisses

La mesure de l'activité FT à la surface des MP issues des CE et CML (et ajustées à 1 μ M en activité PPA) montre que l'activité FT augmente lors de la microvésiculation d'un facteur de 22,7 avec les MP-CE et d'un facteur de 3,6 avec les MP-CML par rapport aux CE et CML respectivement (**Figure 73**). Nous avons également mesuré l'activité FT des MP plaquettaires (ajustées à 1 μ M en activité PPA) où aucune activité FT n'a été détectée avec les MP plaquettaires.

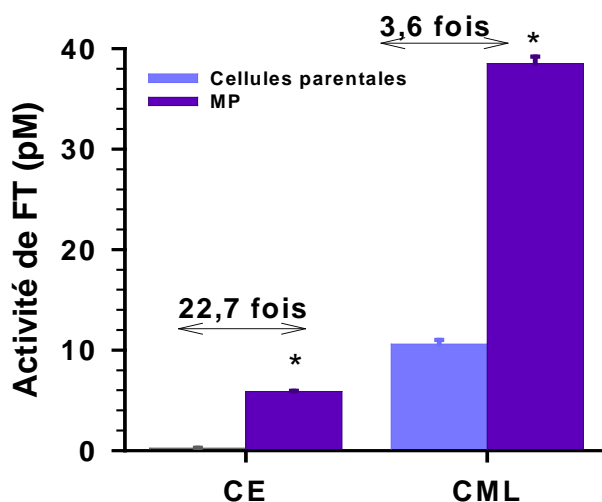


Figure 73 : L'activité FT mesurée à la surface des MP-CE, MP-CML ou de leurs cellules d'origine. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes d'activité FT \pm SEM (n=32 puits répartis sur 2 plaques). * $p < 0,05$ versus CE et CML respectivement.

Nous pouvons remarquer que même si l'augmentation de l'activité FT avec les MP-CE est beaucoup plus importante qu'avec les MP-CML par rapport à leurs cellules d'origine (CE et CML), cette activité FT des MP-CE reste inférieure à celle des CML et des MP-CML.

4.5.3 Sensibilité à la PCa des microparticules dérivées des plaquettes, des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses vasculaires

Nous avons réalisé la thrombinographie avec les MP dérivées de trois types cellulaires en ajoutant de la PCa à différentes concentrations. La comparaison entre les MP et leurs cellules d'origine pour la sensibilité à la PCa exogène en thrombinographie, représentée par les valeurs d'IC₅₀-PCa, montre une sensibilité à la PCa beaucoup plus importante à la surface des MP plaquettaires qu'à la surface des plaquettes. A l'inverse, les MP d'origine vasculaire (MP-CE et MP-CML) sont beaucoup moins sensibles à la PCa que leurs cellules parentales. De plus, la comparaison entre les MP elles mêmes montre que les MP d'origine vasculaire (MP-CE et MP-CML) ont une sensibilité similaire à la PCa mais significativement moins importante que celle avec les MP plaquettaires (**Figure 74**).

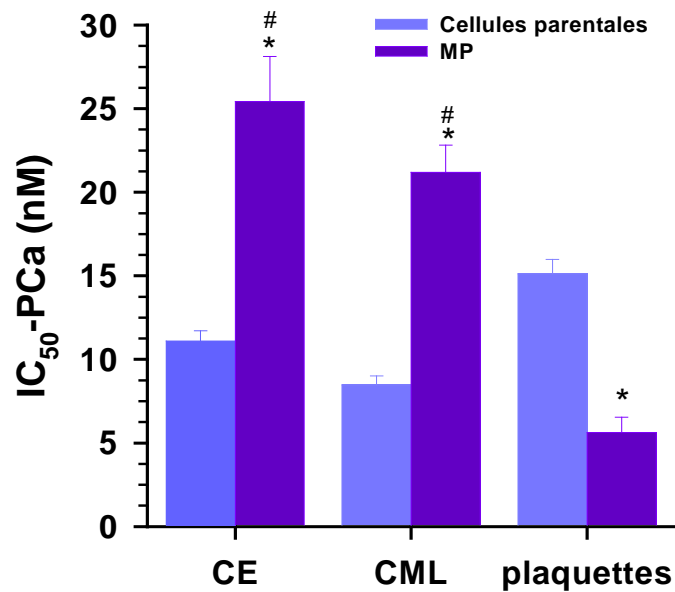


Figure 74 : Sensibilité à la PCa à la surface des MP plaquettaires, MP-CE,MP-CML ou de leurs cellules d'origine. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes d'IC₅₀-PCa ± SEM (n=9 expériences réalisées en triple). **p*<0,05 versus plaquettes, CE, CML respectivement, # *p*<0,05 versus MP plaquettaires.

Le **Tableau XIII** montre les paramètres des thrombinogrammes obtenus avec les MP plaquettaires, MP-CE et MP-CML ainsi que le paramètre ETP₀ × IC₅₀-PCa. Ces données montrent que les MP-CML représentent les surfaces les plus thrombogènes alors que les MP plaquettaires représentent les surfaces les moins thrombogènes.

	MP plaquettaires	MP-CE	MP-CML
ETP₀ (nM.min)	1531 ± 46	1671 ± 37*	1805 ± 43* #
Temps de latence (min)	8,3 ± 0,5	7,1 ± 0,4	2,8 ± 0,3* #
Pic (nM)	142 ± 12	377 ± 28*	428 ± 14*
Temps au pic (min)	13,7 ± 0,8	9,6 ± 0,7*	4,6 ± 0,2* #
Vélocité (nM/min)	31 ± 5	186 ± 28*	250 ± 19*
IC₅₀-PCa (nM)	5,6 ± 0,9	25,4 ± 2,7*	21,2 ± 1,6* #
ETP₀ x IC₅₀-PCa (nM.min.nM)	6962 ± 1523	42521 ± 4898*	36681 ± 2389*

Tableau XIII : Paramètres thrombinographiques obtenus avec les MP de trois types cellulaires ainsi que leur thrombogénicité représentée par les valeurs d'ETP₀ x IC₅₀-PCa. Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM (n=9 expériences réalisées entriples). **p*<0,05 versus MP plaquettaires, # *p*<0,05 versus MP-CE.

4.5.3.1 Etude de l'inactivation de facteur Va par la PCa en présence des microparticules dérivées des plaquettes, des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses humaines

Nous avons étudié la cinétique d'inactivation de FVa (1 nM) par la PCa (5 nM) en présence des MP plaquettaires, MP-CE et MP-CML (ajustées à une concentration finale de 1µM en activité PPA) dans un système purifié. Les expériences ont été réalisées sans ou avec PS (à une concentration finale de 490 nM).

❖ Sans protéine S

Les courbes d'inactivation de l'activité FVa sont présentées dans la **Figure 75**. Nous avons pu comparer le temps nécessaire pour diminuer l'activité maximale du FVa de 50% pour les trois types de MP. Ce temps est plus court avec les MP-CE (4,7 min) qu'avec les MP-CML (10,7 min) et les MP plaquettaires (12,5 min). Ce résultat est différent de ce que nous avons trouvé

en thrombinographie où nous avons observé que les MP-CML et les MP-CE sont significativement moins sensibles à la PCa que les MP plaquettaires.

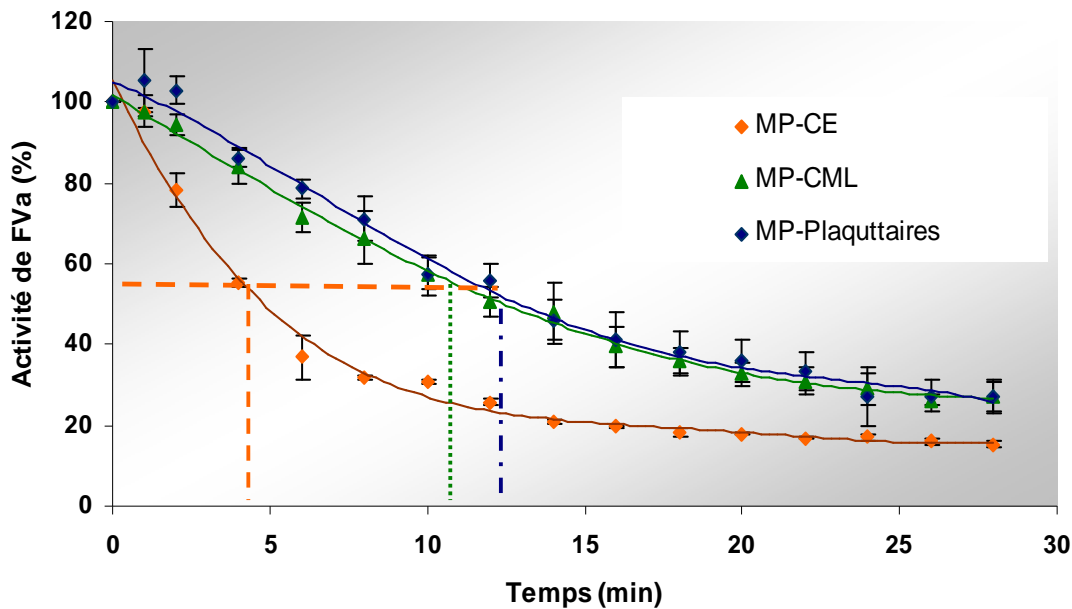


Figure 75 : Inactivation du FVa par la PCa en fonction du temps en présence des MP-CE, MP-CML ou MP plaquettaires dans un système purifié (sans PS). Les résultats sont exprimés en moyennes d'activité FVa résiduelle \pm SEM (n=3) en présence des MP (ajustées à une concentration finale de 1 μ M en PPA) en présence de PCa à 5 nM et de FVa à 1 nM.

❖ Avec protéine S

L'ajout de la PS à 490 nM à la réaction n'a pas changé les résultats obtenus : l'inactivation du FVa par la PCa en présence de la PS est plus efficace avec les MP-CE qu'avec les MP-CML et les MP plaquettaires (**Figure 76**). Par ailleurs, comme pour leurs cellules d'origine, la PS ne semble pas jouer le rôle de cofacteur pour la PCa dans l'inactivation du FVa dans ce système purifié avec les MP. Pour les MP plaquettaires, elle semble même jouer un rôle inhibiteur de la réaction d'inactivation en prolongeant le temps nécessaire pour diminuer l'activité du FVa de 50% par la PCa de 12,5 min (**Figure 75**) à 29 min (**Figure 76**).

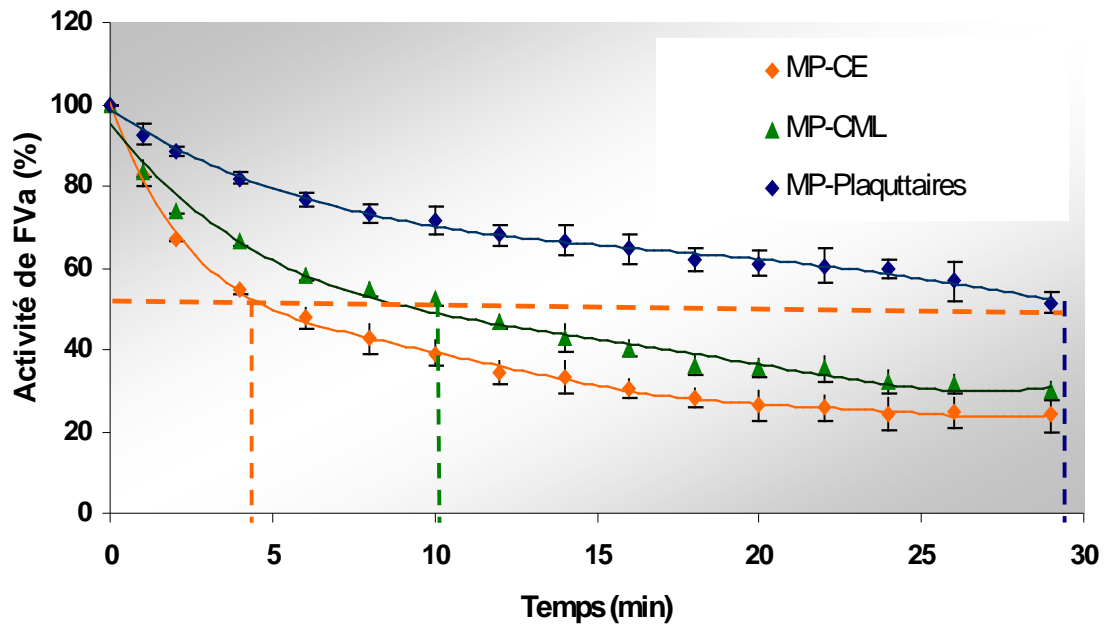


Figure 76 : Inactivation du FVa par la PCa en présence des MP-CE, MP-CML ou MP plaquettaires dans un système purifié (avec protéine S) en fonction du temps. Les résultats sont exprimés en moyennes d'activité FVa résiduelle \pm SEM (n=3) en présence des MP (ajustées à 1 μ M en activité PPA), en présence de PCa à 5 nM, de FVa à 1 nM et de PS à 490 nM.

5 DISCUSSION

Peu d'études se sont intéressés à caractériser la génération de thrombine à la surface des CML vasculaires en identifiant certaines propriétés procoagulantes associées à ces cellules. Nous avons montré une nouvelle propriété procoagulante des CML qui implique l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, qui est un récepteur de la prothrombine, dans la génération de thrombine à la surface de CML à l'état de base ou soumises à des déformations cycliques (10 % de déformation et 1 Hertz de fréquence). De plus, nous avons été les premiers à mettre en évidence, *in vitro*, un rôle des systèmes inhibiteurs de la coagulation tels que la PCa et le TFPI dans l'acquisition d'une différence entre la régulation de la génération de thrombine à la surface de ces CML, et d'autres cellules de la paroi vasculaire telles que les CE, ainsi que des cellules de la lumière sanguine telles que les plaquettes. La comparaison montre des thrombogénités différentes entre ces trois types cellulaires ainsi qu'entre les MP dérivées de ces cellules, prenant en compte le travail thrombinique réalisé à leur surface et leur sensibilité à la PCa. En comparant les trois types cellulaires, les plaquettes représentent les surfaces cellulaires les plus thrombogènes et les CML les moins thrombogènes. Au contraire, la comparaison entre les MP issues de ces trois types cellulaires montre que les MP-CML sont les plus thrombogènes et les MP plaquettaires sont les moins thrombogènes. De plus, les MP dérivées des cellules vasculaires sont plus thrombogènes que leurs cellules d'origine alors que les MP plaquettaires sont moins thrombogènes que les plaquettes.

La paroi vasculaire est un des principaux facteurs déterminants de la réponse thrombotique. La paroi artérielle saine exerce un rôle anticoagulant en fournissant différents facteurs impliqués dans la régulation de la génération de thrombine. L'équilibre entre les propriétés thrombogènes et thromborésistantes de l'endothélium est en faveur des activités antithrombotiques qui consistent à limiter l'activation des systèmes de l'hémostase à sa surface et l'adhésion des cellules circulantes au sous-endothélium, en ajoutant le rôle d'un système fibrinolytique présent au niveau des CE (1). Cependant, même en absence d'une lésion vasculaire, l'endothélium, en réponse à certains stimuli, peut présenter une capacité prothrombotique, directe par la synthèse des molécules favorisant l'agrégation des plaquettes, procoagulantes et antifibrinolytiques, ou indirecte par l'expression des molécules d'adhésion pouvant impliquer des cellules circulantes à activité thrombogène (1).

Les CML sont les cellules contenues dans la média. Ces cellules peuvent être en contact avec le sang, par exemple lors d'une rupture d'une plaque d'athérome lorsqu'elles migrent dans

l'intima et participent à la formation d'un thrombus qui peut compliquer l'athérosclérose (phénomène d'athérombose). D'autre part, une rupture de la continuité de l'endothélium lors d'une altération des jonctions endothéliales pourrait permettre au sang d'être en contact avec des CML. Par ailleurs, les CE (stimulées) et les CML (de manière constitutive ou stimulées) peuvent synthétiser des facteurs procoagulants à leur surface : des phospholipides membranaires, du FT, du facteur V et de la prothrombine [pour les CML (224)], ainsi que de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ comme récepteur de la prothrombine. Cette expression des différents facteurs nécessaires pour la génération de thrombine pourrait les rendre autonomes (indépendantes du vrai contact au sang) pour ce processus.

Flynn *et al* (5) ont montré que les CML vasculaires apoptiques peuvent servir de support pour la génération de thrombine. Cette étude a été suivie par celle de Pathak *et al* (4) qui ont montré que les CML vasculaires non apoptotiques sont aussi capables de servir de support pour la génération de thrombine, utilisant des tests chromogéniques de génération de thrombine. En 2009, Campbell *et al* (6) ont utilisé la thrombinographie pour la première fois pour l'étude de la génération de thrombine à la surface des CML aortiques humaines. Cependant, toutes ces études ont étudié les propriétés pro-coagulantes associées à ces cellules et aucune ne s'est intéressée aux effets inhibiteurs des systèmes anticoagulants de la PCa ainsi que du TFPI sur la thrombine générée à la surface de ces cellules. Pour cela, nous avons étudié l'inhibition de la génération de thrombine à la surface de ces cellules comparativement aux surfaces plaquettaires ou aux vésicules phospholipidiques utilisées habituellement en thrombinographie.

L'effet du nombre des CML du rat Wistar sur la génération de thrombine (**Figure 37**) montre une augmentation (pour les paramètres d'ETP, de pic et de vitesse) et une diminution (pour le temps de latence et le temps au pic) de manière concentration-dépendante. Néanmoins, cette évolution des valeurs des paramètres thrombinographiques en fonction de la concentration des CML n'est pas linéaire mais représente des courbes d'une équation fonction pour tous les paramètres thrombinographiques. La courbe représentant les valeurs d'ETP en fonction de nombre des CML atteint le plateau pour une concentration finale égale à $2,6 \times 10^5$ cellules/mL. Cela suggère que la saturation de la quantité formée en thrombine survient à cette concentration de CML en présence de concentrations actuelles des facteurs/inhibiteurs de coagulation présentes dans le plasma. Cela nous a permis de choisir une concentration précise des CML, contenue dans la partie ascendante de la courbe (avant la saturation), à laquelle nous avons ajusté les CML dans toutes les expériences effectuées avec les CML de rat dans le but d'homogénéiser nos conditions expérimentales.

La conservation des CML du rat Wistar détachées par la trypsine dans l'HBS à température ambiante pendant 2 heures n'a aucun effet sur le travail thrombinique réalisé à la surface de ces cellules après 2 heures ; nous avons déterminé la viabilité des CML conservées 2 heures à température ambiante (>90%). Flynn *et al* (5) ont montré que le taux d'apoptose avec les CML mises dans un milieu de culture dérivé de sérum pendant 120 heures augmente à $14,0 \pm 1,6\%$ accompagné par une augmentation de 27% de la concentration maximale de thrombine après 30 min. Notre observation ainsi que celle de Flynn *et al* concernant la mortalité des CML en absence de sérum indiquent que la dérivation du sérum induit un processus de mort cellulaire relativement lent accompagné par une augmentation de génération de thrombine non observée pour un temps de 2 heures suivant la dérivation de sérum (notre cas).

En comparant les CML aortiques du rat Wistar détachées par la trypsine et adhérentes après les avoir ajustées au même nombre (15000 cellules), nous avons montré que la quantité de thrombine à la surface des CML du rat Wistar augmente 1,7 fois à la surface des CML détachées par la trypsine (**Figure 38 B**). Cette augmentation est accompagnée par une augmentation de 4 fois de la concentration de Pser aux feuillettes externes des CML détachées (**Figure 38 C**). Flynn *et al* (5) ont montré que la génération de thrombine à la surface de CML vasculaires de rat est inhibée en présence de l'annexine V (qui lie la Pser) démontrant l'importance de l'exposition des phospholipides anioniques dans la génération de thrombine à la surface de ces cellules. Ainsi, dans notre étude, l'activité PPA plus importante avec les CML détachées, peut contribuer à expliquer l'augmentation du travail thrombinique associé à ces cellules prenant en compte l'exposition de plus de surfaces phospholipidique à la surface des cellules lors du détachement. De plus, il a été démontré (237) que la trypsine (qui est une sérine protéase) induirait une activation cellulaire aboutissant à une augmentation du calcium intracellulaire qui, à son tour, va induire l'externalisation des phospholipides anioniques du feuillet interne au feuillet externe de la membrane plasmatique (238).

Par ailleurs, il a été démontré par Maynard *et al* dans une étude effectuée sur des fibroblastes humains et des cellules amniotiques «WISH» (239) que les cellules adhérentes ne possèdent pas de FT actif, qu'il existe sous forme latente, et que le détachement total des cellules de leur support n'est pas nécessaire à cette activité pour initier la coagulation du sang. Quantitativement, le détachement des cellules de leur support par une trypsination courte, s'est associé avec une augmentation de l'activité du FT de 6 à 10 fois (240) et que le retard de l'apparition de l'activité FT (mesurée avec des cellules détachées par la trypsine et prélevées à intervalles réguliers) dépend du taux de l'apparition de cellules détachées (240). Cette interprétation concernant l'augmentation de l'activité du FT lors du traitement avec la

trypsine pourrait expliquer le fait que l'ajout du FT exogène en thrombinographie n'a aucun effet sur la quantité du travail thrombinique à leur surface (**tableau IV**). L'absence de l'effet de FT exogène sur la quantité de la thrombine générée à la surface de CML suggère que l'augmentation de l'activité FT liée au détachement par la trypsine serait suffisante pour atteindre un niveau maximal du travail thrombinique indépendamment du FT (exogène). Pathack *et al* (4) ont montré qu'un anticorps anti- FT diminue la concentration maximale de la thrombine générée à la surface des CML vasculaires humaines adhérentes à 75%. Ces observations suggèrent que le FT exprimé par les CML joue un rôle dans la génération de thrombine réalisée à la surface de ces cellules adhérentes. Nos observations concernant les CML aortiques détachées par la trypsine démontrent une génération de thrombine indépendante du FT ajouté (exogène), ce qui est en faveur de l'hypothèse de dé-encryptage du FT associé au détachement cellulaire par la trypsine (238).

Concernant la sensibilité à la PCa exogène ajoutée en thrombinographie, représentée par la valeur d'IC₅₀-PCa, les CML du rat Wistar détachées et adhérentes montrent une sensibilité similaire à la PCa malgré la participation de plus des phospholipides liée au détachement des cellules. Nous pouvons émettre l'hypothèse que le changement de distribution phospholipidique lié au détachement par la trypsine n'a pas un effet majeur sur les phospholipides nécessaires pour l'activité anticoagulante de la PCa (phosphatidylétanolamine) (240,241) et que les surfaces phospholipidiques des CML adhérentes servent de support approprié pour les activités anticoagulantes de la PCa (inactivation des facteurs Va et VIIIa) aussi bien que des CML détachées par la trypsine.

Le syndrome métabolique s'accompagne d'un état inflammatoire, hyperadrénergique et prothrombotique (242,243) et d'un risque augmenté de développer un diabète de type 2 (244). Les deux modifications importantes sur le plan vasculaire liées au syndrome métabolique sont une rigidité artérielle et une hypercoagulabilité (245-247). L'hypercoagulabilité dans le syndrome métabolique serait due à une augmentation du FT, du facteur VII et du fibrinogène (243). De plus, une diminution de la fibrinolyse liée à une augmentation du PAI-1 a été décrite comme un élément favorisant l'état hypercoagulable chez les patients ayant le syndrome métabolique (243).

Il a été décrit dans la littérature que les rats Zucker obèses ont une réactivité plaquettaire augmentée (248) expliquée par une augmentation de l'expression du GPIIbIIIa et de la dégranulation plaquettaire (augmentation de l'expression de la P-sélectine contenue dans les

granules α et la GP53 contenue dans les lysosomes). Ainsi, dans le contexte de syndrome métabolique, la survenue de modifications fonctionnelles et structurales de la paroi vasculaire en rapport avec l'accroissement de l'hypertension artérielle et des désordres métaboliques pourrait amplifier cet état hypercoagulable et être en faveur avec des manifestations thrombotiques *in vivo* (245). Pour apprécier plus précisément les liens entre la paroi et le sang, nous nous sommes intéressés aux CML aortiques du rat Zucker (le rat obèse fa/fa et son contrôle FA/FA) en étudiant la génération de thrombine à la surface de ces CML. Les résultats de thrombinographie effectuée en présence de CML issues des rats des 2 géotypes montrent un travail thrombinique 2 fois moins important associé à une concentration en P_{Ser} 2 fois moins importante à la surface des CML des rats obèses qu'à la surface des CML des rats contrôles.

La sensibilité à la PCa plus importante à la surface des CML des rats obèses pourrait contribuer à expliquer, en partie, la moindre coagulabilité observée en thrombinographie avec les CML des rats obèses. Comme les CML vasculaires expriment les protéines faisant partie du système de la PCa (la TM et l'EPCR), donc, en thrombinographie, la PCa peut se former suite à l'activation de la protéine C plasmatique en présence de ces protéines membranaires exerçant alors ses activités anticoagulantes en inactivant les facteurs Va et VIIIa. En suggérant une concentration similaire de la PCa endogène formée à la surface des CML des rats Zucker obèse et contrôle, la sensibilité plus importante à la PCa formée dans le milieu réactionnel (avec les CML des rats obèses) signifierait une inhibition plus importante de la thrombine générée. Cette sensibilité plus importante à la PCa pourrait contribuer avec la moindre activité PPA à la surface des CML des rats obèses à expliquer les valeurs d'ETP moins importantes avec les CML des rats obèses qu'avec les CML des rats contrôles. Ainsi, la paroi artérielle rigide des rats Zucker obèses contient des CML avec des propriétés procoagulantes moins importantes que celles des rats Zucker contrôles. Donc, même si le syndrome métabolique est associé à un état prothrombotique décrit dans le sang des patients obèses, les CML de la paroi artérielle des rats Zucker obèses possèdent des propriétés procoagulantes moins importantes que les rats Zucker contrôles.

Cependant, une étude phénotypique des CML de rats Zucker obèses serait intéressante pour chercher des modifications au niveau du cytosquelette ou de la membrane plasmatique en liaison avec les modifications de leurs propriétés pro et anti-coagulantes observées dans cette étude.

L'étirement cyclique induit une contrainte mécanique sur les CML. Nos résultats ont montré que cet étirement a pour conséquence d'augmenter la génération de thrombine ainsi que l'activité PPA à la surface des CML du rat Wistar. Les CML sont, en effet, capables, sous cette contrainte, d'exposer les phospholipides procoagulants à leur surface par le mécanisme de flip-flop. Cette translocation des phospholipides anioniques s'effectue dès 5 min (**Figure 43**) et est susceptible de contribuer à l'augmentation de la génération de thrombine. Elle peut aussi simplement être le reflet d'un changement morphologique des cellules, d'une microvésiculation ou d'une apoptose de certaines cellules.

Si la génération de thrombine ne dépendait que de l'exposition de ces phospholipides anioniques à la surface externe des membranes cellulaires, une augmentation de l'ETP par l'étirement devrait avoir lieu dès 5 min. Or, l'augmentation de l'ETP n'a lieu qu'à partir de 30 min. Il y a donc un décalage entre les effets de l'étirement observés d'après les deux tests, activité PPA et thrombinographie. Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce décalage :

- (i) le seuil de phospholipides anioniques est insuffisant pour que cela joue sur l'ETP à 5 min,
- (ii) cette augmentation de génération de thrombine ne dépend pas que de la quantité de phospholipides anioniques mais aussi d'un ou plusieurs autres facteurs.

Sans étirement, les peptides RGD inhibent de façon concentration-dépendante la génération de thrombine à la surface des CML de rat, alors que l'exposition des phospholipides anioniques membranaires n'était pas modifiée. Ces résultats suggèrent que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (comme récepteur de la prothrombine) est impliquée dans la génération de thrombine à la surface des CML. L'absence de modification au niveau de la sensibilité à la PCa des CML soumises à des déformations cycliques est en faveur de l'effet de l'augmentation de la génération de thrombine à la surface des CML soumises à ces déformations cycliques.

Quant aux CML de rat soumises à des déformations cycliques, nous avons démontré un effet inhibiteur du peptide cRGDPV cyclique, spécifique de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, sur l'augmentation de la génération de thrombine à la surface des cellules (**Figure 49**). Ce résultat est en faveur de la deuxième hypothèse. Le peptide RGD a une action sur les CML et change leur réponse aux contraintes mécaniques, ce qui se traduit par une inhibition des effets de ces contraintes. Ces résultats permettent ainsi de proposer un rôle majeur pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

dans les modifications morphologiques et fonctionnelles induites par l'application de contraintes mécaniques cycliques sur les CML. Néanmoins, l'utilisation de ce peptide a certaines limites, Tout d'abord, sa liaison à l'intégrine peut être agoniste ou antagoniste selon les conditions. De plus, sa spécificité de liaison pourrait ne pas être maximale. Enfin, sa liaison avec l'intégrine est réversible.

Pour ces raisons, nous avons utilisé des ARN interférents de l' α_v . Ces siARN α_v , intégrés aux CML, peuvent inhiber l'expression au niveau ARN de la sous-unité α_v de l'intégrine. Nous nous sommes intéressés à cibler la sous-unité α_v au niveau ARN car la sous-unité β_3 est plus répandue. Nous avons observé une diminution significative de la quantité de thrombine générée à la surface des CML transfectées sans (**Figure 48**) ou avec (**Figure 49**) étirement. Cette diminution de génération de thrombine n'était pas accompagnée par une modification significative au niveau de l'activité PPA (**Figure 48**) ce qui confirme le rôle de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ exprimé par les CML dans la détermination de la génération de thrombine à la surface de ces cellules. Nous avons également confirmé la spécificité de cet effet sur des cellules (soumises à l'étirement cyclique) avec un siARN α_5 qui cible l'intégrine α_5 non connue comme récepteur de la prothrombine (**Figure 49**).

Ainsi, dans certaines pathologies vasculaires où les CML sont soumises à des déformations cycliques importantes, telles que l'hypertension artérielle, une génération accrue de thrombine pariétale par les CML pourrait être attendue. Les facteurs de coagulation plasmatiques nécessaires pour cette formation peuvent être en contact avec les CML suite à une augmentation de la perméabilité des jonctions endothéliales qui accompagnent souvent l'hypertension (249). De plus, dans les conditions physiologiques, les CML expriment la majorité des éléments nécessaires pour la génération de thrombine. Néanmoins, il n'est pas encore montré si cette expression de différents facteurs de coagulation par les CML pourrait, en présence d'autres composants de la MEC et du liquide interstitiel, former la thrombine au niveau pariétale. Les déformations cycliques, augmentées dans certaines pathologies cardiovasculaires, vont modifier l'expression de ces molécules à la surface des CML en les rendant «autonomes» pour la génération de thrombine. Une fois cette thrombine formée, elle peut exercer ses actions cellulaires y compris la prolifération et la migration des CML, participant, à son tour, à amplifier la pathologie vasculaire comme l'athérosclérose.

Notre objectif principal était de comparer la génération de thrombine à la surface des CML avec d'autres cellules de la paroi vasculaire, les cellules endothéliales, ainsi qu'avec les plaquettes comme cellules sanguines très connues pour leur capacité à servir de surfaces

appropriées à la génération de thrombine. La génération de thrombine avait déjà été étudiée, *in vitro*, à la surface de différentes cellules vasculaires : les fibroblastes, CML et CE (4-6,250,251). Dans leur étude, Campbell *et al* (6), avaient montré, en thrombinographie, en l'absence de FT ajouté, une génération de thrombine à la surface des CML aortiques humaines avec un temps de latence significativement plus court, un ETP plus élevé, un temps au pic plus court, et un pic plus haut qu'à la surface des HUVEC non stimulées, et ils ont expliqué ce résultat par une activité de FT à la surface des CML 8,7 fois plus élevée qu'à la surface des CE non stimulées, suggérant le FT comme le mécanisme principal pour expliquer les différentes activités procoagulantes. Dans notre étude, les paramètres des courbes de génération de thrombine à la surface des CML et CE aortiques humaines adhérentes et plaquettes humaines ont montré des valeurs similaires d'ETP et de pic de thrombine, mais un temps de latence et un temps au pic plus courts avec les CML qu'avec les CE sans ajout de FT, ainsi qu'en présence de 0,5 pM de FT exogène. Ce résultat a été accompagné par une activité de FT à la surface des CML 30 fois plus élevée qu'à la surface des CE. En accord avec Campbell *et al* (6), la différence significative de l'activité du FT à la surface des CE et CML aortiques humaines était compatible avec le temps de latence plus court avec les CML qu'avec les CE. Contrairement à l'observation concernant la quantité de thrombine formée à la surface des HUVEC utilisées dans leur étude, les valeurs d'ETP à la surface des CE aortiques (utilisées dans notre étude) étaient similaires aux valeurs de l'ETP à la surface des CML. Pour expliquer cette différence de génération de thrombine à la surface des HUVEC utilisées dans (6) et les CE aortiques humaines utilisées dans notre étude, nous avons d'abord pensé à l'origine cellulaire car il a été démontré que la différence la plus frappante entre les CE de diverses origines était leur expression de FT. Il a été démontré que les CE isolées de cordon ombilical ne contiennent pas de FT détectable associé à la cellule, tandis que les cellules isolées de l'atrium ou de l'épiploon expriment une activité FT (250). Cette observation n'est pas en accord avec notre résultat montrant que l'activité FT exprimée par les CE utilisées dans notre étude est 30 fois moins importante que par les CML. De plus, les CE fournissent également une surface sur laquelle les facteurs de coagulation peuvent s'assembler et être activés ; il a été démontré que la liaison du complexe FIXa-FVIII est moins efficace à la surface des HUVEC qu'à la surface des plaquettes (252). Par ailleurs, pour une espèce donnée, une hétérogénéité entre les CE a été décrite pour servir de surface appropriée pour l'activité prothrombinase. En comparant plusieurs origines de CE, leur efficacité à servir de support pour l'activité prothrombinase a été décrite dans un ordre décroissant : cellules aortiques bovines, cellules de veine ombilicale, cellules de veine pulmonaire. Ainsi, l'activité

prothrombinase était maximale avec les cellules artérielles. Il pourrait être important pour les artères de posséder cette activité parce que le contrôle rapide de l'hémorragie est critique pour les grands vaisseaux (253). Nos résultats sont plutôt en faveur de cette dernière hypothèse.

Notre observation que la quantité de thrombine générée en présence de concentrations égales de FT total (exprimé + ajouté) était plus élevée à la surface des CE qu'à celle des CML démontre que les CE sont plus sensibles au FT. Ce résultat est compatible avec les valeurs similaires d'ETP obtenues à la surface des CE et CML sans l'ajout de FT ou en présence de concentrations faibles en FT (0,5 pM) malgré l'activité FT à la surface des CE 30 fois moins importante qu'à la surface des CML.

En plus du FT, nous avons identifié une autre activité procoagulante à la surface cellulaire, par la mesure de l'activité PPA (à la surface des CE et CML non stimulées) exprimée en concentration en P_{Ser}. Nous avons observé des valeurs d'activité PPA similaires à la surface des CE et CML mais significativement plus élevées qu'à la surface plaquettaire (**Figure 52**). Ces valeurs d'activité PPA mesurées à la surface des trois types cellulaires se situent dans la partie ascendante de la courbe montrée dans la **Figure 51** avec des phospholipides synthétiques. Cette observation est en faveur d'une augmentation possible de la génération de thrombine due à une exposition accrue des phospholipides anioniques suite à l'activation des cellules par la thrombine formée en thrombinographie. En effet, La thrombine a été décrite comme un activateur de la protéine kinase C impliquée dans l'activation cellulaire en augmentant le Ca²⁺ intracellulaire et induisant une augmentation de l'expression des phospholipides chargés négativement au feuillet externe de la membrane cellulaire (69,220). Donc, la capacité de la thrombine formée, *in situ* (à la surface cellulaire), pendant la thrombinographie à activer les cellules serait un déterminant important de l'activité procoagulante cellulaire au cours de thrombinographie. Pour étudier l'effet activateur de la thrombine sur ces trois types cellulaires, nous avons étudié l'activation des trois types cellulaires (par la thrombine) conduisant à la formation des MP. En mesurant les MP dérivées de ces cellules (CE, CML adhérentes et plaquettes lavées en suspension) suite à une incubation avec 10 nM de thrombine pendant 15 min à 37°C, les résultats de cytomètre en flux ainsi que de PPA réalisés pour ces MP montrent une microvésiculation associée à une exposition P_{Ser} beaucoup plus importante avec les plaquettes qu'avec les cellules (**Figure 60,61**). Cela pourraient expliquer l'activité thrombinique observée en thrombinographie plus importante à la surface des plaquettes qu'à la surface des CE et des CML ; la thrombine est plus efficace pour activer les plaquettes que les CE et les CML induisant la formation des

microvésicules (capables elles mêmes et/ou les plaquettes activées à servir de surfaces procoagulantes supplémentaires appropriées pour la génération de thrombine).

L'activation des cellules par la thrombine formée au cours de la thrombinographie n'est peut-être pas seulement associée à une augmentation de phospholipides chargés négativement à la surface des cellules, mais elle pourrait induire un ARNm FT et une activité FT (220). Il a été rapporté, avec des fibroblastes bovins, des péricytes et des cellules de rein, qu'un ionophore à Ca^{2+} augmente nettement l'activité de FT sur la membrane cellulaire. Cette augmentation de l'activité est due à un processus de (dé-encryptage), dans lequel l'augmentation intracellulaire de Ca^{2+} provoque un changement dans l'accessibilité du FT sur la membrane cellulaire, ce qui expose des molécules de FT précédemment encryptées (inactives) (254).

Par ailleurs, il a été démontré que d'autres activateurs de la protéine kinase C (la même voie d'activation que la thrombine), les esters de phorbol, induisent des niveaux élevés d'ARNm FT dans des CE humaines et des leucocytes périphériques (254,255). Les esters de phorbol ont été également montrés capables d'induire l'ARNm FT dans des CML en culture, bien que la durée de l'expression des ARNm FT soit considérablement plus courte que celle observée pour les CE ou leucocytes. Prenant toutes les données précédentes en compte, nous pouvons suggérer que la thrombine formée au cours de thrombinographie, qui est un activateur de la protéine kinase C, induirait l'expression d'un ARNm FT et activité FT ou (dé-encryptage), plus efficace dans les CE que dans les CML.

Nous avons confirmé l'observation de l'augmentation de l'activité FT lors de l'activation cellulaire, en mesurant l'activité FT associée aux MP résultant de l'activation des CE et CML par la ionomycine. Nous avons observé que l'activité FT augmente avec la microvésiculation de 22,7 fois et 3,6 fois avec les CE et les CML, respectivement (**Figure 73**). Ce résultat est cohérent avec les données de littérature (220,256) qui montrent que l'induction d'activité FT (lors de l'activation cellulaire) est plus efficace sur les CE que sur les CML. Cela renforce notre hypothèse selon laquelle la thrombine formée en thrombinographie pourrait activer les CE de façon plus importante que les CML et, par conséquent, participer à augmenter sa propre production de manière plus efficace à la surface des CE qu'à la surface des CML. Pour les plaquettes, il a été rapporté que l'expression du FT à la surface des plaquettes est controversée (256-258), même il a été rapporté que l'activation plaquettaire induit leur expression de FT (259-261).

Nos résultats obtenus par l'étude des propriétés procoagulantes de trois types cellulaires : plaquettes, CE et CML montrent que le travail thrombinique obtenu à la surface des plaquettes est supérieur qu'à celui à la surface des CE et CML.

Le rôle de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (comme récepteur de la prothrombine) a été montré dans la génération de thrombine à la surface des plaquettes (8,49), et nous avons montré le rôle de l' $\alpha_v\beta_3$ dans la génération de thrombine pour la première fois à la surface des CML du rat. Pour les CE, le rôle de l' $\alpha_v\beta_3$ dans la génération de thrombine à leur surface n'est pas encore étudié. Donc, les intégrines exprimées à la surface de ces trois types cellulaires (notamment celles qui servent comme récepteurs à la prothrombine) peuvent moduler les propriétés procoagulantes des cellules.

L'étude des propriétés anticoagulantes de ces trois types cellulaires nous a permis d'expliquer en partie les données obtenues en thrombinographie. Les CE et les CML mais pas les plaquettes, expriment la TM et l'EPCR, deux protéines nécessaires pour l'activation de la protéine C (plasmatique), ce qui aboutira à la génération de la PCa dans le milieu réactionnel de la thrombinographie à la surface des CE et CML. L'incubation des CE et CML avec un anticorps anti-TM augmente significativement les valeurs d'ETP à la surface des CE et des CML de manière concentration-dépendante (**Figure 56**). Ce rôle anticoagulant de la PCa endogène est exclu avec les plaquettes. Ainsi, l'inhibition de la thrombine générée à la surface des plaquettes en thrombinographie par le système de la PCa formée, *in situ*, n'est pas envisageable, ce qui pourrait ajouter un deuxième élément explicatif des valeurs ETP plus élevées avec les plaquettes qu'avec les cellules vasculaires.

Les trois types cellulaires ont montré une sensibilité différente à la PCa exogène (ajoutée en thrombinographie) d'un ordre croissant : plaquettes, CE et CML.

Nous avons étudié les mécanismes impliqués dans la différence de sensibilité à la PCa entre les CE et les CML.

Tout d'abord, nous avons confirmé (avec les CE et CML aortiques humaines utilisées dans notre étude) l'observation de Campbell *et al* (6) avec les HUVEC et les CML aortiques humaines, qu'aucune différence n'est observée ni dans la vitesse de formation de la PCa à la surface cellulaire en présence de concentrations fixes de thrombine et de protéine C ni dans la cinétique de la génération de la PCa en présence d'une concentration physiologique de protéine C et des concentrations croissantes de thrombine (**Figure 62,63**). Cela suggère la

formation d'une quantité similaire de PCa endogène à la surface des cellules vasculaires (CE et CML) dans le milieu de thrombinographie.

Deuxièmement, il avait été démontré que l'efficacité avec laquelle la PCa exerce son activité anticoagulante d'inactivation du FVa dépend de la composition phospholipidique des surfaces impliquées (171,172,262,263). Nous avons étudié comment les surfaces phospholipidiques des cellules adhérentes peuvent servir de support pour l'activité anticoagulante de la PCa (inhibition du FVa), et nous avons observé une différence significative entre les CE et les CML dans un système purifié. Cela indiquerait que les surfaces phospholipidiques des CE et CML exercent des effets anticoagulants différents de la PCa et que, dans ce système purifié, l'effet anticoagulant de la PCa (dans l'inactivation du FVa) est plus efficace à la surface des CE qu'à la surface des CML. Ce résultat n'est pas en accord avec la sensibilité à la PCa, observée en thrombinographie, plus importante avec les CML qu'avec les CE. Une explication possible est que le plasma apporte dans le milieu réactionnel de la thrombinographie des éléments régulateurs de l'activité de la PCa qui ne sont pas présents dans le milieu purifié. Une autre explication serait que les réactants ne sont pas présents dans les mêmes rapports dans ces deux systèmes, l'un étant plus favorable que l'autre. En comparant les valeurs d'ETP obtenues avec les deux types cellulaires pour chaque concentration de PCa, nous avons trouvé une différence significative pour une concentration de 6,7 nM et 25 nM mais pas pour 13,9 nM. Nous aurions pu utiliser en thrombinographie la même concentration de PCa que celle utilisée dans un système purifié (5 nM) pour pouvoir comparer les deux systèmes et/ou réaliser un plus nombre d'expériences dans le but d'étudier la sensibilité des cellules à la PCa dans les deux systèmes. La PS joue le rôle d'un cofacteur de la PCa dans ses activités anticoagulantes ; ce rôle cofacteur de la PS pour la PCa a été montré dans un système purifié à la surface des VP synthétiques (172). Cependant, dans les conditions du système purifié utilisées pour l'étude de la cinétique de l'inactivation du FVa par la PCa, l'ajout de la PS ne semble pas jouer un rôle accélérateur de la cinétique d'inactivation du FVa par la PCa à la surface des CE et CML adhérentes (**Figure 64,65**). Ainsi, les limites des modèles expérimentaux nécessitent une détermination plus complète des facteurs qui peuvent varier selon les conditions expérimentales de la thrombinographie et des systèmes purifiés.

Nous avons étudié le rôle de l'EPCR exprimé par les CE et CML pour expliquer la sensibilité différente à la PCa entre les CE et les CML. Il a été constaté, chez des sujets sains, que la concentration plasmatique de la protéine C est de 50 à 70 nM (65 fois plus élevée que la

concentration de la PCa), mais l'affinité de la protéine C à l'EPCR est identique à celle de la PCa. Donc, la compétition pourrait être en faveur de la protéine C, permettant la disposition d'une quantité libre suffisante de PCa pour inhiber la coagulation (240,257,264). Par conséquent, notre hypothèse était que l'EPCR peut lier la PCa ajoutée en concentrations élevées (de l'ordre de nM) en thrombinographie et que la compétition entre la protéine C plasmatique et la PCa ajoutée pour l'EPCR cellulaire est augmentée. Cette liaison EPCR-PCa, via un domaine d'acides aminés (Gla) compétitif avec les surfaces phospholipidiques, empêcherait la PCa de se lier aux surfaces phospholipidiques diminuant sa capacité d'inhiber les FVa et FVIIIa. Plus il y a de l'EPCR dans le milieu réactionnel, moins il y a d'activité anticoagulante de la PCa et moins grande est la sensibilité à la PCa. Nous avons montré que la sensibilité à la PCa en présence d'un anticorps anti-EPCR augmente pour les CE et pour les CML. Cette augmentation de la sensibilité n'existe pas pour les VP synthétiques, qui n'expriment pas l'EPCR et représentent donc un contrôle négatif (**Figure 67**). L'absence de modification de sensibilité à la PCa pour les VP en présence d'un anticorps anti-EPCR prouve également que cet effet est dû à l'EPCR cellulaire, et pas à l'EPCR soluble présent à faible concentration dans le plasma. Cet effet de l'interaction entre la PCa et l'EPCR cellulaire a déjà été montré par Ducros *et al* à la surface des CE (265). Dans leur étude, Ducros *et al* ont montré que le traitement des CE issues de la moelle osseuse humaine avec l'aldostérone induit une augmentation de l'expression de l'EPCR à leur surface. Cette expression accrue de l'EPCR à la surface des CE est associée à un allongement de 2,5 fois du temps de coagulation (aPTT *pour activated partial thromboplastin time*) réalisé en présence de ces cellules pré-incubées avec la PCa (265). Cette observation suggère une augmentation de liaison de la PCa à la surface des CE liée à l'EPCR (plus exprimée suite au traitement avec l'aldostérone). De même, une autre preuve de la liaison entre la PCa et l'EPCR à la surface des CE a été rapportée par Pérez-Casal *et al* (212) qui ont montré que la PCa a été utilisée pour libérer de MP exprimant l'EPCR à partir des HUVEC et que cette libération des MP par la PCa a été inhibée en présence d'un anticorps anti-EPCR.

Nous avons enfin étudié l'effet du TFPI exprimé à la surface des CE et des CML sur l'inhibition de la génération de thrombine à la surface de ces cellules. L'anticorps anti-TFPI augmente la génération de thrombine à la fois à la surface des CE et des CML, d'une manière concentration-dépendante. Par ailleurs, il a été démontré dans un système de coagulation purifié que les actions de TFPI et la PCa sont complémentaires (ces inhibiteurs se comportent de manière synergique) (266). Cette observation a été confirmée plus tard dans un plasma

pauvre en plaquettes à la surface de VP synthétiques : il a été rapporté par Visser *et al* (267) que la réduction du niveau de TFPI conduit à une sensibilité réduite à la PCa. En outre, Hackeng *et al* (160) ont démontré qu'en présence d'une concentration élevée de FT (14 pM), la génération de thrombine en absence de PCa n'a pas été affectée par le TFPI, alors que le TFPI semblait être un déterminant majeur de la génération de thrombine en présence de la PCa (160). Nous avons montré ce rôle synergique entre le TFPI cellulaire (exprimé) à la surface des CE et CML et la PCa ajoutée en thrombinographie sans ajout de FT ; le ratio de l'IC₅₀-PCa augmente à la fois pour les CE et les CML en présence d'un anticorps anti-TFPI dans un plasma PDP déficient en TFPI. Cette augmentation est toutefois nettement plus élevée avec les CML, suggérant un rôle synergique du TFPI cellulaire avec la PCa dans l'inhibition de la génération de thrombine plus efficace avec les CML qu'avec les CE. Ce résultat a été renforcé par l'observation que la sensibilité des CML à la PCa devient moins importante en présence de concentrations élevées de FT alors que la sensibilité des CE à la PCa est indépendante de la concentration de FT ajouté en thrombinographie (**Figure 69**). Ainsi, le FT à concentrations élevées peut neutraliser l'effet synergique du TFPI avec la PCa exogène à la surface des CML. Ce résultat pourrait ajouter un mécanisme supplémentaire impliqué dans la régulation de la génération de thrombine sur la surface des cellules vasculaires par la PCa.

Le mécanisme par lequel le TFPI joue un rôle synergique avec la PCa pour inhiber la génération de thrombine à la surface cellulaire n'est pas encore élucidé. Cependant, plusieurs interactions moléculaires ont été rapportées entre le TFPI et le système de la PCa (160,268) : Hackeng *et al* (160) ont montré que le TFPI joue comme un cofacteur de la PS pour exercer ses effets anticoagulants et très récemment, Schuepbach *et al* ont montré que la PCa peut libérer le domaine Kunitz-1 de TFPI (nécessaire pour la liaison au complexe FT-FVIIa) associé à la surface des lignées de CE humaines (269).

La participation des cellules vasculaires dans la génération de thrombine n'est pas restreinte à la thrombine générée *in situ* à la surface de ces cellules. Plusieurs cellules (sanguines et vasculaires) contribuent également à la diffusion de la génération de thrombine en libérant des MP présentant une activité procoagulante importante (186,270). Nous avons confirmé l'observation de Leroyer *et al* (210) que la génération de thrombine *in vitro* à la surface de MP plaquettaires est significativement moins importante qu'à la surface des MP issues d'autres cellules sanguines. La comparaison de la génération de thrombine avec les MP issues de différentes cellules n'était pas dans le même sens que notre observation concernant la comparaison de la génération de thrombine à la surface des cellules d'origine. Pour les

cellules, la génération de thrombine est plus importante à la surface des plaquettes alors que pour les MP, elle est plus importante à la surface des MP-CML. Nous avons expliqué ces résultats discordants entre les MP et les cellules d'origine par une augmentation significative de l'activité FT à la surface des MP vasculaires de 22,7 fois à la surface des MP-CE et 3,6 fois à la surface des MP-CML par rapport aux CE et CML respectivement, alors qu'aucune activité FT a été détectée à la surface des MP plaquettaires.

De plus, la comparaison de la sensibilité à la PCa entre les MP et leurs cellules d'origine montre que les MP plaquettaires sont beaucoup plus sensibles à la PCa que les plaquettes, et inversement, les MP-CE et les MP-CML sont beaucoup moins sensibles à la PCa que les CE, CML respectivement.

Pour les propriétés anti-coagulantes associées aux MP, et dans le but d'expliquer la différence de sensibilité à la PCa entre les trois types de MP, nous avons étudié la cinétique d'inactivation du FVa par la PCa dans un système purifié à la surface des trois types de MP en présence ou non de la PS exogène. L'ajout de la PS n'a pas d'effet sur la cinétique de l'inactivation de FVa avec les MP-CE et MP-CML alors que pour les MP plaquettaires l'ajout de la PS semble ralentir l'inactivation (**Figure 75,76**). Comme pour les CE et CML, Les résultats de l'inactivation du FVa par la PCa à la surface des MP issues des trois types cellulaires dans un système purifié semblent en désaccord avec les données thrombinographiques puisque l'inactivation avec les MP-CE semble le plus efficace dans un système purifié alors que c'est l'inverse dans la thrombinographie. En thrombinographie, le facteur Va est impliqué dans l'activité procoagulante de la prothrombinase ainsi que dans l'inactivation par la PCa exogène, alors que dans le système purifié d'inactivation du FVa par la PCa, les autres facteurs du complexe prothrombinase sont absents. Les CE stimulées expriment le FV, de récepteurs membranaires pour le FIX/IXa, et le FXa, ce qui suggère l'existence de ces récepteurs à la surface des MP-CE résultant de l'activation des CE par la ionomycine. Donc, en thrombinographie (où tous les facteurs de coagulation sont présents), le FVa est lié aux complexes ténase et prothrombinases, et donc, il serait bien localisé à la surface des MP-CE, ce qui le protège de l'inactivation par le système de la PCa (172). Cela pourrait expliquer que l'inactivation du FVa par la PCa en présence de CE ou de MP-CE est plus efficace dans un système purifié qu'avec les CML ou de MP-CML et MP plaquettaires respectivement. Cependant, la cinétique d'inactivation du FVa par la PCa plus rapide avec les MP-CML qu'avec les MP plaquettaires suggèrent d'autres propriétés spécifiques des MP plaquettaires responsables de leur réponse différente à la PCa entre thrombinographie et système purifié. Le fait que la PS ne joue pas un rôle de cofacteur de la PCa dans

l'inactivation du FVa dans un système purifié (ni avec les MP ni avec leurs cellules d'origine) est très inattendu et curieux. Tout cela suggère d'autres mécanismes intervenant dans l'inhibition de la génération de thrombine à la surface des MP. Au total, en prenant le paramètre qui combine le travail thrombinique et la sensibilité à la PCa, nous avons constaté que les MP-CE et MP-CML sont plus thrombogènes que les CE et CML, respectivement, contrairement aux MP plaquettaires qui sont beaucoup moins thrombogènes que les plaquettes.

Toutefois, les mécanismes intervenant pour expliquer toutes ces données thrombinographiques avec les MP restent à élucider et ils nécessitent une connaissance plus profonde des protéines exprimées par les MP et de leurs interactions moléculaires au sein des complexes ténase et prothrombinase ainsi qu'au sein des systèmes anticoagulants.

6 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

1) Les résultats obtenus dans cette thèse démontrent que les CML de la paroi vasculaire sont des éléments importants qui peuvent servir comme surfaces appropriées non seulement pour la génération de thrombine mais aussi pour son inhibition par les systèmes anticoagulants du TFPI et de la PCa.

2) Nous avons démontré que le potentiel thrombinique ainsi que la sensibilité à la PCa à la surface des CML du rat dépendent du génotype des rats Zucker utilisés : le travail thrombinique et la sensibilité à la PCa à la surface des CML aortiques du rat Zucker obèse sont plus importants qu'à la surface des CML aortiques du rat Zucker contrôle. Comme nous l'avons montré, la rigidité artérielle pour ces rats obèses étaient liées à des propriétés procoagulantes diminuées au niveau des CML aortiques expliquées, en partie, par une moindre expression de phospholipides anioniques et une élévation de sensibilité à la PCa.

3) Nous avons démontré que les contraintes mécaniques auxquelles les CML de la paroi peuvent être soumises dans certains cas pathologiques (hypertension) peuvent modifier le potentiel thrombinique à la surface de ces cellules via l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ qui joue le rôle d'un récepteur de la prothrombine. Cette intégrine participe également aux propriétés procoagulantes des CML en modulant la génération de thrombine à leur surface en l'absence et en présence de contraintes mécaniques.

4) L'étude des propriétés pro-et anti-coagulantes des CML aortiques humaines, *in vitro*, en les comparant avec d'autres cellules de la paroi (CE) ainsi qu'avec des cellules de la lumière vasculaires (les plaquettes) a montré que le système anticoagulant de la PCa et la synergie PCa-TFPI sont plus efficaces avec les CML qu'avec les CE. De plus, la moindre sensibilité au FT observée avec les CML sur la génération de thrombine à leur surface, pourrait s'ajouter au système anticoagulant de la PCa pour expliquer le travail thrombinique similaire avec les deux types cellulaires, malgré l'activité FT beaucoup plus importante à la surface des CML qu'à la surface des CE.

5) La comparaison entre la thrombogénicité entre des CE, CML et plaquettes humaines identifie les plaquettes comme les surfaces cellulaires les plus thrombogènes, alors que cette

comparaison entre les MP dérivées de ces trois types cellulaires identifie les MP-CML comme les surfaces les plus thrombogènes. La comparaison entre les MP et leurs cellules d'origine montre que les MP vasculaires (dérivées des CE et CML) sont plus thrombogènes que leurs cellules d'origine alors que la thrombogénicité des plaquettes et des MP plaquettaires est similaire.

6) En conclusion, la génération de thrombine à la surfaces des cellules vasculaires, *in vitro*, serait déterminée par des mécanismes complexes impliquant les propriétés pro-et anti-coagulantes associées à ces cellules. Ainsi, la génération de thrombine est le résultat de l'équilibre entre ces propriétés opposées. Nos résultats démontrent un rôle majeur du système anticoagulant de la PCa dans la modulation de la génération de thrombine à la surface des cellules vasculaires ainsi qu'à la surface des MP dérivées de ces cellules fournissant les premières données expérimentales sur l'importance de ce système dynamique dans la détermination de la génération de thrombine à la surface des cellules vasculaires et des MP dérivées de ces cellules.

Plusieurs perspectives peuvent être proposées pour compléter ce travail, concernant l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la synergie observée entre les deux systèmes anticoagulants TFPI et PCa à la surface des cellules vasculaires. Les données thrombinographiques observées avec les MP cellulaires sont à élucider par une étude similaire à celle effectuée avec les cellules vasculaires en déterminant les facteurs pro-et anti-coagulants pouvant être exprimés à la surface de ces MP, notamment une étude de la synergie entre la PCa et le TFPI dans l'inhibition de la génération de thrombine à la surface des MP similaire avec celle effectuée avec leurs cellules d'origine.

Afin d'être plus proche de l'environnement *in vivo*, notre perspective principal serait d'utiliser la thrombinographie pour étudier la génération de thrombine dans un tissu vasculaire complet en présence de PDP ou PRP qui nous permettra de voir l'effet total des différents composants de la paroi sur la génération de thrombine pariétale.

Enfin, nous envisagerons d'autres perspectives cliniques, concernant l'étude de la génération de thrombine à la surface des CML issues des modèles pathologiques d'hypertension : (rats SHR), ou des CML issues des plaques d'athérosclérose (plaques d'athérosclérose humaines ou souris apoE^{-/-}). Ces dernières migrent dans l'intima pour devenir en contact avec le sang lors de la rupture ou fissure de plaque, et ainsi, elles peuvent éventuellement participer à la

formation du thrombus dans la plaque d'athérome compliquant le phénomène d'athérombose.

Références

1. Boneu B, Cazenave JP. Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose. 1997; 2^eed. Reims: Boehringer Ingelheim France.
2. Owens AP3, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ. Res.* 2011 Mai 13;108(10):1284-1297.
3. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002 Sep 1;22(9):1381-1389.
4. Pathak A, Zhao R, Monroe DM, Roberts HR, Sheridan BC, Selzman CH, et al. Thrombin generation in vascular tissue. *J. Thromb. Haemost.* 2006 Jan;4(1):60-67.
5. Flynn PD, Byrne CD, Baglin TP, Weissberg PL, Bennett MR. Thrombin generation by apoptotic vascular smooth muscle cells. *Blood.* 1997 Juin 15;89(12):4378-4384.
6. 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 Nov 26;114(23):4886-4896.
7. Byzova TV, Plow EF. Networking in the hemostatic system. Integrin α IIb β 3 binds prothrombin and influences its activation. *J. Biol. Chem.* 1997 Oct 24;272(43):27183-27188.
8. Byzova TV, Plow EF. Activation of α V β 3 on vascular cells controls recognition of prothrombin. *J. Cell Biol.* 1998 Déc 28;143(7):2081-2092.
9. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoort R, et al. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 2003;33(1):4-15.
10. Cromer WE, Mathis JM, Granger DN, Chaitanya GV, Alexander JS. Role of the endothelium in inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol.* 2011 Fév 7;17(5):578-593.
11. Michiels C. Endothelial cell functions. *J. Cell. Physiol.* 2003 Sep;196(3):430-443.
12. Pries AR, Kuebler WM. Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol.* 2006;(176 Pt 1):1-40.
13. van Hinsbergh VWM. Endothelium-role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol* [Internet]. 2011 Aoû 4; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21845431>
14. Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. The endothelial surface layer. *Pflugers Arch.* 2000 Sep;440(5):653-666.
15. Bazzoni G. The JAM family of junctional adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2003 Oct;15(5):525-530.
16. Agarwal R, Gomberg-Maitland M. Current therapeutics and practical management

- strategies for pulmonary arterial hypertension. *Am. Heart J.* 2011 Aoû;162(2):201-213.
17. Kawabe J, Ushikubi F, Hasebe N. Prostacyclin in vascular diseases. - Recent insights and future perspectives -. *Circ. J.* 2010 Mai;74(5):836-843.
 18. Vanhoutte PM. Regeneration of the endothelium in vascular injury. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2010 Aoû;24(4):299-303.
 19. Freedman JE. Oxidative stress and platelets. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008 Mar;28(3):s11-16.
 20. Yamamizu K, Yamashita JK. Roles of cyclic adenosine monophosphate signaling in endothelial cell differentiation and arterial-venous specification during vascular development. *Circ. J.* 2011 Fév;75(2):253-260.
 21. Jin RC, Voetsch B, Loscalzo J. Endogenous mechanisms of inhibition of platelet function. *Microcirculation.* 2005 Mai;12(3):247-258.
 22. Taylor KR, Gallo RL. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J.* 2006 Jan;20(1):9-22.
 23. Rau JC, Beaulieu LM, Huntington JA, Church FC. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J. Thromb. Haemost.* 2007 Juil;5 Suppl 1:102-115.
 24. Maroney SA, Mast AE. Expression of tissue factor pathway inhibitor by endothelial cells and platelets. *Transfus. Apher. Sci.* 2008 Fév;38(1):9-14.
 25. Van de Wouwer M, Collen D, Conway EM. Thrombomodulin-protein C-EPCR system: integrated to regulate coagulation and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004 Aoû;24(8):1374-1383.
 26. Dahlbäck B. The tale of protein S and C4b-binding protein, a story of affection. *Thromb. Haemost.* 2007 Juil;98(1):90-96.
 27. Collen D, Lijnen HR. The tissue-type plasminogen activator story. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2009 Aoû;29(8):1151-1155.
 28. Puhlmann M, Weinreich DM, Farma JM, Carroll NM, Turner EM, Alexander HR. Interleukin-1beta induced vascular permeability is dependent on induction of endothelial tissue factor (TF) activity. *J Transl Med.* 2005 Sep 30;3:37.
 29. Becker BF, Heindl B, Kupatt C, Zahler S. Endothelial function and hemostasis. *Z Kardiol.* 2000 Mar;89(3):160-167.
 30. Zhou J, Li H, Fu Y, Shi J, Hou J, Zhang Y, et al. Arsenic trioxide induces procoagulant activity through phosphatidylserine exposure and microparticle generation in endothelial cells. *Thromb. Res.* 2011 Mai;127(5):466-472.
 31. Kaneko T, Fujii S, Matsumoto A, Goto D, Makita N, Hamada J, et al. Induction of Tissue Factor Expression in Endothelial Cells by Basic Fibroblast Growth Factor and its Modulation by Fenofibric acid. *Thromb J.* 2003 Oct 11;1(1):6.
 32. Strukova S. Blood coagulation-dependent inflammation. Coagulation-dependent inflammation and inflammation-dependent thrombosis. *Front. Biosci.* 2006;11:59-80.

33. Pawlinski R, Mackman N. Cellular sources of tissue factor in endotoxemia and sepsis. *Thromb. Res.* 2010 Avr;125 Suppl 1:S70-73.
34. Huang ZH, Bates EJ, Ferrante JV, Hii CS, Poulos A, Robinson BS, et al. Inhibition of stimulus-induced endothelial cell intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, and vascular cellular adhesion molecule-1 expression by arachidonic acid and its hydroxy and hydroperoxy derivatives. *Circ. Res.* 1997 Fév;80(2):149-158.
35. Haga JH, Li YJ, Chien S. Molecular basis of the effects of mechanical stretch on vascular smooth muscle cells. *J Biomech.* 2007;40(5):947-960.
36. 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 Mar;278(3):H748-754.
37. Cheng J, Zhang J, Merched A, Zhang L, Zhang P, Truong L, et al. Mechanical stretch inhibits oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells by up-regulating integrin alphavbeta3 and stabilization of PINCH-1. *J. Biol. Chem.* 2007 Nov 23;282(47):34268-34275.
38. Albinsson S, Hellstrand P. Integration of signal pathways for stretch-dependent growth and differentiation in vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2007 Aoû;293(2):C772-782.
39. Qu M, Liu B, Wang H, Yan Z, Shen B, Jiang Z. Frequency-dependent phenotype modulation of vascular smooth muscle cells under cyclic mechanical strain. *J. Vasc. Res.* 2007;44(5):345-353.
40. 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 Nov;38(5):1038-1043.
41. Regnault V, Perret-Guillaume C, Kearney-Schwartz A, Max J, Labat C, Louis H, et al. Tissue factor pathway inhibitor: a new link among arterial stiffness, pulse pressure, and coagulation in postmenopausal women. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011 Mai;31(5):1226-1232.
42. Newham P, Humphries MJ. Integrin adhesion receptors: structure, function and implications for biomedicine. *Mol Med Today.* 1996 Juil;2(7):304-313.
43. Campbell ID, Humphries MJ. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2011 Mar;3(3). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21421922>
44. Ruggiero F, Comte J, Cabañas C, Garrone R. Structural requirements for alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrin mediated cell adhesion to collagen V. *J. Cell. Sci.* 1996 Juil;109 (Pt 7):1865-1874.
45. Ruoslahti E, Reed JC. Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell.* 1994 Mai 20;77(4):477-478.
46. Ye F, Kim C, Ginsberg MH. Molecular mechanism of inside-out integrin regulation. *J. Thromb. Haemost.* 2011 Juil;9 Suppl 1:20-25.

47. Martin KH, Slack JK, Boerner SA, Martin CC, Parsons JT. Integrin connections map: to infinity and beyond. *Science*. 2002 Mai 31;296(5573):1652-1653.
48. Whittaker CA, Hynes RO. Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol. Biol. Cell*. 2002 Oct;13(10):3369-3387.
49. Byzova TV, Rabbani R, D'Souza SE, Plow EF. Role of integrin alpha(v)beta3 in vascular biology. *Thromb. Haemost.* 1998 Nov;80(5):726-734.
50. Duperray A, Troesch A, Berthier R, Chagnon E, Frachet P, Uzan G, et al. Biosynthesis and assembly of platelet GPIIb-IIIa in human megakaryocytes: evidence that assembly between pro-GPIIb and GPIIIa is a prerequisite for expression of the complex on the cell surface. *Blood*. 1989 Oct;74(5):1603-1611.
51. Bennett JS, Berger BW, Billings PC. The structure and function of platelet integrins. *J. Thromb. Haemost.* 2009 Jul;7 Suppl 1:200-205.
52. Mohri H, Fujimura Y, Shima M, Yoshioka A, Houghten RA, Ruggeri ZM, et al. Structure of the von Willebrand factor domain interacting with glycoprotein Ib. *J. Biol. Chem*. 1988 Déc 5;263(34):17901-17904.
53. Löwenberg EC, Meijers JCM, Levi M. Platelet-vessel wall interaction in health and disease. *Neth J Med*. 2010 Juin;68(6):242-251.
54. 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 Nov 1;23(11):1971-1978.
55. Schwartz MA, Schaller MD, Ginsberg MH. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 1995;11:549-599.
56. Andrews RK, Berndt MC. Platelet physiology and thrombosis. *Thromb. Res*. 2004;114(5-6):447-453.
57. Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev*. 1993 Mar;7(1):52-62.
58. McNicol A, Israels SJ. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thromb. Res*. 1999 Jul 1;95(1):1-18.
59. Camire RM, Pollak ES, Kaushansky K, Tracy PB. Secretable human platelet-derived factor V originates from the plasma pool. *Blood*. 1998 Nov 1;92(9):3035-3041.
60. White JG. The dense bodies of human platelets: inherent electron opacity of the serotonin storage particles. *Blood*. 1969 Avr;33(4):598-606.
61. Holmsen H, Weiss HJ. Secretable storage pools in platelets. *Annu. Rev. Med*. 1979;30:119-134.
62. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2008 Mar;28(3):403-412.
63. Andrews RK, López JA, Berndt MC. Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 1997 Jan;29(1):91-105.

64. Andrews RK, Gardiner EE, Shen Y, Whisstock JC, Berndt MC. Glycoprotein Ib-IX-V. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2003 Aoû;35(8):1170-1174.
65. Solum NO. Procoagulant expression in platelets and defects leading to clinical disorders. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999 Déc;19(12):2841-2846.
66. Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RF. Platelet procoagulant activity: physiological significance and mechanisms of exposure. *Blood Rev.* 1991 Sep;5(3):146-154.
67. Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DW, Zwaal RF. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999 Aoû 18;1439(3):317-330.
68. Morel O, Toti F, Jesel L, Freyssinet J. Mechanisms of microparticle generation: on the trail of the mitochondrion! *Semin. Thromb. Hemost.* 2010 Nov;36(8):833-844.
69. Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RF. Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1983 Déc 7;736(1):57-66.
70. Zwaal RFA, Comfurius P, Bevers EM. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 2005 Mai;62(9):971-988.
71. O'Brien DP. The molecular biology and biochemistry of tissue factor. *Baillieres Clin. Haematol.* 1989 Oct;2(4):801-820.
72. Egorina EM, Sovershaev MA, Osterud B. Regulation of tissue factor procoagulant activity by post-translational modifications. *Thromb. Res.* 2008;122(6):831-837.
73. Edgington TS, Mackman N, Brand K, Ruf W. The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thromb. Haemost.* 1991 Juil 12;66(1):67-79.
74. Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J, Vele O, Lieb M, Nemerson Y. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat. Med.* 2003 Avr;9(4):458-462.
75. Kelley RF, Costas KE, O'Connell MP, Lazarus RA. Analysis of the factor VIIa binding site on human tissue factor: effects of tissue factor mutations on the kinetics and thermodynamics of binding. *Biochemistry.* 1995 Aoû 22;34(33):10383-10392.
76. Sun NC, McAfee WM, Hum GJ, Weiner JM. Hemostatic abnormalities in malignancy, a prospective study of one hundred eight patients. Part I. Coagulation studies. *Am. J. Clin. Pathol.* 1979 Jan;71(1):10-16.
77. Browder T, Folkman J, Pirie-Shepherd S. The hemostatic system as a regulator of angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 2000 Jan 21;275(3):1521-1524.
78. Cui MZ, Parry GC, Oeth P, Larson H, Smith M, Huang RP, et al. Transcriptional regulation of the tissue factor gene in human epithelial cells is mediated by Sp1 and EGR-1. *J. Biol. Chem.* 1996 Fév 2;271(5):2731-2739.
79. Roberts HR, Monroe DM, Escobar MA. Current concepts of hemostasis: implications for therapy. *Anesthesiology.* 2004 Mar;100(3):722-730.
80. Brisset A, Terrisse A, Dupouy D, Tellier L, Pech S, Navarro C, et al. Shedding of active tissue factor by aortic smooth muscle cells (SMCs) undergoing apoptosis. *Thromb.*

Haemost. 2003 Sep;90(3):511-518.

81. Eto M, Kouroedov A, Cosentino F, Lüscher TF. Glycogen synthase kinase-3 mediates endothelial cell activation by tumor necrosis factor- α . *Circulation*. 2005 Aoû 30;112(9):1316-1322.
82. Wu S, Aird WC. Thrombin, TNF- α , and LPS exert overlapping but nonidentical effects on gene expression in endothelial cells and vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005 Aoû;289(2):H873-885.
83. Terry CM, Callahan KS. Protein kinase C regulates cytokine-induced tissue factor transcription and procoagulant activity in human endothelial cells. *J. Lab. Clin. Med.* 1996 Jan;127(1):81-93.
84. Steffel J, Akhmedov A, Greutert H, Lüscher TF, Tanner FC. Histamine induces tissue factor expression: implications for acute coronary syndromes. *Circulation*. 2005 Juil 19;112(3):341-349.
85. Lupu C, Westmuckett AD, Peer G, Ivanciu L, Zhu H, Taylor FB, et al. Tissue factor-dependent coagulation is preferentially up-regulated within arterial branching areas in a baboon model of Escherichia coli sepsis. *Am. J. Pathol.* 2005 Oct;167(4):1161-1172.
86. Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, et al. Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood*. 2003 Oct 1;102(7):2678-2683.
87. McArdle CS, McKee RF, Finlay IG, Wotherspoon H, Hole DJ. Improvement in survival following surgery for colorectal cancer. *Br J Surg*. 2005 Aoû;92(8):1008-1013.
88. Corseaux D, Meurice T, Six I, Rugeri L, Ezekowitz MD, Rouvier P, et al. Basic fibroblast growth factor increases tissue factor expression in circulating monocytes and in vascular wall. *Circulation*. 2000 Avr 25;101(16):2000-2006.
89. Murata K, Moriyama M. Isoleucine, an essential amino acid, prevents liver metastases of colon cancer by antiangiogenesis. *Cancer Res*. 2007 Avr 1;67(7):3263-3268.
90. Szotowski B, Goldin-Lang P, Antoniak S, Bogdanov VY, Pathirana D, Pauschinger M, et al. Alterations in myocardial tissue factor expression and cellular localization in dilated cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2005 Avr 5;45(7):1081-1089.
91. Szotowski B, Antoniak S, Poller W, Schultheiss H, Rauch U. Procoagulant soluble tissue factor is released from endothelial cells in response to inflammatory cytokines. *Circ. Res*. 2005 Juin 24;96(12):1233-1239.
92. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roqué M, Fallon JT, et al. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999 Mar 2;96(5):2311-2315.
93. Girard TJ, Nicholson NS. The role of tissue factor/factor VIIa in the pathophysiology of acute thrombotic formation. *Curr Opin Pharmacol*. 2001 Avr;1(2):159-163.
94. Hu Z, Garen A. Targeting tissue factor on tumor vascular endothelial cells and tumor cells for immunotherapy in mouse models of prostatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001 Oct 9;98(21):12180-12185.

95. Asada Y, Hara S, Tsuneyoshi A, Hatakeyama K, Kisanuki A, Marutsuka K, et al. Fibrin-rich and platelet-rich thrombus formation on neointima: recombinant tissue factor pathway inhibitor prevents fibrin formation and neointimal development following repeated balloon injury of rabbit aorta. *Thromb. Haemost.* 1998 Sep;80(3):506-511.
96. Butenas S, Bouchard BA, Brummel-Ziedins KE, Parhami-Seren B, Mann KG. Tissue factor activity in whole blood. *Blood.* 2005 Apr 1;105(7):2764-2770.
97. Day SM, Reeve JL, Pedersen B, Farris DM, Myers DD, Im M, et al. Macrovascular thrombosis is driven by tissue factor derived primarily from the blood vessel wall. *Blood.* 2005 Jan 1;105(1):192-198.
98. Engelmann B, Luther T, Müller I. Intravascular tissue factor pathway--a model for rapid initiation of coagulation within the blood vessel. *Thromb. Haemost.* 2003 Jan;89(1):3-8.
99. Furie B, Furie BC. The molecular basis of blood coagulation. *Cell.* 1988 May 20;53(4):505-518.
100. McMullen BA, Fujikawa K, Davie EW. Location of the disulfide bonds in human coagulation factor XI: the presence of tandem apple domains. *Biochemistry.* 1991 Feb 26;30(8):2056-2060.
101. Lorand L. Factor XIII: structure, activation, and interactions with fibrinogen and fibrin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2001;936:291-311.
102. Butenas S, Mann KG. Blood coagulation. *Biochemistry Mosc.* 2002 Jan;67(1):3-12.
103. De Cristofaro R, De Candia E, Landolfi R, Rutella S, Hall SW. Structural and functional mapping of the thrombin domain involved in the binding to the platelet glycoprotein Ib. *Biochemistry.* 2001 Nov 6;40(44):13268-13273.
104. De Candia E, Hall SW, Rutella S, Landolfi R, Andrews RK, De Cristofaro R. Binding of thrombin to glycoprotein Ib accelerates the hydrolysis of Par-1 on intact platelets. *J. Biol. Chem.* 2001 Feb 16;276(7):4692-4698.
105. Hultin MB. Modulation of thrombin-mediated activation of factor VIII:C by calcium ions, phospholipid, and platelets. *Blood.* 1985 Jul;66(1):53-58.
106. Rosing J, Tans G, Govers-Riemslog JW, Zwaal RF, Hemker HC. The role of phospholipids and factor Va in the prothrombinase complex. *J. Biol. Chem.* 1980 Jan 10;255(1):274-283.
107. Sims PJ, Wiedmer T, Esmon CT, Weiss HJ, Shattil SJ. Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity. *J. Biol. Chem.* 1989 Oct 15;264(29):17049-17057.
108. Miletich JP, Jackson CM, Majerus PW. Properties of the factor Xa binding site on human platelets. *J. Biol. Chem.* 1978 Oct 10;253(19):6908-6916.
109. Tracy PB, Nesheim ME, Mann KG. Platelet factor Xa receptor. *Meth. Enzymol.* 1992;215:329-360.
110. Briedé JJ, Heemskerk JW, van't Veer C, Hemker HC, Lindhout T. Contribution of platelet-derived factor Va to thrombin generation on immobilized collagen- and

- fibrinogen-adherent platelets. *Thromb. Haemost.* 2001 Mar;85(3):509-513.
111. Bouchard BA, Catcher CS, Thrash BR, Adida C, Tracy PB. Effector cell protease receptor-1, a platelet activation-dependent membrane protein, regulates prothrombinase-catalyzed thrombin generation. *J. Biol. Chem.* 1997 Avr 4;272(14):9244-9251.
 112. Morrissey JH, Macik BG, Neuenschwander PF, Comp PC. Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. *Blood.* 1993 Fév 1;81(3):734-744.
 113. Osterud B. The role of platelets in decrypting monocyte tissue factor. *Semin. Hematol.* 2001 Oct;38(4 Suppl 12):2-5.
 114. Komiyama Y, Pedersen AH, Kisiel W. Proteolytic activation of human factors IX and X by recombinant human factor VIIa: effects of calcium, phospholipids, and tissue factor. *Biochemistry.* 1990 Oct 9;29(40):9418-9425.
 115. Nakagaki T, Foster DC, Berkner KL, Kisiel W. Initiation of the extrinsic pathway of blood coagulation: evidence for the tissue factor dependent autoactivation of human coagulation factor VII. *Biochemistry.* 1991 Nov 12;30(45):10819-10824.
 116. Lawson JH, Mann KG. Cooperative activation of human factor IX by the human extrinsic pathway of blood coagulation. *J. Biol. Chem.* 1991 Jun 15;266(17):11317-11327.
 117. Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J. Thromb. Haemost.* 2005 Aoû;3(8):1800-1814.
 118. Mosesson MW. Fibrin polymerization and its regulatory role in hemostasis. *J. Lab. Clin. Med.* 1990 Juil;116(1):8-17.
 119. Bauer KA, Rosenberg RD. Role of antithrombin III as a regulator of in vivo coagulation. *Semin. Hematol.* 1991 Jan;28(1):10-18.
 120. Blajchman MA, Austin RC, Fernandez-Rachubinski F, Sheffield WP. Molecular basis of inherited human antithrombin deficiency. *Blood.* 1992 Nov 1;80(9):2159-2171.
 121. Nesheim ME. A simple rate law that describes the kinetics of the heparin-catalyzed reaction between antithrombin III and thrombin. *J. Biol. Chem.* 1983 Déc 10;258(23):14708-14717.
 122. Beeler D, Rosenberg R, Jordan R. Fractionation of low molecular weight heparin species and their interaction with antithrombin. *J. Biol. Chem.* 1979 Avr 25;254(8):2902-2913.
 123. Caplice NM, Mueske CS, Kleppe LS, Peterson TE, Broze GJJ, Simari RD. Expression of tissue factor pathway inhibitor in vascular smooth muscle cells and its regulation by growth factors. *Circ. Res.* 1998 Déc 14;83(12):1264-1270.
 124. Lwaleed BA, Bass PS. Tissue factor pathway inhibitor: structure, biology and involvement in disease. *J. Pathol.* 2006 Fév;208(3):327-339.
 125. Kasthuri RS, Glover SL, Boles J, Mackman N. Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor as key regulators of global hemostasis: measurement of their levels in coagulation assays. *Semin. Thromb. Hemost.* 2010 Oct;36(7):764-771.

126. Novotny WF, Brown SG, Miletich JP, Rader DJ, Broze GJJ. Plasma antigen levels of the lipoprotein-associated coagulation inhibitor in patient samples. *Blood*. 1991 Jul 15;78(2):387-393.
127. Baugh RJ, Broze GJJ, Krishnaswamy S. Regulation of extrinsic pathway factor Xa formation by tissue factor pathway inhibitor. *J. Biol. Chem*. 1998 Fév 20;273(8):4378-4386.
128. Broze GJJ, Girard TJ, Novotny WF. Regulation of coagulation by a multivalent Kunitz-type inhibitor. *Biochemistry*. 1990 Aoû 21;29(33):7539-7546.
129. Hackeng TM, Rosing J. Protein S as cofactor for TFPI. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2009 Déc;29(12):2015-2020.
130. Petersen LC, Bjørn SE, Olsen OH, Nordfang O, Norris F, Norris K. Inhibitory properties of separate recombinant Kunitz-type-protease-inhibitor domains from tissue-factor-pathway inhibitor. *Eur. J. Biochem*. 1996 Jan 15;235(1-2):310-316.
131. Johnson K, Zaror I, Bauer D, Choi Y, Creasey A, Innis M. Activity of secreted Kunitz domain 1 variants of tissue factor pathway inhibitor. *Thromb. Haemost.* 1998 Oct;80(4):585-587.
132. Fischer EG, Riewald M, Huang HY, Miyagi Y, Kubota Y, Mueller BM, et al. Tumor cell adhesion and migration supported by interaction of a receptor-protease complex with its inhibitor. *J. Clin. Invest*. 1999 Nov;104(9):1213-1221.
133. Peerschke EIB, Petrovan RJ, Ghebrehiwet B, Ruf W. Tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2) recognizes the complement and kininogen binding protein gC1qR/p33 (gC1qR): implications for vascular inflammation. *Thromb. Haemost.* 2004 Oct;92(4):811-819.
134. Hembrough TA, Ruiz JF, Papathanassiou AE, Green SJ, Strickland DK. Tissue factor pathway inhibitor inhibits endothelial cell proliferation via association with the very low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem*. 2001 Avr 13;276(15):12241-12248.
135. Shinoda E, Yui Y, Hattori R, Tanaka M, Inoue R, Aoyama T, et al. Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel mitogen for vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem*. 1999 Fév 26;274(9):5379-5384.
136. Enjyoji K, Miyata T, Kamikubo Y, Kato H. Effect of heparin on the inhibition of factor Xa by tissue factor pathway inhibitor: a segment, Gly212-Phe243, of the third Kunitz domain is a heparin-binding site. *Biochemistry*. 1995 Mai 2;34(17):5725-5735.
137. Broze GJJ, Lange GW, Duffin KL, MacPhail L. Heterogeneity of plasma tissue factor pathway inhibitor. *Blood Coagul. Fibrinolysis*. 1994 Aoû;5(4):551-559.
138. Shimura M, Wada H, Nakasaki T, Hiyoyama K, Mori Y, Nishikawa M, et al. Increased truncated form of plasma tissue factor pathway inhibitor levels in patients with disseminated intravascular coagulation. *Am. J. Hematol*. 1999 Fév;60(2):94-98.
139. Pirie-Shepherd SR. Regulation of angiogenesis by the hemostatic system. *Front. Biosci*. 2003 Jan 1;8:d286-293.
140. Esmon CT. The protein C pathway. *Chest*. 2003 Sep;124(3 Suppl):26S-32S.

141. Dahlbäck B, Villoutreix BO. Molecular recognition in the protein C anticoagulant pathway. *J. Thromb. Haemost.* 2003 Juil;1(7):1525-1534.
142. Esmon CT. The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J. Biol. Chem.* 1989 Mar 25;264(9):4743-4746.
143. Rezaie AR. Regulation of the protein C anticoagulant and antiinflammatory pathways. *Curr. Med. Chem.* 2010;17(19):2059-2069.
144. Dahlbäck B, Villoutreix BO. The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Lett.* 2005 Jun 13;579(15):3310-3316.
145. Ye J, Liu LW, Esmon CT, Johnson AE. The fifth and sixth growth factor-like domains of thrombomodulin bind to the anion-binding exosite of thrombin and alter its specificity. *J. Biol. Chem.* 1992 Jun 5;267(16):11023-11028.
146. Perera L, Foley C, Darden TA, Stafford D, Mather T, Esmon CT, et al. Modeling zymogen protein C. *Biophys. J.* 2000 Déc;79(6):2925-2943.
147. Esmon CT, Gu JM, Xu J, Qu D, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S. Regulation and functions of the protein C anticoagulant pathway. *Haematologica.* 1999 Avr;84(4):363-368.
148. Dahlbäck B, Villoutreix BO. Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005 Juil;25(7):1311-1320.
149. Esmon CT. Structure and functions of the endothelial cell protein C receptor. *Crit. Care Med.* 2004 Mai;32(5 Suppl):S298-301.
150. Bretschneider E, Uzonyi B, Weber A, Fischer JW, Pape R, Lötzer K, et al. Human vascular smooth muscle cells express functionally active endothelial cell protein C receptor. *Circ. Res.* 2007 Fév 2;100(2):255-262.
151. Sturn DH, Kaneider NC, Feistritz C, Djanani A, Fukudome K, Wiedermann CJ. Expression and function of the endothelial protein C receptor in human neutrophils. *Blood.* 2003 Aoû 15;102(4):1499-1505.
152. Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS, Ferrell GL, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996 Sep 17;93(19):10212-10216.
153. Fukudome K, Ye X, Tsuneyoshi N, Tokunaga O, Sugawara K, Mizokami H, et al. Activation mechanism of anticoagulant protein C in large blood vessels involving the endothelial cell protein C receptor. *J. Exp. Med.* 1998 Avr 6;187(7):1029-1035.
154. Laszik Z, Mitro A, Taylor FBJ, Ferrell G, Esmon CT. Human protein C receptor is present primarily on endothelium of large blood vessels: implications for the control of the protein C pathway. *Circulation.* 1997 Nov 18;96(10):3633-3640.
155. Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Ruf W. Activated protein C signals through the thrombin receptor PAR1 in endothelial cells. *J. Endotoxin Res.* 2003;9(5):317-321.
156. Cheng T, Liu D, Griffin JH, Fernández JA, Castellino F, Rosen ED, et al. Activated

protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat. Med.* 2003 Mar;9(3):338-342.

157. Van de Wouwer M, Collen D, Conway EM. Thrombomodulin-protein C-EPCR system: integrated to regulate coagulation and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004 Apr;24(8):1374-1383.
158. Rezende SM, Simmonds RE, Lane DA. Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and the protein S-C4b binding protein complex. *Blood.* 2004 Fév 15;103(4):1192-1201.
159. Dahlbäck B. Inhibition of protein C cofactor function of human and bovine protein S by C4b-binding protein. *J. Biol. Chem.* 1986 Sep 15;261(26):12022-12027.
160. Hackeng TM, van 't Veer C, Meijers JC, Bouma BN. Human protein S inhibits prothrombinase complex activity on endothelial cells and platelets via direct interactions with factors Va and Xa. *J. Biol. Chem.* 1994 Apr 19;269(33):21051-21058.
161. Heeb MJ, Mesters RM, Tans G, Rosing J, Griffin JH. Binding of protein S to factor Va associated with inhibition of prothrombinase that is independent of activated protein C. *J. Biol. Chem.* 1993 Fév 5;268(4):2872-2877.
162. Heeb MJ, Rosing J, Bakker HM, Fernandez JA, Tans G, Griffin JH. Protein S binds to and inhibits factor Xa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994 Mar 29;91(7):2728-2732.
163. Koppelman SJ, Hackeng TM, Sixma JJ, Bouma BN. Inhibition of the intrinsic factor X activating complex by protein S: evidence for a specific binding of protein S to factor VIII. *Blood.* 1995 Apr 1;86(3):1062-1071.
164. van Wijnen M, Stam JG, van't Veer C, Meijers JC, Reitsma PH, Bertina RM, et al. The interaction of protein S with the phospholipid surface is essential for the activated protein C-independent activity of protein S. *Thromb. Haemost.* 1996 Sep;76(3):397-403.
165. Norström EA, Tran S, Steen M, Dahlbäck B. Effects of factor Xa and protein S on the individual activated protein C-mediated cleavages of coagulation factor Va. *J. Biol. Chem.* 2006 Oct 20;281(42):31486-31494.
166. Solymoss S, Tucker MM, Tracy PB. Kinetics of inactivation of membrane-bound factor Va by activated protein C. Protein S modulates factor Xa protection. *J. Biol. Chem.* 1988 Oct 15;263(29):14884-14890.
167. Esmon CT. Crosstalk between inflammation and thrombosis. *Maturitas.* 2004 Avr 15;47(4):305-314.
168. Mann KG, Kalafatis M. Factor V: a combination of Dr Jekyll and Mr Hyde. *Blood.* 2003 Jan 1;101(1):20-30.
169. Bukys MA, Orban T, Kim PY, Beck DO, Nesheim ME, Kalafatis M. The structural integrity of anion binding exosite I of thrombin is required and sufficient for timely cleavage and activation of factor V and factor VIII. *J. Biol. Chem.* 2006 Juil 7;281(27):18569-18580.
170. Kalafatis M, Rand MD, Mann KG. The mechanism of inactivation of human factor V and human factor Va by activated protein C. *J. Biol. Chem.* 1994 Déc 16;269(50):31869-31880.

171. Nicolaes GA, Tans G, Thomassen MC, Hemker HC, Pabinger I, Varadi K, et al. Peptide bond cleavages and loss of functional activity during inactivation of factor Va and factor VaR506Q by activated protein C. *J. Biol. Chem.* 1995 Sep 8;270(36):21158-21166.
172. Rosing J, Hoekema L, Nicolaes GA, Thomassen MC, Hemker HC, Varadi K, et al. Effects of protein S and factor Xa on peptide bond cleavages during inactivation of factor Va and factor VaR506Q by activated protein C. *J. Biol. Chem.* 1995 Nov 17;270(46):27852-27858.
173. Norström EA, Steen M, Tran S, Dahlbäck B. Importance of protein S and phospholipid for activated protein C-mediated cleavages in factor Va. *J. Biol. Chem.* 2003 Jul 4;278(27):24904-24911.
174. Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood.* 1998 Dec 1;92(11):3983-3996.
175. Pike RN, Buckle AM, le Bonniec BF, Church FC. Control of the coagulation system by serpins. Getting by with a little help from glycosaminoglycans. *FEBS J.* 2005 Oct;272(19):4842-4851.
176. España F, Vicente V, Tabernero D, Scharrer I, Griffin JH. Determination of plasma protein C inhibitor and of two activated protein C-inhibitor complexes in normals and in patients with intravascular coagulation and thrombotic disease. *Thromb. Res.* 1990 Apr 1;59(3):593-608.
177. Prendes MJ, Bielek E, Zechmeister-Machhart M, Vanyek-Zavadil E, Carroll VA, Breuss J, et al. Synthesis and ultrastructural localization of protein C inhibitor in human platelets and megakaryocytes. *Blood.* 1999 Apr 15;94(4):1300-1312.
178. Nishioka J, Ning M, Hayashi T, Suzuki K. Protein C inhibitor secreted from activated platelets efficiently inhibits activated protein C on phosphatidylethanolamine of platelet membrane and microvesicles. *J. Biol. Chem.* 1998 May 1;273(18):11281-11287.
179. Cooper ST, Whinna HC, Jackson TP, Boyd JM, Church FC. Intermolecular interactions between protein C inhibitor and coagulation proteases. *Biochemistry.* 1995 Oct 10;34(40):12991-12997.
180. Huntington JA, Kjellberg M, Stenflo J. Crystal structure of protein C inhibitor provides insights into hormone binding and heparin activation. *Structure.* 2003 Feb;11(2):205-215.
181. Laurell M, Christensson A, Abrahamsson PA, Stenflo J, Lilja H. Protein C inhibitor in human body fluids. Seminal plasma is rich in inhibitor antigen deriving from cells throughout the male reproductive system. *J. Clin. Invest.* 1992 Apr;89(4):1094-1101.
182. Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood.* 1997 Feb 15;89(4):1121-1132.
183. Morel O, Jesel L, Freyssinet J, Toti F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011 Jan;31(1):15-26.
184. Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* 2002 Apr;2(8):569-579.

185. Berckmans RJ, Nieuwland R, Böing AN, Romijn FP, Hack CE, Sturk A. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb. Haemost.* 2001 Avr;85(4):639-646.
186. Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F, et al. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006 Déc;26(12):2594-2604.
187. Boulanger C, Leroyer A, Amabile N, Tedgui A. [Circulating endothelial microparticles: a new marker of vascular injury]. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*. 2008 Juin;57(3):149-154.
188. Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Angelillo-Scherrer A. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thromb. Haemost.* 2009 Mar;101(3):439-451.
189. Sprague DL, Elzey BD, Crist SA, Waldschmidt TJ, Jensen RJ, Ratliff TL. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity: unique delivery of CD154 signal by platelet-derived membrane vesicles. *Blood*. 2008 Mai 15;111(10):5028-5036.
190. Albanese J, Meterissian S, Kontogiannina M, Dubreuil C, Hand A, Sorba S, et al. Biologically active Fas antigen and its cognate ligand are expressed on plasma membrane-derived extracellular vesicles. *Blood*. 1998 Mai 15;91(10):3862-3874.
191. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat. Cell Biol.* 2001 Avr;3(4):339-345.
192. Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, et al. Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood*. 2003 Oct 1;102(7):2678-2683.
193. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Soderland C, Horstman LL, Ahn YS. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb. Res.* 2003 Fév 15;109(4):175-180.
194. Abid Hussein MN, Meesters EW, Osmanovic N, Romijn FP, Nieuwland R, Sturk A. Antigenic characterization of endothelial cell-derived microparticles and their detection ex vivo. *J. Thromb. Haemost.* 2003 Nov;1(11):2434-2443.
195. Sims PJ, Wiedmer T, Esmon CT, Weiss HJ, Shattil SJ. Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity. *J. Biol. Chem.* 1989 Oct 15;264(29):17049-17057.
196. Blanchard N, Lankar D, Faure F, Regnault A, Dumont C, Raposo G, et al. TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *J. Immunol.* 2002 Avr 1;168(7):3235-3241.
197. Sims PJ, Faioni EM, Wiedmer T, Shattil SJ. Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *J. Biol. Chem.* 1988 Déc 5;263(34):18205-18212.
198. Mesri M, Altieri DC. Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. *J. Immunol.* 1998 Oct 15;161(8):4382-4387.

199. Tabibzadeh SS, Kong QF, Kapur S. Passive acquisition of leukocyte proteins is associated with changes in phosphorylation of cellular proteins and cell-cell adhesion properties. *Am. J. Pathol.* 1994 Oct;145(4):930-940.
200. Mause SF, von Hundelshausen P, Zerneck A, Koenen RR, Weber C. Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005 Jul;25(7):1512-1518.
201. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia.* 2006 Mai;20(5):847-856.
202. Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Weglarczyk K, Baran J, Urbanowicz B, Brański P, et al. Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer Immunol. Immunother.* 2006 Jul;55(7):808-818.
203. Castaman G, Yu-Feng L, Battistin E, Rodeghiero F. Characterization of a novel bleeding disorder with isolated prolonged bleeding time and deficiency of platelet microvesicle generation. *Br. J. Haematol.* 1997 Mar;96(3):458-463.
204. Dignat-George F, Boulanger CM. The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011 Jan;31(1):27-33.
205. Furie B, Furie BC. Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation. *Trends Mol Med.* 2004 Avr;10(4):171-178.
206. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2000 Fév 29;101(8):841-843.
207. Sabatier F, Roux V, Anfosso F, Camoin L, Sampol J, Dignat-George F. Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity. *Blood.* 2002 Juin 1;99(11):3962-3970.
208. Silverstein RL. Inflammation, atherosclerosis, and arterial thrombosis: role of the scavenger receptor CD36. *Cleve Clin J Med.* 2009 Avr;76 Suppl 2:S27-30.
209. Ghosh A, Li W, Febbraio M, Espinola RG, McCrae KR, Cockrell E, et al. Platelet CD36 mediates interactions with endothelial cell-derived microparticles and contributes to thrombosis in mice. *J. Clin. Invest.* 2008 Mai;118(5):1934-1943.
210. Leroyer AS, Isobe H, Lesèche G, Castier Y, Wassef M, Mallat Z, et al. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007 Fév 20;49(7):772-777.
211. Joop K, Berckmans RJ, Nieuwland R, Berkhout J, Romijn FP, Hack CE, et al. Microparticles from patients with multiple organ dysfunction syndrome and sepsis support coagulation through multiple mechanisms. *Thromb. Haemost.* 2001 Mai;85(5):810-820.
212. Pérez-Casal M, Downey C, Fukudome K, Marx G, Toh CH. Activated protein C induces the release of microparticle-associated endothelial protein C receptor. *Blood.* 2005 Fév

15;105(4):1515-1522.

213. Maroney SA, Haberichter SL, Friese P, Collins ML, Ferrel JP, Dale GL, et al. Active tissue factor pathway inhibitor is expressed on the surface of coated platelets. *Blood*. 2007 Mar 1;109(5):1931-1937.
214. Steppich B, Mattisek C, Sobczyk D, Kastrati A, Schömig A, Ott I. Tissue factor pathway inhibitor on circulating microparticles in acute myocardial infarction. *Thromb. Haemost.* 2005 Jan;93(1):35-39.
215. Boulanger CM. Microparticles, vascular function and hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2010 Mar;19(2):177-180.
216. Amabile N, Rautou P, Tedgui A, Boulanger CM. Microparticles: key protagonists in cardiovascular disorders. *Semin. Thromb. Hemost.* 2010 Nov;36(8):907-916.
217. Martinez MC, Andriantsitohaina R. Microparticles in angiogenesis: therapeutic potential. *Circ. Res.* 2011 Jun 24;109(1):110-119.
218. Leroyer AS, Tedgui A, Boulanger CM. Role of microparticles in atherothrombosis. *J. Intern. Med.* 2008 Mai;263(5):528-537.
219. Rautou P, Vion A, Amabile N, Chironi G, Simon A, Tedgui A, et al. Microparticles, vascular function, and atherothrombosis. *Circ. Res.* 2011 Aoû 19;109(5):593-606.
220. Taubman MB, Marmur JD, Rosenfield CL, Guha A, Nichtberger S, Nemerson Y. Agonist-mediated tissue factor expression in cultured vascular smooth muscle cells. Role of Ca²⁺ mobilization and protein kinase C activation. *J. Clin. Invest.* 1993 Fév;91(2):547-552.
221. Caplice NM, Mueske CS, Kleppe LS, Peterson TE, Broze GJJ, Simari RD. Expression of tissue factor pathway inhibitor in vascular smooth muscle cells and its regulation by growth factors. *Circ. Res.* 1998 Déc 14;83(12):1264-1270.
222. Soff GA, Jackman RW, Rosenberg RD. Expression of thrombomodulin by smooth muscle cells in culture: different effects of tumor necrosis factor and cyclic adenosine monophosphate on thrombomodulin expression by endothelial cells and smooth muscle cells in culture. *Blood*. 1991 Fév 1;77(3):515-518.
223. Bretschneider E, Uzonyi B, Weber A, Fischer JW, Pape R, Lötzer K, et al. Human vascular smooth muscle cells express functionally active endothelial cell protein C receptor. *Circ. Res.* 2007 Fév 2;100(2):255-262.
224. McBane RD, Miller RS, Hassinger NL, Chesebro JH, Nemerson Y, Owen WG. Tissue prothrombin. Universal distribution in smooth muscle. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997 Nov;17(11):2430-2436.
225. Rodgers GM. Vascular smooth muscle cells synthesize, secrete and express coagulation factor V. *Biochim. Biophys. Acta.* 1988 Jan 18;968(1):17-23.
226. 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 Déc;30(12):2587-2596.

227. Petäjä J. Inflammation and coagulation. An overview. *Thromb. Res.* 2011 Jan;127 Suppl 2:S34-37.
228. Ma L, Dorling A. The roles of thrombin and protease-activated receptors in inflammation. *Seminars in Immunopathology* [Internet]. 2011 Aoû 2 [cité 2011 Sep 11]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21809138>
229. Vanhoutte PM. Regeneration of the endothelium in vascular injury. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2010 Aoû;24(4):299-303.
230. Popović M, Smiljanić K, Dobutović B, Syrovets T, Simmet T, Isenović ER. Thrombin and vascular inflammation. *Molecular and Cellular Biochemistry* [Internet]. 2011 Aoû 23 [cité 2011 Sep 11]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21858738>
231. McNamara CA, Sarembock IJ, Bachhuber BG, Stouffer GA, Ragosta M, Barry W, et al. Thrombin and vascular smooth muscle cell proliferation: implications for atherosclerosis and restenosis. *Semin. Thromb. Hemost.* 1996;22(2):139-144.
232. Vallar L, Regnault V, Latger-Cannard V, Lecompte T. Beta2-glycoprotein I binding to platelet microparticle membrane specifically reduces immunoreactivity of glycoproteins IIb/IIIa. *Thromb. Haemost.* 2001 Fév;85(2):314-319.
233. Mustard JF, Perry DW, Ardlie NG, Packham MA. Preparation of suspensions of washed platelets from humans. *Br. J. Haematol.* 1972 Fév;22(2):193-204.
234. Regnault V, De Maistre E, Geschier C, Briquel ME, André E, Stoltz JF, Lecompte T. A new fast one-step immunopreparation for activated protein C. *Thromb Haemost.* 1995,13, 1365.
235. Schwertz H, Tolley ND, Foulks JM, Denis MM, Risenmay BW, Buerke M, et al. Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. *J. Exp. Med.* 2006 Oct 30;203(11):2433-2440.
236. Liaw PC, Neuenschwander PF, Smirnov MD, Esmon CT. Mechanisms by which soluble endothelial cell protein C receptor modulates protein C and activated protein C function. *J. Biol. Chem.* 2000 Fév 25;275(8):5447-5452.
237. Ramachandran R, Mihara K, Mathur M, Rochdi MD, Bouvier M, Defea K, et al. Agonist-biased signaling via proteinase activated receptor-2: differential activation of calcium and mitogen-activated protein kinase pathways. *Mol. Pharmacol.* 2009 Oct;76(4):791-801.
238. Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DW, Harmsma M, Zwaal RF. Regulatory mechanisms of transmembrane phospholipid distributions and pathophysiological implications of transbilayer lipid scrambling. *Lupus.* 1998;7 Suppl 2:S126-131.
239. Maynard JR, Heckman CA, Pitlick FA, Nemerson Y. Association of tissue factor activity with the surface of cultured cells. *J. Clin. Invest.* 1975 Avr;55(4):814-824.
240. Smirnov MD, Triplett DT, Comp PC, Esmon NL, Esmon CT. On the role of phosphatidylethanolamine in the inhibition of activated protein C activity by antiphospholipid antibodies. *J. Clin. Invest.* 1995 Jan;95(1):309-316.
241. Safa O, Hensley K, Smirnov MD, Esmon CT, Esmon NL. Lipid oxidation enhances the function of activated protein C. *J. Biol. Chem.* 2001 Jan 19;276(3):1829-1836.

242. Juhan-Vague I, Morange PE, Alessi M. The insulin resistance syndrome: implications for thrombosis and cardiovascular disease. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 2002 Déc;32(5-6):269-273.
243. Nieuwdorp M, Stroes ESG, Meijers JCM, Büller H. Hypercoagulability in the metabolic syndrome. *Curr Opin Pharmacol.* 2005 Avr;5(2):155-159.
244. Lebovitz HE. Insulin resistance--a common link between type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Diabetes Obes Metab.* 2006 Mai;8(3):237-249.
245. Palomo I, Alarcón M, Moore-Carrasco R, Argilés JM. Hemostasis alterations in metabolic syndrome (review). *Int. J. Mol. Med.* 2006 Nov;18(5):969-974.
246. Achimastos AD, Efstathiou SP, Christoforatos T, Panagiotou TN, Stergiou GS, Mountokalakis TD. Arterial stiffness: determinants and relationship to the metabolic syndrome. *Angiology.* 2007 Mar;58(1):11-20.
247. Martens FMAC, van der Graaf Y, Dijk JM, Olijhoek JK, Visseren FLJ. Carotid arterial stiffness is marginally higher in the metabolic syndrome and markedly higher in type 2 diabetes mellitus in patients with manifestations of arterial disease. *Atherosclerosis.* 2008 Avr;197(2):646-653.
248. Schäfer A, Widder J, Eigenthaler M, Bischoff H, Ertl G, Bauersachs J. Increased platelet activation in young Zucker rats with impaired glucose tolerance is improved by acarbose. *Thromb. Haemost.* 2004 Juil;92(1):97-103.
249. Lacolley Patrick, Babuty Dominique, Boulanger Chantal, Ghaleh Bijan, Loirand Gervaise, Pinet Florence, Samuel Jane-Lise. *Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux.* 1^{ed} Montrouge, John Libbey Eurotext, France.
250. Zwaginga JJ, de Boer HC, IJsseldijk MJ, Kerkhof A, Muller-Berghaus G, Grulichhenn J, et al. Thrombogenicity of vascular cells. Comparison between endothelial cells isolated from different sources and smooth muscle cells and fibroblasts. *Arteriosclerosis.* 1990 Juin;10(3):437-448.
251. Rico MC, Rough JJ, Manns JM, Del Carpio-Cano F, Safadi FF, Kunapuli SP, et al. Assembly of the prothrombinase complex on the surface of human foreskin fibroblasts: Implications for connective tissue growth factor. *Thromb Res [Internet].* 2011 Sep 1; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21889790>
252. Váradi K, Elödi S. Formation and functioning of the factor IXa-VIII complex on the surface of endothelial cells. *Blood.* 1987 Fév;69(2):442-445.
253. Rodgers GM, Shuman MA. Prothrombin is activated on vascular endothelial cells by factor Xa and calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1983 Nov;80(22):7001-7005.
254. Bach R, Rifkin DB. Expression of tissue factor procoagulant activity: regulation by cytosolic calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990 Sep;87(18):6995-6999.
255. Crossman DC, Carr DP, Tuddenham EG, Pearson JD, McVey JH. The regulation of tissue factor mRNA in human endothelial cells in response to endotoxin or phorbol ester. *J. Biol. Chem.* 1990 Juin 15;265(17):9782-9787.
256. Lyberg T, Galdal KS, Evensen SA, Prydz H. Cellular cooperation in endothelial cell

- thromboplastin synthesis. *Br. J. Haematol.* 1983 Jan;53(1):85-95.
257. Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007 Aoû;27(8):1687-1693.
258. Kretz CA, Vaezzadeh N, Gross PL. Tissue factor and thrombosis models. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010 Mai;30(5):900-908.
259. Østerud B. Tissue factor expression in blood cells. *Thromb. Res.* 2010 Avr;125 Suppl 1:S31-34.
260. Siddiqui FA, Desai H, Amirkhosravi A, Amaya M, Francis JL. The presence and release of tissue factor from human platelets. *Platelets.* 2002 Juin;13(4):247-253.
261. Camera M, Frigerio M, Toschi V, Brambilla M, Rossi F, Cottell DC, et al. Platelet activation induces cell-surface immunoreactive tissue factor expression, which is modulated differently by antiplatelet drugs. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003 Sep 1;23(9):1690-1696.
262. Hayashi M, Takeshita K, Inden Y, Ishii H, Cheng XW, Yamamoto K, et al. Platelet activation and induction of tissue factor in acute and chronic atrial fibrillation: Involvement of mononuclear cell-platelet interaction. *Thromb Res [Internet].* 2011 Aoû 6; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21824645>
263. Bakker HM, Tans G, Janssen-Claessen T, Thomassen MC, Hemker HC, Griffin JH, et al. The effect of phospholipids, calcium ions and protein S on rate constants of human factor Va inactivation by activated human protein C. *Eur. J. Biochem.* 1992 Aoû 15;208(1):171-178.
264. Gruber A, Griffin JH. Direct detection of activated protein C in blood from human subjects. *Blood.* 1992 Mai 1;79(9):2340-2348.
265. Liaw PC, Neuenschwander PF, Smirnov MD, Esmon CT. Mechanisms by which soluble endothelial cell protein C receptor modulates protein C and activated protein C function. *J. Biol. Chem.* 2000 Fév 25;275(8):5447-5452.
266. Pérez-Casal M, Downey C, Fukudome K, Marx G, Toh CH. Activated protein C induces the release of microparticle-associated endothelial protein C receptor. *Blood.* 2005 Fév 15;105(4):1515-1522.
267. van 't Veer C, Golden NJ, Kalafatis M, Mann KG. Inhibitory mechanism of the protein C pathway on tissue factor-induced thrombin generation. Synergistic effect in combination with tissue factor pathway inhibitor. *J. Biol. Chem.* 1997 Mar 21;272(12):7983-7994.
268. de Visser MCH, van Hylckama Vlieg A, Tans G, Rosing J, Dahm AEA, Sandset PM, et al. Determinants of the APTT- and ETP-based APC sensitivity tests. *J. Thromb. Haemost.* 2005 Juil;3(7):1488-1494.
269. Schuepbach RA, Velez K, Riewald M. Activated protein C up-regulates procoagulant tissue factor activity on endothelial cells by shedding the TFPI Kunitz 1 domain. *Blood.* 2011 Juin 9;117(23):6338-6346.
270. Zahra S, Anderson JAM, Stirling D, Ludlam CA. Microparticles, malignancy and thrombosis. *Br. J. Haematol.* 2011 Mar;152(6):688-700.

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1 : Structure schématique d'un vaisseau (1)</i>	9
<i>Figure 2 : Structure de l'intégrine</i>	16
<i>Figure 3 : Changement de conformation au niveau de l'intégrine (47)</i>	18
<i>Figure 4 : Structure schématique du complexe ($\alpha_{IIb}\beta_3$) au repos (1)</i>	20
<i>Figure 5 : Structure schématique du complexe ($\alpha_v\beta_3$) au repos (49)</i>	21
<i>Figure 6 : Etapes de l'hémostase primaire</i>	23
<i>Figure 7 : Activation Plaquettaire (1)</i>	25
<i>Figure 8 : Fonctionnement des flipase, flopase et scramblase (70)</i>	27
<i>Figure 9 : Structure du facteur tissulaire humain (sans le peptide signal) (71)</i>	31
<i>Figure 10 : Modélisation du domaine extracellulaire du FT humain (72)</i>	32
<i>Figure 11 : Structure schématique du fibrinogène et sites de clivage par la thrombine</i>	33
<i>Figure 12 : Liaison des protéines vitamine K-dépendantes (carboxylées) aux phospholipides anioniques via des ponts calciques</i>	34
<i>Figure 13 : Rôle des surfaces phospholipidiques dans les réactions enzymatiques de la coagulation</i>	37
<i>Figure 14 : Voie intrinsèque et extrinsèque de la coagulation</i>	39
<i>Figure 15 : Phase d'initiation de la coagulation</i>	41
<i>Figure 16 : Phase d'amplification et de propagation de la coagulation</i>	41
<i>Figure 17 : Polymérisation de la fibrine (1)</i>	42
<i>Figure 18 : Structure de l'inhibiteur du facteur tissulaire (TFPI) (124)</i>	46
<i>Figure 19 : Représentation schématique de la protéine C, la protéine S, la</i>	47
<i>Figure 20 : Schéma représentant l'activation de la protéine C sur les membranes cellulaires (141)</i>	48
<i>Figure 21 : Structure moléculaire de la thrombomoduline (140)</i>	49
<i>Figure 22 : Régulation de la coagulation par le système de la protéine C (167)</i>	51
<i>Figure 23 : Représentation schématique (A) de la structure du FV et de ses sites de clivage par la thrombine (B) de l'inactivation protéolytique du FVa par la PCa</i>	52
<i>Figure 24 : Représentation schématique (A) de la structure du FVIII et de ses sites de clivage par la thrombine (B) de l'inactivation protéolytique du FVIIIa par la PCa</i>	53
<i>Figure 25 : Formation de microparticules (182)</i>	55
<i>Figure 26 : Mécanisme de l'activation de PAR1 par la thrombine</i>	62
<i>Figure 27 : Modèle du Flexcell</i>	65
<i>Figure 28 : Protocole de mesure de l'activité procoagulante de phospholipides (PPA)</i>	70
<i>Figure 29 : préparation de plasma riche en plaquettes et plasma dépourvu en plaquettes à partir de sang humain de sujets sains</i>	75
<i>Figure 30 : Protocole pour une étude en thrombinographie des cellules en suspension (CML de rat, VP et MP) et cellules adhérentes (CE et CML humaines)</i>	77
<i>Figure 31: Thrombinogramme typique obtenu en présence d'un plasma riche en plaquettes</i>	78
<i>Figure 32 : Paramètres du thrombinogramme</i>	79
<i>Figure 33 : Détermination de la concentration en PCa induisant une réduction de 50 % de l'ETP : IC50-PCa</i>	80
<i>Figure 34 : Mesure de l'inactivation du FVa par la PCa à la surface des CE et CML aortiques humaines</i>	82
<i>Figure 35 : Génération de thrombine en présence de CML aortiques de rat Wistar</i>	86
<i>Figure 36 : Influence de l'ajout de PCa sur la génération de thrombine à la surface des CML de rat Wistar</i>	87
<i>Figure 37 : Influence de la concentration de CML de rats Wistar sur les paramètres du thrombinogramme</i>	88

<i>Figure 38 A : Thrombinogrammes obtenus avec des CML du rat Wistar détachées par la trypsine ou adhérentes.....</i>	<i>91</i>
<i>Figure 38 B, 38 C : Génération de thrombine et activité PPA à la surface des CML de rat Wistar détachées par la trypsine ou adhérentes ajustées au même nombre de 15000 cellules.....</i>	<i>92</i>
<i>Figure 39 : Sensibilité à la PCa des CML de rat Wistar détachées par la trypsine ou adhérentes ajustées au même nombre de 15000 cellules.....</i>	<i>93</i>
<i>Figure 40 : Travail thrombinique réalisé à la surface des CML de rat Wistar, FA/FA et fa/fa.</i>	<i>94</i>
<i>Figure 41 : Valeurs de l'activité PPA exprimées en équivalents PSer à la surface de CML de rat Wistar, FA/FA et fa/fa.....</i>	<i>96</i>
<i>Figure 42 : Sensibilité à la PCa exogène des CML de rat Wistar, FA/FA et fa/fa.....</i>	<i>96</i>
<i>Figure 43 : Augmentation de l'activité PPA des CML de rat Wistar en fonction du temps d'étirement cyclique..</i>	<i>98</i>
<i>Figure 44 : A) Profils thrombinographiques et B) Travail thrombinique obtenu à la surface des CML soumises à différents temps de déformations mécaniques.....</i>	<i>99</i>
<i>Figure 45 : Sensibilité à la PCa des CML soumises à des temps différents de déformations mécaniques</i>	<i>100</i>
<i>Figure 46 : Effet des peptides RGD sur l'activité PPA des CML de rat Wistar non soumises à des déformations cycliques.....</i>	<i>101</i>
<i>Figure 47 : Effet des peptides RGD sur la génération de thrombine à la surface des CML de rat Wistar non soumises à des déformations cycliques.</i>	<i>102</i>
<i>Figure 48 : Effet de la transfection des CML par le siARN ciblant la sous-unité α_v sur la génération de thrombine à leur surface.</i>	<i>103</i>
<i>Figure 49 : Effet de l'inhibition de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (par un peptide RGD ou un siARN α_v) sur la génération de thrombine à la surface des CML soumises à des déformations cycliques.....</i>	<i>104</i>
<i>Figure 50 : Génération de thrombine à la surface des CE, CML adhérentes et plaquettes humaines en suspension</i>	<i>105</i>
<i>Figure 51 : Travail thrombinique à la surface des VP synthétiques (PC/PSer/PE : 60/20/20 mole%) en fonction de leur concentration finale en thrombinographie.....</i>	<i>107</i>
<i>Figure 52 : Mesure de l'activité PPA à la surface des CE, CML aortiques humaines adhérentes et des plaquettes humaines en suspension.....</i>	<i>107</i>
<i>Figure 53 : Mesure de l'activité du FT à la surface des CE et CML aortiques humaines</i>	<i>109</i>
<i>Figure 54 : Génération de thrombine à la surface des plaquettes humaines, CE ou CML aortiques humaines en présence de FT ajouté à 0,5 pM et ajusté (exprimé+ajouté) à une concentration finale de 12,5 pM</i>	<i>111</i>
<i>Figure 55 : Génération de thrombine à la surface des CE ou CML aortiques humaines en présence de concentrations croissantes d'anticorps anti-TFPI. Les cellules ont été incubées avec l'anticorps dans un PDP déficient en TFPI</i>	<i>112</i>
<i>Figure 56 : Génération de thrombine à la surface des CE ou CML aortiques humaines en présence de concentrations croissantes d'anticorps anti-TM.....</i>	<i>114</i>
<i>Figure 57 : Courbes d'inhibition du travail thrombinique à la surface des plaquettes, CE ou CML humaines en présence de concentrations croissantes en PCa exogène</i>	<i>116</i>
<i>Figure 58 : Sensibilité à la PCa exogène à la surface des plaquettes, CE ou CML aortiques humaines.....</i>	<i>117</i>
<i>Figure 59 : Mesure de l'activité PPA à la surface des CE ou CML adhérentes incubées avec 10 nM de thrombine pendant 15 min à 37°C.....</i>	<i>119</i>

<i>Figure 60 : Mesure de l'activité PPA dans les culots récupérés des CE, CML ou plaquettes incubées avec 10 nM de thrombine pendant 15 min à 37°C et contenant des MP-CE, MP-CML et MP plaquettaires respectivement.....</i>	<i>121</i>
<i>Figure 61 : Quantification en cytométrie en flux de MP-CE, MP-CML ou MP plaquettaires (MP-Plq) obtenues en incubant les cellules avec 10 nM de thrombine pendant 15 min à 37°C.....</i>	<i>122</i>
<i>Figure 62 : Cinétique de la conversion de la protéine C en PCa à la surface des CE ou CML humaines dans un système purifié en fonction du temps.</i>	<i>123</i>
<i>Figure 63 : Formation de la PCa à la surface des CE ou CML aortiques humaines dans un système purifié en fonction de la concentration en thrombine</i>	<i>124</i>
<i>Figure 64 : Inactivation du FVa par la PCa en fonction du temps en présence des CE ou CML aortiques humaines adhérentes dans un système purifié.....</i>	<i>126</i>
<i>Figure 65 : Inactivation du FVa par la PCa en fonction du temps en présence de CE ou CML aortiques humaines adhérentes dans un système purifié.....</i>	<i>127</i>
<i>Figure 66 : Quantification par cytométrie en flux de l'expression de l'EPCR à la surface des CE et CML.....</i>	<i>128</i>
<i>Figure 67 : Effet de l'EPCR cellulaire sur la sensibilité à la PCa à la surface des CE ou des CML aortiques humaines.....</i>	<i>129</i>
<i>Figure 68 : Quantification en ELISA de l'expression du TFPI par les CE ou CML aortiques humaines</i>	<i>130</i>
<i>Figure 69 : Effet du TFPI cellulaire sur la sensibilité des CE et des CML aortiques humaines à la PCa</i>	<i>131</i>
<i>Figure 70 : La sensibilité à la PCa avec les CE ou CML humaines adhérentes en présence de différentes concentrations en FT.....</i>	<i>132</i>
<i>Figure 71 : Thrombinogrammes avec les trois types de MP comparées avec leurs cellules d'origine.....</i>	<i>133</i>
<i>Figure 72 : Le travail thrombinique à la surface des MP plaquettaires, MP-CE ou MP-CML ou leurs cellules d'origine.</i>	<i>134</i>
<i>Figure 73 : L'activité FT mesurée à la surface des MP-CE, MP-CML ou de leurs cellules d'origine.....</i>	<i>135</i>
<i>Figure 74 : Sensibilité à la PCa à la surface des MP plaquettaires, MP-CE,MP-CML ou de leurs cellules d'origine</i>	<i>136</i>
<i>Figure 75 : Inactivation du FVa par la PCa en fonction du temps en présence des MP-CE, MP-CML ou MP plaquettaires dans un système purifié (sans PS).....</i>	<i>138</i>
<i>Figure 76 : Inactivation du FVa par la PCa en présence des MP-CE, MP-CML ou MP plaquettaires dans un système purifié (avec protéine S) en fonction du temps</i>	<i>139</i>

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau I : Les protéines plasmatiques de la coagulation et leurs principaux inhibiteurs .</i>	<i>28</i>
<i>Tableau II : Activation des zymogènes en fonction de la présence ou non de cofacteurs de la coagulation</i>	<i>36</i>
<i>Tableau III : Protocole ELISA du dosage du TFPI total des CE et CML aortiques humaine</i>	<i>73</i>
<i>Tableau IV : Effet de l'ajout de FT à différentes concentrations sur la génération de thrombine à la surface des CML de rats Wistar.....</i>	<i>89</i>
<i>Tableau V : Effet de conservation après détachement des CML de rat Wistar par la trypsine sur la génération de thrombine à leur surface</i>	<i>90</i>
<i>Tableau VI : Effet du détachement des CML de rat Wistar par la trypsine sur les paramètres de génération de thrombine à leur surface</i>	<i>92</i>
<i>Tableau VII : Paramètres thrombinographiques obtenus avec les CML de rat Wistar, FA/FA et fa/fa</i>	<i>95</i>
<i>Tableau VIII : Paramètres des thrombinogrammes obtenus à la surface des plaquettes CE et CML humaines</i>	<i>106</i>
<i>Tableau IX : Paramètres des thrombinogrammes obtenus à la surface des plaquettes humaines, CE ou CML aortiques humaines en présence de FT ajouté à 0,5 pM et ajusté (exprimé +ajouté) à une concentration finale de 12,5 pM</i>	<i>110</i>
<i>Tableau X : Paramètres des thrombinogrammes obtenus avec les CE et les CML aortiques humaines en présence de concentrations croissantes d'anticorps anti-TFPI</i>	<i>113</i>
<i>Tableau XI : Paramètres des thrombinogrammes obtenus avec les CE et les CML aortiques humaines en présence de concentrations croissantes d'anticorps anti-TM. Les cellules ont été incubées avec l'anticorps dans un PDP humain.....</i>	<i>115</i>
<i>Tableau XII : Thrombogénicité des plaquettes, CE et CML aortiques humaines.....</i>	<i>118</i>
<i>Tableau XIII : Paramètres thrombinographiques obtenus avec les MP de trois types cellulaires ainsi que leur thrombogénicité représentée par les valeurs d'ETP₀ X IC₅₀-PCa.</i>	<i>137</i>

**ARTICLES
ET
COMMUNICATIONS**

Articles soumis

1° Article

cyclic stretch-induced thrombin generation BY rat vascular smooth muscle cells is mediated by THE integrin $\alpha_v\beta_3$ SIGNALING PATHWAY

Xianqing Mao^{1,2*}, Rose Said^{1,2*}, Huguette Louis^{1,2}, Jean-Pierre Max^{1,2}, Denis Wahl^{1,2},

Zhenlin Li³, Veronique Regnault^{1,2}, Patrick Lacolley^{1,2}

¹INSERM, U961, Vandoeuvre-les-Nancy, France

²Nancy Université, Nancy, France

³UPMC 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 cells¹ 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 VSMC⁶ 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/Akt¹¹ 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 (α SMA), 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- α SMA 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, Helsinki, 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 \pm 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 $\alpha_v\beta_3$ 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 $\alpha_v\beta_3$ in thrombin generation at the surface of VSMCs by focusing on the effect of the linear peptide (RGD) and the $\alpha_v\beta_3$ antagonist peptide cRGDPV, or using a siRNA against the α_v 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 α_v -siRNA which inhibited the α_v 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 $\alpha_v\beta_3$ 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 α SMA by confocal microscopy. No difference was found in the distribution of α SMA 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 α SMA and SM-MHC served as markers for VSMC differentiation. We observed an increase in α SMA 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 α_v 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 μ M. 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 α_v 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 α_v protein expression at 60 and 360 minutes (Figure 5A-B). Adhesion to prothrombin and thrombin generation at 360 minutes were also inhibited by α_v -siRNA (Figures 5C and 5D). Inhibition of α_5 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 $\alpha_v\beta_3$ 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 α_v -siRNA inhibited the integrin $\alpha_v\beta_3$ 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, α_v -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 α_5 -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 α_v 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 α_v 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 $\alpha_v\beta_3$ is involved in thrombin generation at the surface of rat VSMCs; 2) cyclic stretch upregulates the expression of integrin $\alpha_v\beta_3$, 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 α SMA 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 (α SMA 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 $\alpha_v\beta_3$ 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 $\alpha_v\beta_3$ significantly increased with a similar kinetic pattern to that of thrombin generation. Since integrin $\alpha_v\beta_3$ 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 $\alpha_v\beta_3$ 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 $\alpha_v\beta_3$ since available antibodies against the activated form of integrin $\alpha_v\beta_3$ did not recognize the rat molecule using flow cytometry. Alternatively, we found that the enhanced expression of integrin $\alpha_v\beta_3$ induced by cyclic stretch was suppressed by RGD peptides, suggesting a stimulation of integrin $\alpha_v\beta_3$ activation as a consequence of bi-directional outside-in and inside-out signaling. Moreover, we also demonstrated that invalidation of this integrin by a α_v -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 $\alpha_v\beta_3$ in controlling thrombin generation by VSMCs.

Using Western blot analysis, we showed that the phosphorylation of five integrin $\alpha_v\beta_3$ signaling molecules (Src, FAK, Akt, ERK and ILK) were significantly increased in stretched cells. These results demonstrate a possible activation of integrin $\alpha_v\beta_3$ 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 $\alpha_v\beta_3$.^{10,13} The rapid engagement of integrin $\alpha_v\beta_3$ was also supported by the kinetics of

talín cleavage and the phosphorylation of ILK which occurred from 5 minutes and culminated at 15 minutes of stretch. The early activation of integrin $\alpha_v\beta_3$ 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 talín cleavage gave evidence of a bidirectional signaling. The results of the total inhibition of these dynamic signaling processes by RGD peptides, a α_v -siRNA or a talín-siRNA support the conclusion that integrin $\alpha_v\beta_3$ -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 talín 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 $\alpha_v\beta_3$ 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 $\alpha_v\beta_3$ as a receptor for prothrombin. Further elucidation of the interactions between functions of integrin $\alpha_v\beta_3$ 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, alpha-v-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, Wagenvoort 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 stabilization 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, Shirogane-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 sibraxifiban with aspirin for prevention of cardiovascular events after acute coronary syndromes: a randomised trial. The SYMPHONY Investigators. Sibraxifiban 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, sibraxifiban, 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 1.25×10^5 cells/mL in the assay. Coagulation was triggered with 0.25 pM of tissue factor.

Figure 2. *Selective inhibition of integrin $\alpha_v\beta_3$ by RGD peptides and α_v -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 α_v subunit in VSMCs transfected for 24 hours with control or α_v -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 α_v -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 α_v -siRNA. VSMCs were suspended in human platelet-poor plasma to give a final concentration 1.25×10^5 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 \pm 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 (α SMA and SM-MHC) and integrin subunits in cells subjected to cyclic stretch for the indicated time periods. PI indicates propidium iodide, α SMA, 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 α -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 1.25×10^5 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 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 α_5 -siRNA or α_v -siRNA on integrin $\alpha_v\beta_3$ expression, cell adhesion and VSMC-supported thrombin generation.* Representative Western blot analysis (A) and protein levels (B) of integrin α_v 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 α -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 \pm 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

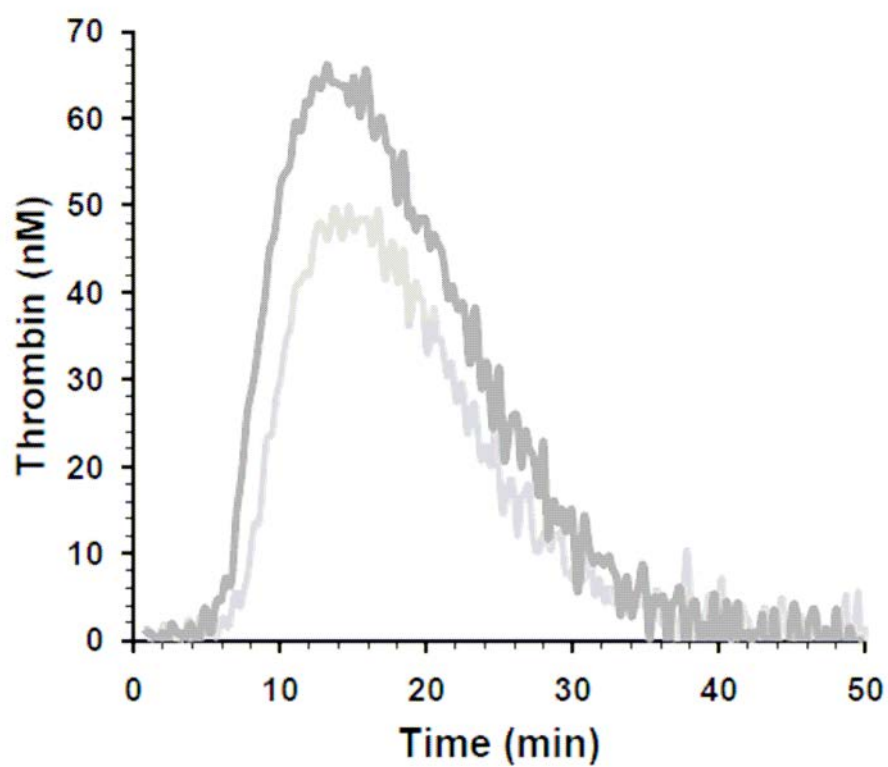


Figure 2

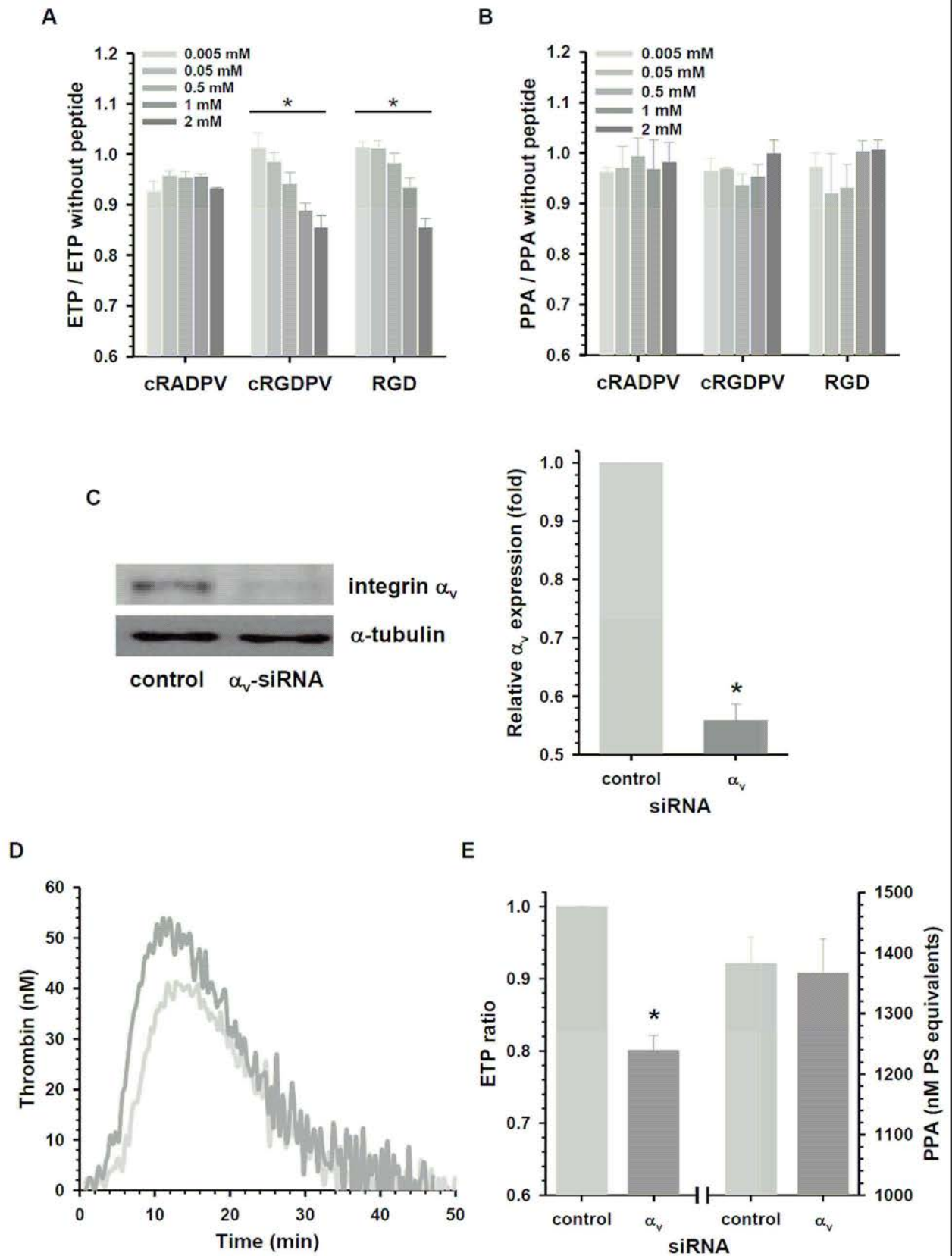


Figure 3

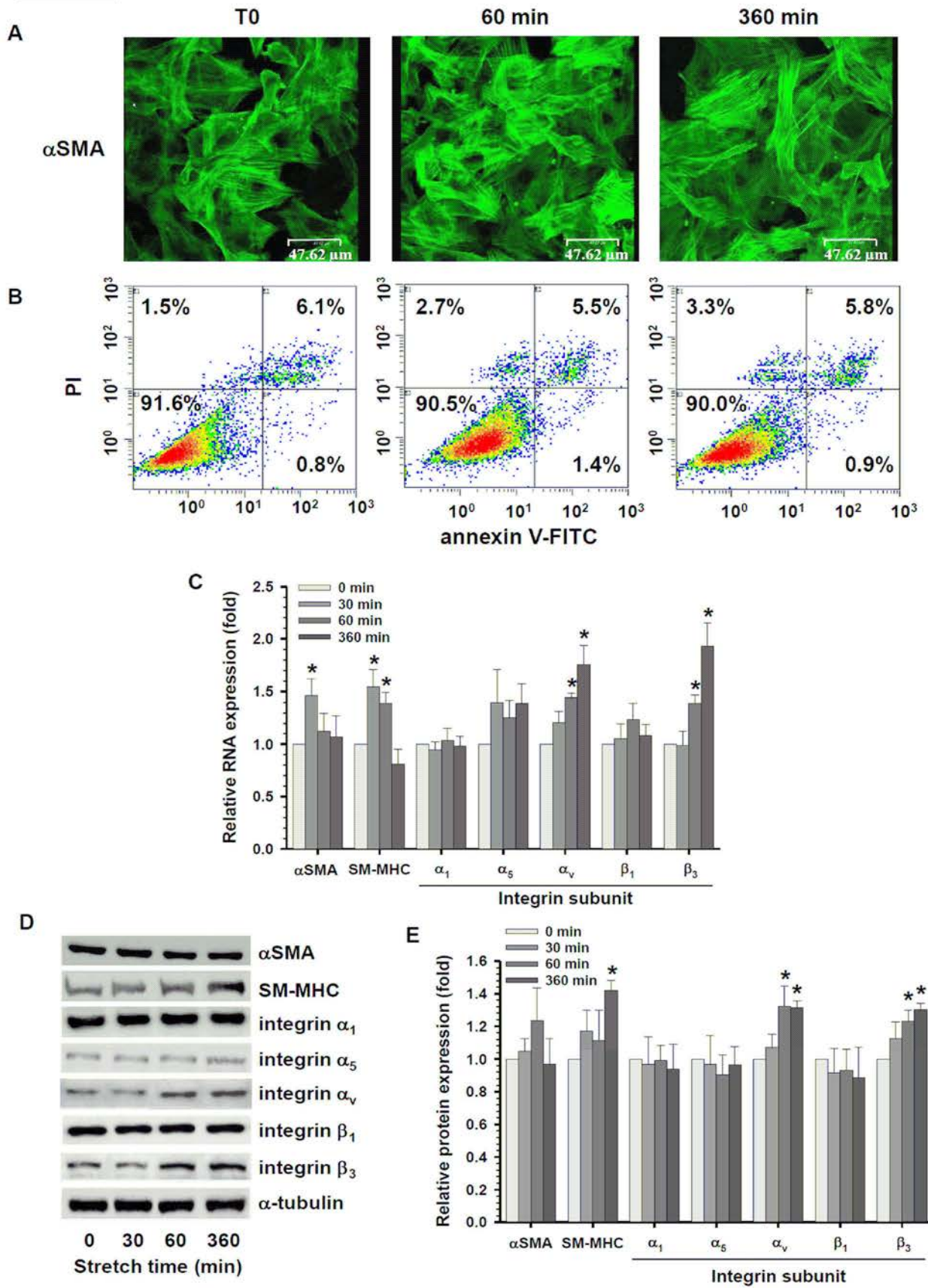


Figure 4

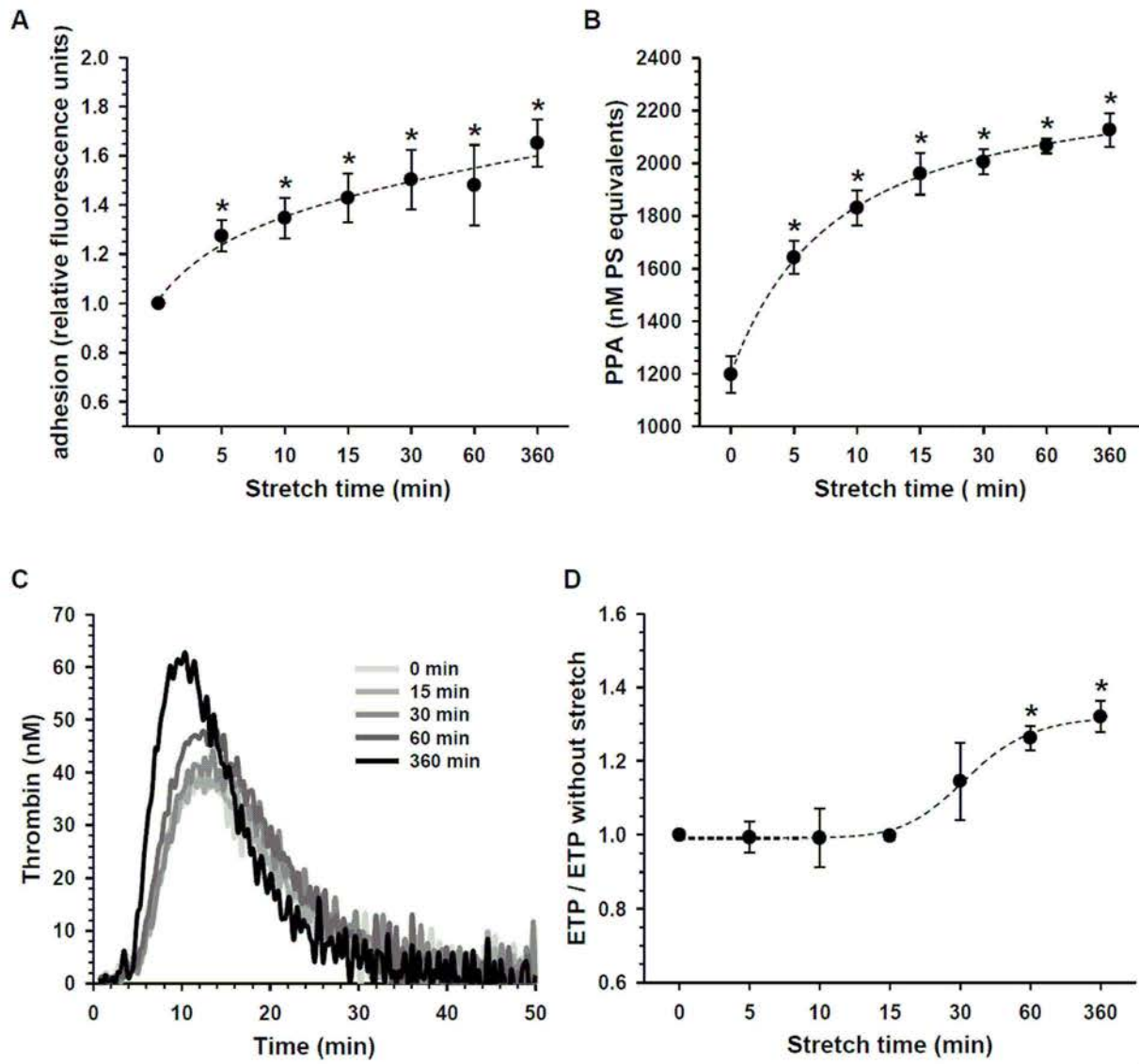


Figure 5

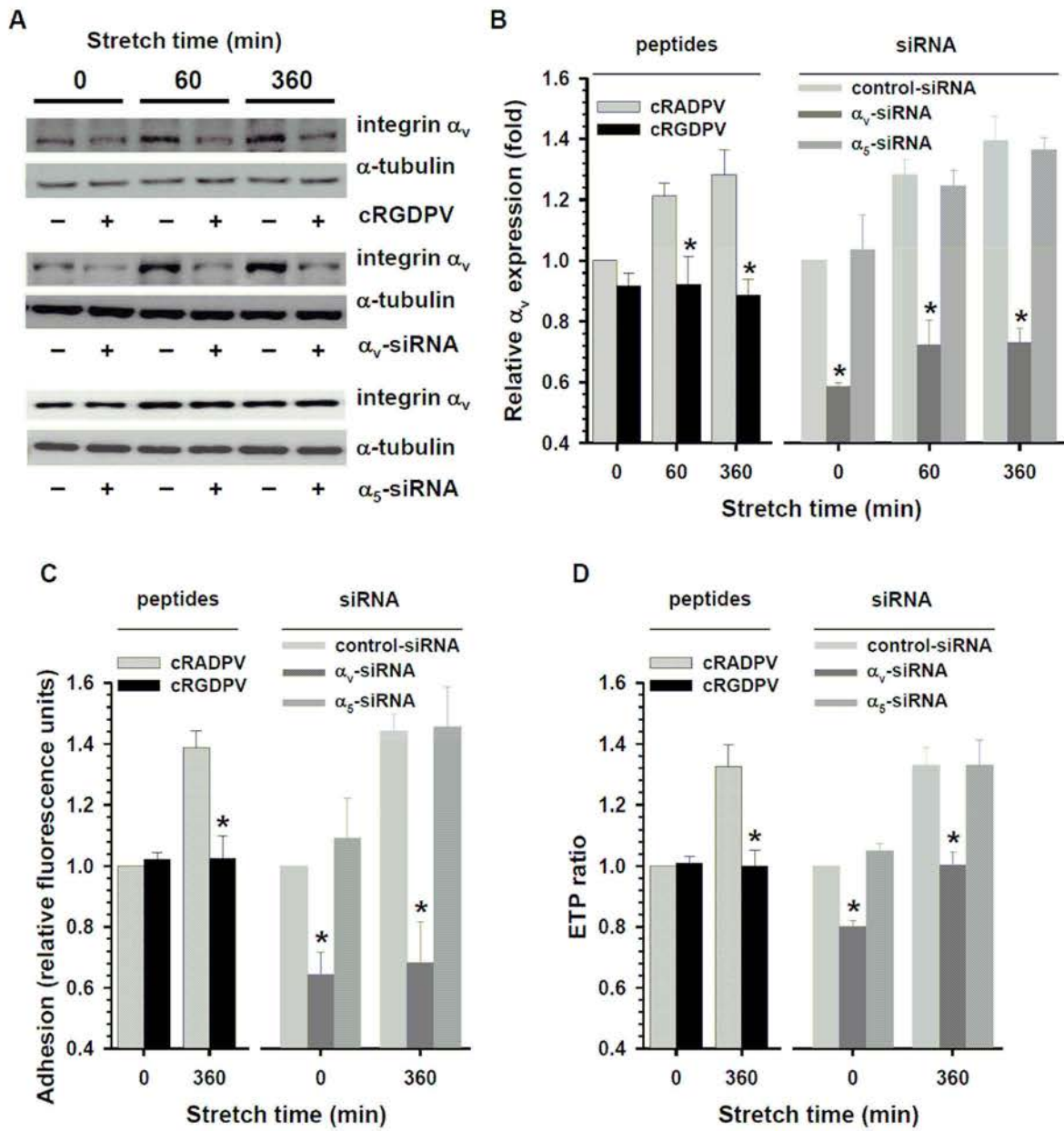
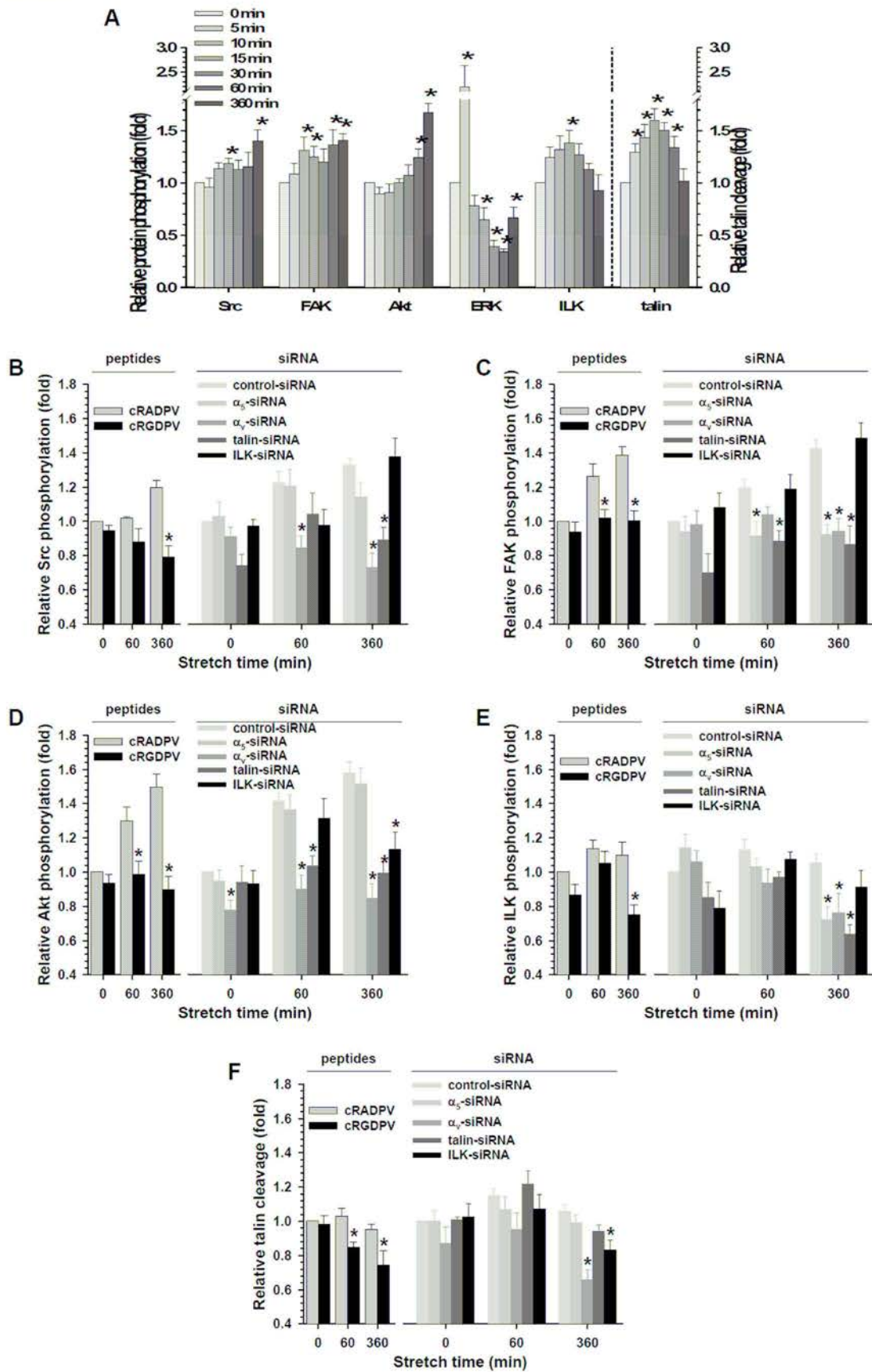


Figure 6



SUPPLEMENTAL MATERIAL

CYCLIC STRETCH-INDUCED THROMBIN GENERATION BY RAT VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS IS MEDIATED BY THE INTEGRIN $\alpha_v\beta_3$ SIGNALING PATHWAY

Xianqing Mao^{1,2*}, Rose Said^{1,2*}, Huguette Louis^{1,2}, Jean-Pierre Max^{1,2}, Denis Wahl^{1,2},

Zhenlin Li³, Veronique Regnault^{1,2}, Patrick Lacolley^{1,2}

¹INSERM, U961, Vandoeuvre-les-Nancy, France

²Nancy Université, Nancy, France

³UPMC 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
α SMA	TGTGCTGGACTCTGGAGATG	GAAGGAATAGCCACGCTCAG
SM-MHC	GATGTGGTGCAGAAAGCTCA	CTTTGTTACACGGCTGAGA
Integrin α_1 subunit	AGAGGCACAATCCAGGACTG	GGTAGGAGCGAGACATTAC
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; α SMA, 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 α_5 subunit, talin and ILK on their respective proteins in VSMCs. Representative Western blot analysis and protein levels of integrin α_5 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 β -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.*

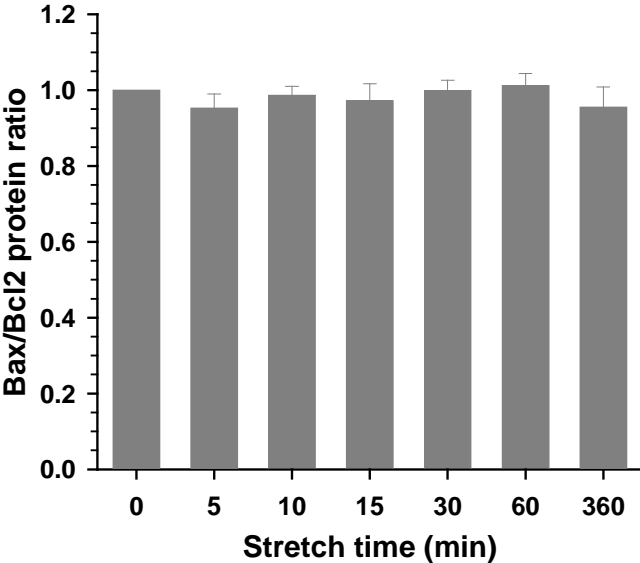
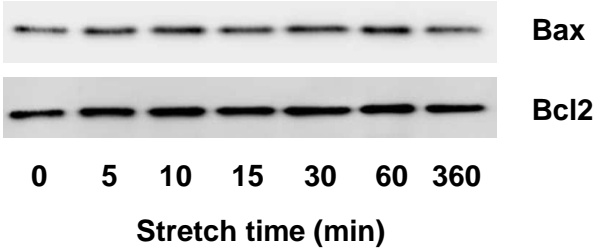
Supplemental figure III. *Western blot analysis of the effects of cyclic stretch on phosphorylation levels of Src, FAK, Akt, ERK and ILK and on cleavage of talin. For quantification, see Figure 6.*

Supplemental figure IV. *Western blot analysis of the effects of the cRGDPV peptide and siRNA against α_5 , α_v , 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.*

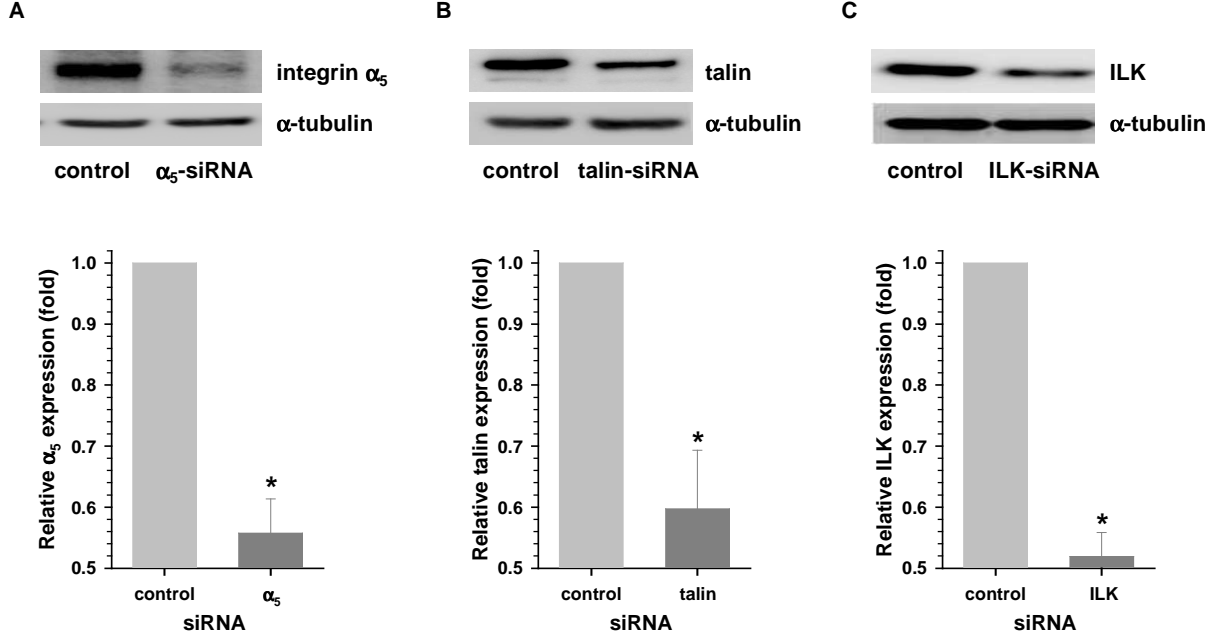
Supplemental figure V. *Effects of siRNA against talin or ILK on integrin α_v subunit expression in response to cyclic stretch. Representative Western blot analysis and protein levels of integrin α_v subunit in VSMCs transfected for 24 hours with control siRNA, talin-siRNA (A) or ILK-siRNA (B) and maintained in 0.5% FBS for 2 additional days before being*

subjected to cyclic stretch for the indicated time period. Protein levels are normalized to α -tubulin. Results (means \pm 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.

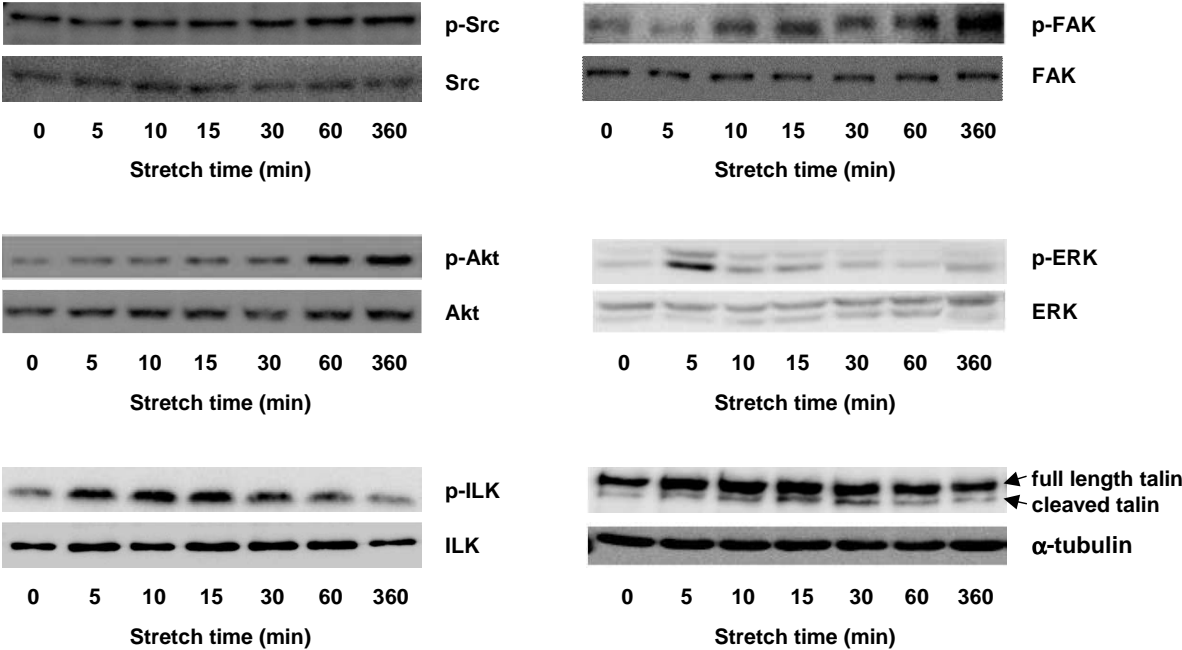
Supplemental figure I



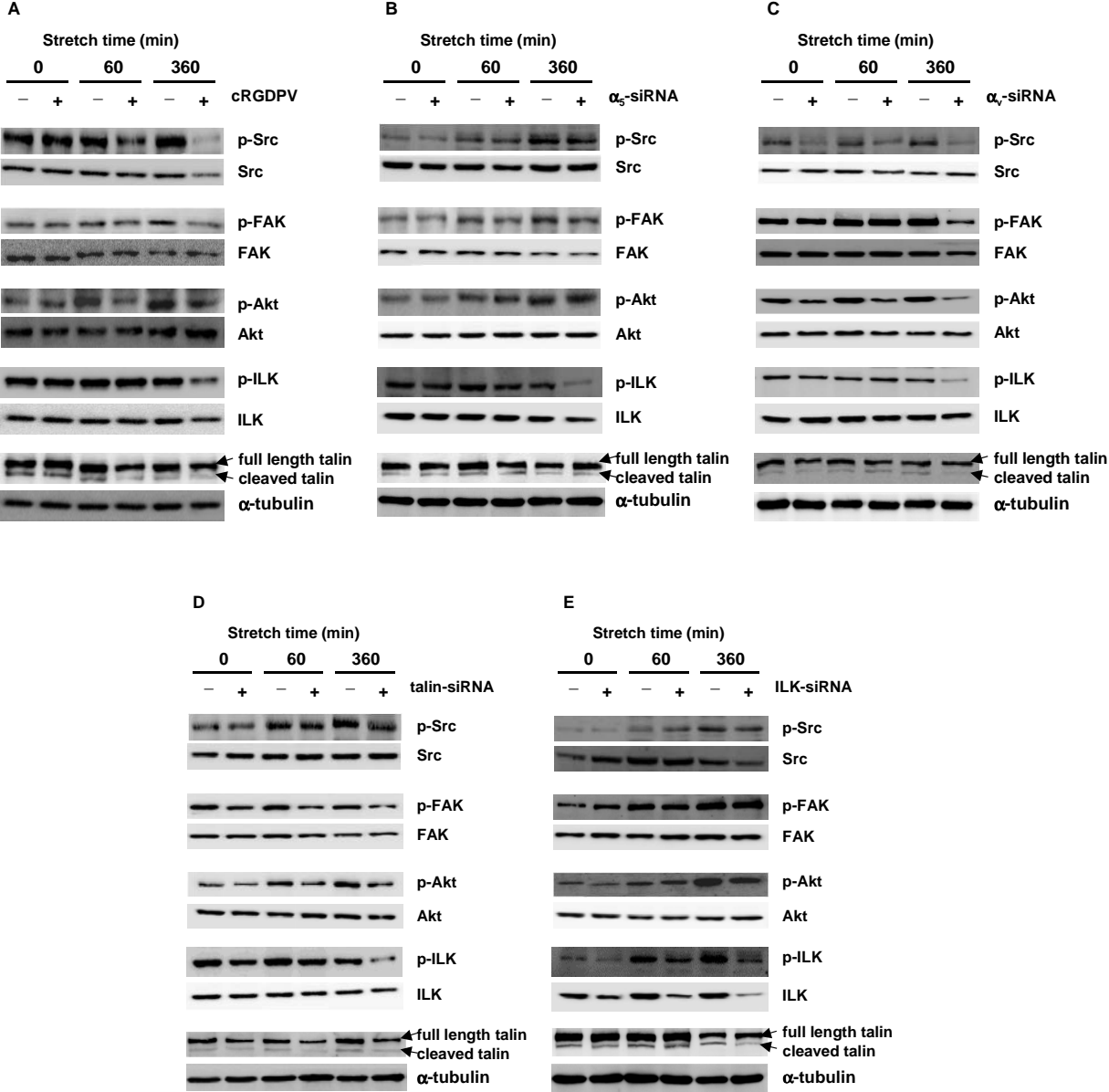
Supplemental figure II



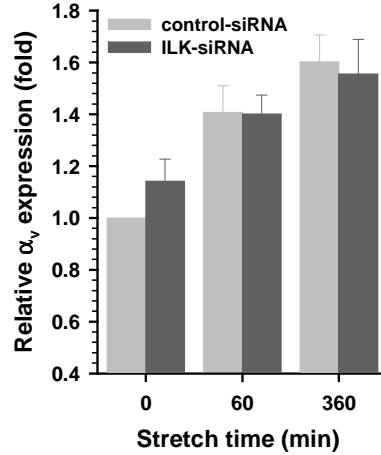
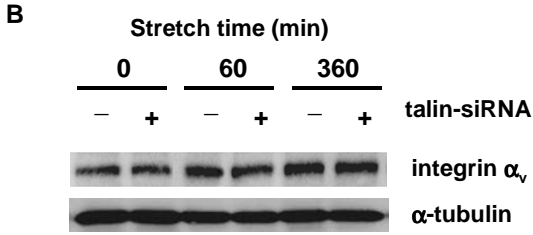
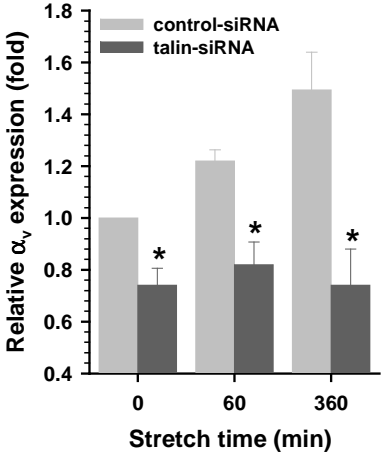
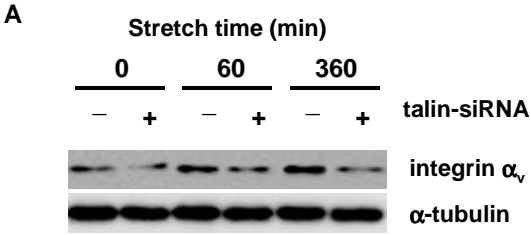
Supplemental figure III



Supplemental figure IV



Supplemental figure V



Articles soumis

2° Article (soumis à thrombosis journal)

Platelet-dependent thrombography gives a distinct pattern of in vitro thrombin generation after surgery with cardio-pulmonary bypass: potential implications

Short running head title: Platelet-dependent thrombin generation after CPB

Rose SAID¹⁻², Véronique REGNAULT¹⁻², Marie HACQUARD¹⁻³, Jean-Pierre CARTEAUX¹, Thomas LECOMPTE¹⁻²⁻³

1 Centre Hospitalier Universitaire, Laboratoire d'Hématologie et Institut Cardiovasculaire
Nancy, France

2 Inserm U961, Nancy Université, Nancy, France

3 EFS Lorraine Champagne, Nancy, France

The first two authors contributed equally to the work

Corresponding author: Thomas Lecompte

*Mailing address: Haematology Laboratory, CHU Nancy, Rue du Morvan, 54511 Vandoeuvre
les Nancy Cedex, France.*

Tel: 3-33-83-15-37-84.

Fax: 3-33-83-15-37-96.

E-mail: thomas.lecompte@chu-nancy.fr

Abstract

Background: Bleeding remains a feared complication of cardio-pulmonary bypass (CPB). The purpose of this study is to obtain a better insight on *in vitro* thrombin generation in the context of CPB. **Methods:** We used Calibrated Automated Thrombography to assess blood coagulation of 10 low-risk patients operated for valve replacement with CPB, under 2 experimental conditions, one implicating platelets as platelet dysfunction is known to occur during CPB. **Results:** Our main finding was that CPB-induced coagulopathy was differently appreciated depending on the presence or absence of platelets: the decrease in thrombin generation was much less pronounced in their presence. **(e) Conclusion:** Our results show that the experimental conditions have a profound effect in the study of *in vitro* thrombin generation in the context of CPB.

Keywords: Cardio Pulmonary Bypass, thrombin, Platelets, thrombography.

Introduction

Bleeding remains a feared complication of cardiopulmonary bypass (CPB). Despite improvements, blood coagulation is still altered in the extracorporeal circuit [1-4]. We have reported in variant haemophiliacs that Calibrated Automated Thrombography (CAT), as an integrative *in vitro* phenotyping of coagulation, would be a better laboratory approach of the bleeding risk than the assays currently used in laboratory medicine [5]. Recent works have studied with CAT thrombin generation in plasma of patients after CPB. Schol *et al* [6] have shown a decrease in thrombin generation associated with a decrease in fibrin formation (assessed with thromboelastography). In addition, Solomon *et al* [7] have shown that fibrin formation is more altered than thrombin generation following CPB. Furthermore, Coakley *et al* [8] have shown a correlation between pre- and post-operative Endogenous Thrombin Potentials (ETP), and more importantly an association with bleeding complications, suggesting this assay being informative in this context [5]. CAT can be performed in the presence of platelets (Scientific Standardization SubCommittee statement of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, to be published soon). To obtain a better insight on *in vitro* thrombin generation in the context of CPB, we used CAT under 2 experimental conditions, one implicating platelets; to the best of our knowledge this has never been performed with CAT in the context of CPB, where platelet dysfunction is known to occur [2,9-11].

Materials and methods

Patient population

Ten low-risk adult patients scheduled for replacement of one heart valve (6 aortic, 4 mitral) were consecutively included after giving informed consent. There were 7 men and 3 women;

of 70 years (59-87) of age (continuous variables are expressed as medians and ranges). All patients signed an informed consent form approved by the local research committee.

Collection of blood samples

We collected blood before CPB and shortly after protamine injection into S-Monovette® tubes (Sarstedt) containing 0.109 M citrate, in the proportion of 1 volume citrate to 9 volumes of blood. Platelet-Rich Plasma (PRP) was prepared by blood centrifugation at 190 g for 10 min at 20°C. The PRP was recovered and adjusted to 150 G/L by the addition of Platelet-Poor Plasma (PPP) obtained by centrifugation of remaining blood at 1750 g for 10 min at 20°C. Platelet-depleted Plasma (PDP) was obtained from PPP centrifuged at 13000 g for 30 min at 4°C. PDP was immediately frozen at -80°C and thawed 15 min at 37°C until use.

Thrombin generation

CAT was performed with PRP and PDP as well, as described in [11]. Measurements were carried out in 96-well circle bottom microtiter polypropylene plates (Greiner). Coagulation was initiated with 0.3 (PRP and PDP), 1 or 5 pM (PDP only, for practical reasons) recombinant human tissue factor (TF) reagent (Innovin®, Dade Behring), and, when PDP was studied, in presence of 4 µM phospholipid vesicles: phosphatidylcholine (PC)/ phosphatidylserine (PS)/ phosphatidylethanolamine (PE); (PC/PS/PE, 60/20/20, mole %).

Results

Surgery was uneventful as indicated by the parameters showed in **Table 1**.

Heparin neutralization with protamine was checked with thrombin time. No patient was transfused before blood sampling.

As expected from the design of our study, no patient had abnormal bleeding, the maximal volume collected during the first 24 hours being 750 mL, and thus we did not look at a possible correlation between laboratory parameters and bleeding; the lowest post-CPB ETP we observed, was greater than 1000 nM.min (with PRP).

We found a statistically significant (Wilcoxon test) decrease in ETP (before /after CBP) with both PRP and PDP regardless the TF concentration. Our main finding was that CPB-induced coagulopathy was differently appreciated depending on the presence or absence of platelets. The percentage of variation between pre- and post-operative values of ETP was much less important with PRP than with PDP (**Table 2**).

The ETP pre-post variations observed with PRP were statistically significantly different compared to PDP in presence of 0.3 pM TF, but not to PDP in presence of 1 and 5 pM, probably because of a greater variations between the individual values. In our hands, 0.3 pM is the lowest TF concentration allowing reliable observation of thrombin generation and fully taking into account the 'intrinsic' tenase (anti-haemophilic factors).

Discussion

The number of enrolled subjects (10 patients recruited in this study) was estimated to allow us to document the actual extent of hypocoagulability and to compare the different experimental settings.

As indicated above, no patient had an abnormal bleeding. The lowest post-CPB ETP we observed, was greater than 1000 nM.min (with PRP); in one of our previous works [4], we reported the normal ETP to be 1579 ± 359 nM.min and for mild haemophiliacs the average value was 1060 ± 450 nM.min.

Our results concerning the decrease in ETP values with both PRP and PDP after CPB were in agreement with previous studies [5-7] (studied only with PPP), although we did not find any consistent change in the duration of the initiation phase (by contrast to what has been reported

in [7]). Several mechanisms have been implicated in the haemostatic defects observed after CPB: consumption of coagulation factors and platelets, dilution, activation of fibrinolysis and transient platelet function defect [2,9-11,13,14].

Platelet dysfunction is thought to result from many factors, such as contact with the synthetic surfaces of the extracorporeal circuit and hypothermia associated with bypass [2,9,14]. Many alterations have been reported, including granule α depletion and membrane glycoproteins decrease [2,9,10]. No major alteration of procoagulant properties of platelets has been reported however, which is consistent with the slight decrease in ETP we observed with patients' PRP. In addition, we suggest that other procoagulant actors would be present in PRP and not in PDP, capable to compensate the plasma defect. This hypothesis is supported by the finding that procoagulant microparticles are generated during CPB, released not only from platelets but also from erythrocytes, monocytes, granulocytes and other cells, especially in pericardial blood [15]. Thus, these microparticles, eliminated with the centrifugation used to prepare PDP, might play a procoagulant role in coagulation with PRP, but not with PDP. Whatever the reason, it appears that a plasma defect can be partly compensated by platelets [16].

In conclusion, our findings highlight that the experimental conditions are crucial in the study of *in vitro* thrombin generation in the context of CPB, the presence of platelets and microparticles being associated with a distinct pattern. Future studies should look carefully at the optimal conditions for CAT, not only the presence of platelets and their number, but also regarding the requirement for corn trypsin inhibitor (CTI) – to prevent artificial contact phase activation –, the concentration of TF; and whether taking into account the activated protein C system would improve the relation to clinical outcome.

Abbreviations

CPB = cardiopulmonary bypass, CAT = Calibrated Automated Thrombography, ETP = Endogenous Thrombin Potential, PRP = Platelet-Rich Plasma, PPP = Platelet-Poor Plasma, PDP = platelet-depleted plasma, phosphatidylcholine = PC, phosphatidylserine = PS, TF = recombinant human tissue factor, aPTT = activated partial thromboplastin time, CTI = corn trypsin inhibitor.

References

1. Bevan DH: **Cardiac bypass haemostasis: putting blood through the mill.** *Br J Haemato* 1999, **1104**:208-219.
2. Woodman RC, Harker LA: **Bleeding complications associated with cardiopulmonary bypass.** *Blood* 1990, **76**:1680-97.
3. Lecompte T, Hacquard M, Carreaux JP: **Eptacog-alpha (activated) aka human clotting factor VII recombinant and activated, in cardiac surgery with cardiopulmonary by pass: where do we stand in 2006?** *ITBM-RBM* 2006, **27**:S35-S39.
4. Weerwind PW, Lindhout T, Caberg NE, De Jong DS: **Thrombin generation during cardiopulmonary bypass: the possible role of retransfusion of blood aspirated from the surgical field.** *Thromb J* 2003, **1**(1):3.
5. Trossaert M, Regnault V, Sigaud M, Boisseau P, Fressinaud E, Lecompte T: **Mild hemophilia A with factor VIII assay discrepancy: using thrombin generation assay to assess the bleeding phenotype.** *J Thromb Haemost* 2008, **6**(3):486-493.
6. Schols SE, Feijge MA, Lancé MD, Hamulyák K, ten Cate H, Heemskerk JW, van Pampus EC: **Impaired thrombin generation and fibrin clot formation in patients with dilutional coagulopathy during major surgery.** *Thromb Haemost* 2010, **103**:318-328.

7. Solomon C, Rahe-Meyer N, Sørensen B: **Fibrin formation is more impaired than thrombin generation and platelets immediately following cardiac surgery.** *Thromb Res* 2011, **128**: 277-827.
8. Coakley M, Hall JE, Evans C, Duff E, Billing V, Yang L, McPherson D, Stephens E, Macartney N, Wilkes AR, Collins PW: **Assessment of thrombin generation measured before and after cardiopulmonary bypass surgery and its association with postoperative bleeding.** *J Thromb Haemost* 2011, **9**:282-292.
9. Flaujac C, Pouard P, Boutouyrie P, Emmerich J, Bachelot-Loza C, Lasne D : **Platelet dysfunction after normothermic cardiopulmonary bypass in children: Effect of high-dose aprotonin.** *Thromb Haemost* 2007, **98**:385–391.
10. Pumphrey CW, Dawes J: **Platelet alpha granule depletion: findings in patients with prosthetic heart valves and following cardiopulmonary bypass surgery.** *Thromb Res* 1983, **30**:257-64.
11. Lecompte T, Carteaux JP, Regnault V, de Maistre E, Collet JY, Villemot JP : **Is it possible and worth to use another anticoagulant than (unfractionated) heparin during cardiopulmonary bypass for cardiac surgery?** *ITBM-RBM* 2003, **24**:S35-S39.
12. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoort R, Lecompte T, Béguin S: **Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma.** *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003, **33**(1):4-15.
13. Blome M, Isgro F, Kiessling AH, Skuras J, Haubelt H, Hellstern P, Saggau W: **Relationship between factor XIII activity, fibrinogen, haemostasis screening tests and postoperative bleeding in cardiopulmonary bypass surgery.** *Thromb Haemost* 2005, **93**:1101–7.
14. Prisco D, Panicia R. **Point-of-Care: Testing of Hemostasis in Cardiac Surgery:** *Thromb J* 2003, **1**(1):1.

15. Nieuwland R, Berckmans RJ, Rotteveel-Eijkman RC, Maquelin KN, Roozendaal KJ, Jansen PG, ten Have K, Eijssman L, Hack CE, Sturk A: **Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant.** *Circulation* 1997, **96**:3534-41.
16. Schols SE, Feijge MA, Lancé MD, Hamulyák K, ten Cate H, Heemskerk JW, van Pampus EC: **Effects of plasma dilution on tissue-factor-induced thrombin generation and thromboelastography partly compensating role of platelets.** *Transfusion* 2008, **48**:2384-2394.

Table 1. Patients' surgical characteristics and coagulation parameters before and after surgery

		Pre-operatively	Post-operatively
CPB duration (min)	64 (48-118)		
cross clamp time (min)	52 (25-90)		
24 first hours blood loss (mL)	385 (170-750)		
Platelet count (G/L)		240 (109-337)	122 (67-201)
prothrombin time (sec)		12.9 (12.9-13.9)	16.5 (14.8-19.7)
aPTT (sec)		33 (29-59)	43 (34-58)
Fibrinogen (g/L)		4 (3.4-4.6)	2.3 (1.3-2.7)
Prothrombin (%)		85.5 (55-95)	57.5 (30-73)
Antithrombin (%)		97.5 (70-108)	64 (44-77)

Data are reported as median (min-max) of 10 patients. All decreases in platelet count, prothrombin time, aPTT, fibrinogen, prothrombin and antithrombin are statistically significant. $p < 0.05$ when comparing post-operating parameter to pre-operating parameter.

CPB: cardiopulmonary bypass, aPTT: activated partial thromboplastin time.

Table 2. Thrombin generation before and after CPB with PRP and PDP (at three TF concentrations)

	ETP (nM.min)		
	pre-operatively	post-operatively	change (%)
PRP (0.3 pM TF)	1505 (1160-2464)	1491 (1087-2544)	-3.9 (4; -26.1)
PDP (0.3 pM TF)	1468 (1032-1913)	970 (500-1323)	-39.6 (13.9; -61.3)
PDP (1 pM TF)	1560 (1255-1928)	1083 (742-1990)	-24.4 (18.7; -52.7)
PDP (5 pM TF)	1723 (1338-2121)	1189 (810-2335)	-30,5 (28; -52.7)

Data are reported as median (min-max) of at least 8 patients (10 patients enrolled- a few missing data for technical reasons). All decreases in ETP are statistically significant. $p < 0.05$ when comparing ETP change with PRP to those with PDP in presence of 0.3 pM TF. *ETP: Endogenous Thrombin Potential. PDP: platelet-depleted plasma, PRP: platelet-rich plasma, TF: recombinant human tissue factor.*

**Communications
à des congrès nationaux et
internationaux**

1. **Said R**, Mao X, Louis H, Max JP, Poitevin G, Lecompte T, Lacolley P, Regnault V. Vascular smooth muscle cells are potential players in thrombin generation and inhibition. 13th Annual Meeting of the European-Council-for-Cardiovascular-Research, Nice, 10-12 octobre 2008 In : Hypertension, 2008;52:756.
2. **Said R**, Mao X, Max JP, Louis H, Lecompte T, Lacolley P, Regnault V. Comparaison des propriétés pro- et anticoagulantes des cellules vasculaires et des plaquettes. 27ème Congrès Annuel du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (GRRC), Nantes, France. 16-17 avril 2010.
3. **Said R**, Charhbili V, Mao X, Nguyen Dinh Cat A, Huet-Panek N, Labat C, Jaisser F, Lacolley P, Regnault V. Le récepteur aux minéralocorticoïdes modifie la sensibilité au système anticoagulant de la protéine C activée. 26ème Congrès Annuel du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (GRRC), Nancy, France. 2-3 avril 2009.
4. Mao.X, **Said R**, Louis H, L1.Z, Regnault V, Lacolley P. Effets des contraintes mécaniques sur l'intégrine alpha V beta 3 des cellules musculaires lisses vasculaires. 13th Annual Meeting of the European-Council-for-Cardiovascular-Research, Nice, 10-12 octobre 2008 In : Hypertension, 2008;52:756.
5. Mao.X, **Said R**, Louis H, L1.Z, Regnault V, Lacolley P. Effets des contraintes mécaniques sur l'intégrine alpha V beta 3 des cellules musculaires lisses vasculaires. Comparaison des propriétés pro- et anticoagulantes des cellules vasculaires et des plaquettes. 27ème Congrès Annuel du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (GRRC), Nantes, France. 16-17 avril 2010.
6. **Said R**, Mao X, Max JP, Louis H, Lecompte T, Lacolley P, Regnault V. Comparaison des propriétés pro- et anticoagulantes des cellules vasculaires et des plaquettes. 27ème Congrès Annuel du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (GRRC), Nantes, France. 16-17 avril 2010.
7. Sloboda N, **Said R**, Louis H, Hess K, Labat C, Max JP, Thornton S, P. Challande, Lacolley P, Regnault V. Etat d'hypercoagulabilité avec altérations artérielles chez le rat zucker, 26ème Congrès Annuel du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (GRRC), Nancy, France. 12-13 avril 2009.
8. Sloboda N, **Said R**, Louis H, Hess K, Labat C, Max JP, Nzietschueng R, Thornton S, Benetos A, Lacolley P, Regnault V. *In Vitro* Hypercoagulability With Arterial Modifications In Zucker Rats. 27ème Congrès Annuel du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (GRRC), Nantes, France. 16-17 avril 2010.
9. Sloboda N, Louis H, Dupuis F, Bousquenaud M, **Said R**, Hess K, Labat C, Max JP, Thornton S, Lacolley P, Regnault V. *In Vitro* Hypercoagulability in an early phase of the metabolic syndrome in Zucker rats. 13th Annual Meeting of the European-Council-for-Cardiovascular-Research, Nice, 10-12 octobre 2008 In : Hypertension, 2008;52:756.
10. **Said R**, Mao X, Louis H, Max JP, Poitevin G, Lecompte T, Lacolley P, Regnault V. Etude des propriétés pro- et anticoagulantes des cellules endothéliales, cellules musculaires lisses aortiques humaines et des plaquettes humaines. 6ème Journée Claude Huriet, Nancy, France, 17 décembre 2010. 2010
11. **Said R**, Mao X, Louis H, Max JP, Poitevin G, Lecompte T, Lacolley P, Regnault V. Activité thrombogène des microparticules d'origine endothéliale, musculaire et plaquettaire. 28ème Congrès Annuel du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (GRRC), Lyon, France. 12-13 avril 2011.
12. **Said R**, Lecompte T, Max JP, Louis H, Lacolley P, Wahl D, Regnault V. Contribution of the activated protein C system to the dynamics of thrombin formation by human vascular cells and derived microparticles. ISTH, Kyoto Japon, July 23-28, 2011.

RESUME

L'objectif principal de ce travail était de comparer l'implication (i) de cellules vasculaires, cellules musculaires lisses vasculaires (CML) et cellules endothéliales (CE), ou des cellules circulantes, les plaquettes, et (ii) des microparticules (MP) issues de ces différentes cellules dans la génération de la thrombine mais également dans son inhibition par les systèmes anticoagulants de la protéine C activée (PCa) et de l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI), et d'identifier les mécanismes et les déterminants responsables des différences observées entre ces supports cellulaires pour la coagulation.

Nous avons démontré que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ qui est le récepteur pour la prothrombine sur les surfaces vasculaires était impliquée dans la génération de thrombine à la surface des CML soumises ou non à des déformations mécaniques cycliques.

A l'état de base, les CML et les CE ont un potentiel thrombinique similaire, mais moins important que celui des plaquettes. Nous avons montré un rôle synergique du TFPI avec la PCa dans l'inhibition de la génération de thrombine à la surface de ces cellules plus importante avec les CML qu'avec les CE.

L'ensemble de nos résultats suggère que les CML pourraient exercer des effets procoagulants comparables aux CE mais avec des régulations différentes en réponse aux facteurs pro- et anticoagulants, et que les MP issues de cellules vasculaires ont un pouvoir thrombogène très supérieur à leurs cellules d'origine.

Mots clés : cellules musculaires lisses vasculaires, microparticules, génération de thrombine, sensibilité à la protéine C activée, intégrine $\alpha_v\beta_3$.

ABSTRACT

The main objective of this study was to compare the implication (i) of vascular cells, smooth muscle cells (SMC) and endothelial cells (EC), or circulating cells, platelets, and (ii) microparticles (MP) derived from these different cells in the generation of thrombin but also in its inhibition by the activated protein C (APC) and the tissue factor pathway inhibitor (TFPI), and to identify the mechanisms and determinants responsible for observed differences between these different cell supports for coagulation.

We have demonstrated that $\alpha_v\beta_3$ integrin, the prothrombin receptor on the vascular surfaces, was involved in the generation of thrombin on the surface of these cells subjected or not subjected to cyclic mechanical deformations.

At baseline, SMC and EC, have equivalent thrombin generating capacities, but less than that of platelets. We have shown a synergistic role of TFPI with APC in the inhibition of thrombin generation at the surface of these cells, more important with SMC than with EC.

Taken together, our results suggest that SMC may exert procoagulant effects comparable to EC but with different regulations in response to pro-and anticoagulant factors, and that MP derived from vascular cells have a very higher thrombogenic activity compared to their parent cells.

Keywords: vascular smooth muscle cells, microparticles, thrombin generation, sensitivity to activated protein C, $\alpha_v\beta_3$ integrin.

